

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
**FACULTAD DE MEDICINA**



**ESTUDIO DE LOS MECANISMOS MOLECULARES  
IMPLICADOS EN EL ENVEJECIMIENTO  
PANCREÁTICO Y HEPÁTICO : MODULACIÓN POR  
HORMONA DE CRECIMIENTO Y-O MELATONINA**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR

**Sara Cuesta Sancho**

Bajo la dirección de los doctores

Jesús A. Fernández-Tresguerres Hernández,  
Elena Vara Ameigeiras,  
Roman Kireev

**Madrid, 2012**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA**



**ESTUDIO DE LOS MECANISMOS  
MOLECULARES IMPLICADOS EN EL  
ENVEJECIMIENTO PANCREÁTICO Y  
HEPÁTICO. MODULACIÓN POR  
HORMONA DE CRECIMIENTO Y/O  
MELATONINA.**

**TESIS DOCTORAL**

**Sara Cuesta Sancho**

**Madrid, 2012**

---

FACULTAD DE MEDICINA

**ESTUDIO DE LOS MECANISMOS  
MOLECULARES IMPLICADOS EN EL  
ENVEJECIMIENTO PANCREÁTICO Y  
HEPÁTICO. MODULACIÓN POR  
HORMONA DE CRECIMIENTO Y/O  
MELATONINA.**

Memoria presentada por

**Sara Cuesta Sancho**

para la obtención del grado de Doctor

VºBº Directores:

Jesús A. Fernández-Tresguerres  
Hernández

Elena Vara Ameigeiras

Roman Kireev

---

**D. JESÚS A. FERNÁNDEZ-TRESGUERRES HERNÁNDEZ**, Catedrático del Departamento de Fisiología Humana de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid,

**Dña. ELENA VARA AMEIGEIRAS**, Catedrático del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid,

**D. ROMAN KIREEV**, Contratado del Departamento de Fisiología Humana de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid,

CERTIFICAN:

Que Dña. Sara Cuesta Sancho ha realizado bajo su dirección los trabajos de investigación correspondientes a su Tesis Doctoral titulada: **“ESTUDIO DE LOS MECANISMOS MOLECULARES IMPLICADOS EN EL ENVEJECIMIENTO PANCREÁTICO Y HEPÁTICO. MODULACIÓN POR HORMONA DE CRECIMIENTO Y/O MELATONINA”**, que ha terminado con el mayor aprovechamiento y se encuentra en condiciones para ser defendida ante un Tribunal. Para que así conste, firmamos el presente certificado en Madrid, a 6 de Febrero de 2012.

---

Fdo. Jesús A. Fernández-Tresguerres  
Hernández

Fdo. Elena Vara Ameigeiras

Fdo. Roman Kireev

---

*Lo importante es no dejar de hacerse preguntas (Albert Einstein)*

---

*Yo no estaría escribiendo esto hoy si mis padres no  
fueran como son*

*Esta tesis está dedicada a vosotros*

*Gracias*

---

# *Índice*

---

# I. Introducción

## 1. ENVEJECIMIENTO

1.1. Concepto de envejecimiento.....	2
1.2. Características del envejecimiento.....	3
1.3. Alteraciones y manifestaciones debidas al envejecimiento..	4
1.4. Teorías del envejecimiento.....	5
1.4.1. Teorías evolutivas.....	6
1.4.2. Teorías genéticas.....	7
1.4.3. Teorías celulares.....	7
1.4.4. Teorías moleculares.....	8
1.4.5. Teorías orgánicas.....	9
1.4.6. Teoría de los radicales libres o estrés oxidativo.....	10
1.4.7. Teoría inflamatoria del envejecimiento.....	11

## 2. MECANISMOS MOLECULARES IMPLICADOS EN EL ENVEJECIMIENTO

### 2.1. ESTRÉS OXIDATIVO

2.1.1. Concepto de radical libre.....	13
2.1.2. Tipos de radicales libres.....	14
2.1.2.1. Radicales libres de oxígeno.....	14
2.1.2.2. Radicales libres de nitrógeno.....	17
2.1.3. Génesis de los radicales libres.....	18
2.1.3.1. Fuentes exógenas.....	18
2.1.3.2. Fuentes endógenas.....	19
2.1.4. Mecanismos de protección frente a los radicales libres.....	25
4.2.4.1. Antioxidantes.....	25
4.2.4.1.1. Enzimáticos.....	26
4.2.4.1.2. No enzimáticos.....	29
4.2.4.2. Sistemas reparadores.....	30

### 2.2. INFLAMACIÓN

2.2.1. Concepto de inflamación.....	31
2.2.2. Papel de la inflamación en el envejecimiento.....	32
2.2.2.1. Mediadores de inflamación.....	32
2.2.3. Factor de transcripción nuclear NFkB.....	39
2.2.3.1. NFkB y envejecimiento.....	41
2.2.3.2. Sirtuinas, factores FoxO y NFkB.....	42

---

## **2.3. APOPTOSIS**

2.3.1. Concepto e importancia del proceso de apoptosis.....	45
2.3.2. Mecanismos moleculares de regulación de la apoptosis....	46
2.3.3. Vías de inducción de la apoptosis.....	49
2.3.3.1.    Vía mitocondrial o intrínseca.....	49
2.3.3.2.    Vía de los receptores de muerte o extrínseca.....	50
2.3.3.3.    Vía de la granzima B.....	52
2.3.3.4.    Vía relacionada con el retículo endoplásmico.....	52
2.3.4. Mecanismos de protección frente a la apoptosis.....	54

## **3. HORMONA DE CRECIMIENTO (GH)**

3.1.    Secreción y regulación de la GH.....	55
3.2.    Receptor y señalización de la GH.....	57
3.3.    Efectos de la GH .....	58
3.4.    Factores de crecimiento tipo insulina (IGF).....	59
3.5.    Somatopausia.....	59

## **4. MELATONINA**

4.1.    Síntesis y regulación de la secreción de melatonina.....	60
4.2.    Mecanismo de acción de la melatonina.....	61
4.3.    Acciones antioxidantes de la melatonina.....	63
4.4.    Melatonina y envejecimiento.....	65

## **5. HÍGADO**

5.1.    Generalidades.....	66
5.2.    Cambios morfológicos y funcionales debidos al envejecimiento.....	68

---

<b>6.</b>	<b>PÁNCREAS</b>	
6.1.	Generalidades.....	69
6.2.	Diabetes Mellitus.....	73
6.3.	Cambios morfológicos y funcionales debidos al envejecimiento.....	74
<b>7.</b>	<b>MODELO ANIMAL UTILIZADO</b>	
	Ratones con senescencia acelerada y retardada (SAM).....	81

## **II. Hipótesis y objetivos**

Objetivo general.....	89
Objetivos concretos.....	90

## **III. Material y Métodos**

Animales.....	94
Tratamientos.....	95
Hormona de crecimiento.....	95
Melatonina.....	95
Hormona de crecimiento más melatonina.....	96
Sacrificio de los animales y recogida de muestras.....	98
Determinaciones realizadas.....	99
Expresión y extracción del ARNm.....	100
Expresión de proteínas.....	103
Preparación de las muestras.....	104
Determinación de la concentración de citoquinas en tejidos.....	104
Óxido nítrico.....	105
Niveles de insulina.....	105
Niveles de glucosa en plasma.....	106
Ácidos grasos libres.....	106
Hidroperóxidos de lípidos.....	106
Enzimas antioxidantes.....	106
Glutación.....	107

---

Análisis estadístico.....	107
---------------------------	-----

#### **IV. Resultados**

Hígado.....	110
Páncreas.....	120

#### **V. Discusión**

Hígado.....	148
Páncreas.....	161

#### **VI. Conclusiones.....197**

#### **VII. Bibliografía.....200**

#### **VIII. Anexos.....231**

---

---

# *Agradecimientos*

---

*Seguramente ésta es una de las partes más difíciles de cualquier tesis porque tienes que agradecer a todo el mundo el apoyo recibido y puedes cometer el error de olvidar a gente importante. Voy a intentar dividir a la gente entre lo profesional y lo personal.*

*Las dos personas más importantes para el desarrollo de esta tesis tanto a nivel profesional como personal han sido mis directores de tesis, el Dr. Tresguerres (Jesús) y la Dra. Vara (Elena), muchas gracias por darme la oportunidad de hacer este trabajo bajo vuestra supervisión. Ahora sé que he aprendido de los mejores. Me ha encantado trabajar con vosotros. Jesús siempre intentando buscar financiación, corrigiendo todos los artículos en un tiempo record y siempre con alegría. Y Elena, que te voy a decir que no sepas, siempre que he tenido una crisis personal has parado de trabajar, me has escuchado, me has comprendido y me has ayudado a tomar la decisión correcta en cada momento. Por supuesto en cuanto a lo profesional me habéis enseñado a que las cosas no son como queremos que sean, son como son, y somos nosotros los que tenemos que intentar entenderlo y darlo un significado. De verdad, gracias.*

*No me puedo olvidar de otra persona muy importante en el desarrollo de esta tesis, el Dr. Kireev (mi ruso). ¡No sé que habría hecho sin ti! Desde el primer día que llegué me recibiste con una sonrisa, me enseñaste desde lo más básico hasta lo más complicado y siempre con ganas de contestar a mis primeras preguntas que consumían a cualquier persona. Hemos pasado tantas cosas juntos que siento que me quedo sin palabras. No olvidemos esas noches de Julio en las que nos quedábamos en la uni haciendo isquemias hasta las 12 de la noche, o cuando nos hemos ido de congresos, si no hablabas en ruso, se te antojaba ir a dar un paseo cuando más llovía... ¡Si es que eres un cuadro! (creo que es una de las frases que más te he dicho en este tiempo). Hay infinidad de cosas que hemos vivido juntos y quiero que sepas (aunque ya lo sabes) que aquí tienes una amiga.*

---

*Otra de las personas imprescindibles para la realización de este trabajo ha sido la Dra. García (Cruz). No conozco a nadie en el mundo que tenga más paciencia. Desde el primer día me ayudaste con las extracciones del RNA de páncreas, haciendo miles de pruebas, cambiando todas las condiciones... siempre pudiendo preguntarte cualquier duda (desde dónde estaban guardadas las cosas hasta cómo hacer un cálculo). De verdad muchas gracias por todo.*

*Lisa, gracias por las risas, por tu manera de ser, siempre dispuesta a ayudarme. Contagias de alegría a cualquier persona que tienes alrededor y creo que nos hemos compenetrado muy bien, nunca hemos coincidido de bajón, cuando me tocaba a mi (en los momentos más duros) siempre me has escuchado y me has hecho comprender que no era para tanto, ha sido un gran placer compartir contigo todo este tiempo. Gracias por todo.*

*Por otra parte también tengo que dar las gracias a mis compañeros de despacho. Rocío y Dani. Cuando entré a trabajar aquí, es cuando más estuve con vosotros porque no me iba a bioquímica al laboratorio y ahí se forjó nuestra amistad. No creo que sólo seamos compañeros de despacho, por lo menos yo no lo siento así. Me ayudasteis muchísimo cuando empecé a trabajar aquí y por eso os quiero dar las gracias.*

*Al Dr. Paredes (Sergio), nuestra nueva incorporación al grupo, aunque no nos conocemos desde hace mucho gracias por las anécdotas, por los consejos y por intentar ayudarme en todo lo posible. Espero seguir conociéndote más.*

*Todas las personas del pasillo de fisio, tanto a los de un fondo (Dra. Cachofeiro y Dr. Valero) como a las del otro fondo (Dra. López-Calderón, Dra. Villanúa y Dra. Martín) y a todos los becarios. Por supuesto sin olvidarme de las del centro (Dra. Vaticón y Dra. Ariznavarreta).*

*No me quiero olvidar de nadie, por lo tanto, también quiero dar las gracias a todas las personas del pasillo de Bioquímica. Lo malo que tiene pertenecer a dos*

---

*departamentos diferentes es que no acabas de conocer a todo el mundo, pero gracias porque siempre que nos hemos cruzado por el pasillo me habéis saludado con vuestra mejor sonrisa.*

*Por supuesto no quiero dejar fuera al Dr. Viña, gracias por acogerme en tu departamento y hacerme sentir como en casa desde el primer día. A la Dra. Borrás y al Dr. Gambini por incluirme en las reuniones desde el principio y hacerme sentir participe del grupo en todo momento, además de preguntarme siempre por la tesis y por como iban los experimentos. Y a los becarios, parece que en tres meses no da tiempo para mucho pero realmente he conocido a gente maravillosa y creo que seguiremos en contacto sin duda. Mi grupito de café, que iba creciendo diariamente... sé que en Valencia he aprendido un montón de cosas y todo os lo debo a vosotros. Muchas gracias. ¡La experiencia no hubiera sido igual sin vosotros!*

*A Fernando, Concha, Blanca y Juanjo gracias porque siempre que he tenido que pedir algo me habéis ayudado con vuestra mejor sonrisa.*

*Y por supuesto, no me puedo olvidar de nuestras "secres" Susana y Silvia. Cuando más falta me ha hecho me habéis ayudado sin pensarlo, dándome la oportunidad de conocer vuestro trabajo y de vivir unas experiencias inolvidables ¡gracias por intentar hacer que todo haya sido más fácil!*

---

*En el terreno personal, quiero empezar mis agradecimientos con mis dos pilares fundamentales, mis padres.*

*Desde pequeña me habéis enseñado que la clave para el éxito es la constancia y el afán de superación. Por eso hoy he acabado esta etapa de mi vida. Gracias por apoyarme en todo momento, desde siempre. Todavía me acuerdo de ese primer cuatrimestre de mi primero de Biología en el que yo decía que me quería volver a casa que yo no sabía estudiar... y no me dejasteis volver, me dijisteis no me podía rendir en cuanto algo no salía como yo quería, en ese momento no lo entendí. Ha llovido mucho desde entonces, pero ahora todavía hay días en los que me planteo si merece la pena y me acuerdo de lo que me dijisteis. Con esto quiero decir que el sufrimiento pasado para terminar primero la carrera y ahora esta tesis doctoral no hubiera sido posible sin vosotros.*

*Sois los mejores padres que se puede tener, además de ser mis padres sé que sois mis amigos, con los que puedo contar para cualquier cosa porque sé que siempre vais a estar ahí dándome sabios consejos sobre como afrontar los problemas que me van surgiendo. Sólo vosotros sabéis todo lo que significáis para mí y aunque me gustaría resumir en unas líneas lo que me hacéis sentir no se puede. Por eso esta tesis esta dedicada a vosotros. M<sup>a</sup> Rosa Sancho Pilar por ser mi mejor y más leal amiga y Carlos Cuesta Sanz porque, a parte de que se me cae la baba contigo, eres la persona que mejor me ha enseñado que a base de trabajo y esfuerzo todo es posible. ¡OS QUIERO!*

*¡Abuela! Sé que no sabes lo que estoy haciendo exactamente pero me da igual. Aunque grites y tengas ese carácter que sabemos que tienes TE QUEREMOS y te queremos tal y cómo eres. ¡Y yo te quiero más! Aunque haya habido momentos en los que no te lo he demostrado espero que lo tengas claro. Y a ti, abuelo, no hay un solo día en el que no me acuerde de ti. Lo único que me consuela es que sé que todo el tiempo que pude estar contigo lo estuve. Me hubiera gustado conocerte más porque aunque pasamos tiempo juntos yo era pequeña. Te fuiste demasiado pronto*

---

*y de manera inesperada pero lo que sé y recuerdo sin ninguna duda es que fui la niña de tus ojos. Tengo muchos recuerdos y espero no olvidarlos nunca.*

*A mis abuelos paternos, Ángel e Isabel, habéis sido un ejemplo de matrimonio ejemplar y muy querido. Cualquiera persona que habla de vosotros recuerda veros dando un paseo agarraditos del brazo. Además habéis demostrado siempre que sois luchadores hasta en los momentos más difíciles (de hecho habéis criado a cuatro hijos, habéis llevado un negocio y aún teníais tiempo de estar con los nietos). Os quiero dar las gracias porque aunque ya de últimas no sabéis bien quien somos, sé que me habéis querido como a cualquiera de mis primos, siempre me habéis preguntado cómo me iba y siempre os ha importado que tal estaba. Gracias. Sois un ejemplo a seguir.*

*Mario, que decir sobre ti, has estado conmigo desde que éramos unos críos dándome tu alegría y tu apoyo sin esperar nada a cambio. Gracias por estar siempre, de día y de noche, cuando me hace falta un abrazo, unas palabras de ánimo o simplemente una mirada (cuando estamos rodeados de gente). Cuando he pensado que las circunstancias me superaban siempre me has tendido tu mano para ayudarme a salir del hoyo. Tengo que darte las gracias por todos estos años, porque eres otro de los pilares fundamentales en mi vida, porque me sostienes y no me dejas caer nunca. Sé que ha habido veces que he dejado a un lado mi vida personal por mi vida profesional y tengo que darte las gracias porque nunca me lo has echado en cara, no siempre ha sido fácil pero nunca has dejado de luchar por esta relación. Además de mi novio eres mi mejor amigo. GRACIAS, TE QUIERO.*

*Pal, mi amiga incondicional, creo que nuestra relación es tan especial por lo diferentes que somos, me has enseñado muchas cosas y creo que una de las mejores cosas que me ha dado la carrera ha sido a ti. Eres muy importante para mí y la vida en Madrid se me hace más llevadera porque sé que estas tú.*

*No me quiero olvidar de mis amig@s de siempre, por los buenos momentos que hemos pasado junt@s, porque aunque haya estado desaparecida durante meses*

---

*siempre me habéis puesto al corriente de todo y habéis contado con mi opinión.  
Gracias.*

*A todo el mundo que me acompaña en este viaje que es la vida, familia, amigos...  
muchas gracias a tod@s.*

---

---

# *Abreviaturas*

---

<b>ADN:</b> ácido desoxiribonucleico	<b>ESM:</b> error estándar de la media
<b>AGE:</b> productos finales de glicosilación avanzada	<b>FADD:</b> dominio de muerte celular de Fas
<b>AGL:</b> ácidos grasos libres	<b>FoxO:</b> Forkhead box factors
<b>AGPI:</b> ácidos grasos poliinsaturados	<b>GB:</b> granzima B
<b>AKT/PKB:</b> Protein Kinase B	<b>GH:</b> growth hormone
<b>AMPc:</b> AMP cíclico	<b>GHRH:</b> de inglés Growth hormone-releasing hormone
<b>Apaf:</b> factor-proteasa activador de la apoptosis 1	<b>GM-CSF:</b> Factor estimulante de colonias granulocítico/monocíticas
<b>AR:</b> aldosa reductasa	<b>GPx:</b> glutatión peroxidasa
<b>ATP:</b> Adenosin trifosfato	<b>GR:</b> glutatión reductasa
<b>Bad:</b> Bcl-2-associated death promoter	<b>GSH:</b> Glutatión
<b>Bak:</b> Bcl-2 homologous antagonist/killer	<b>GST:</b> glutatión S-transferasas
<b>Bax:</b> Bcl-2-associated X protein	<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:</b> Peróxido de hidrógeno
<b>Bcl-2:</b> B-cell lymphoma 2	<b>HDL:</b> lipoproteínas de alta densidad
<b>Bcl-Xs:</b> anti-apoptotic Bcl-2 family member	<b>HIOMT:</b> hidroxindol-O-metil transferasa
<b>cADN:</b> ADN copia	<b>HO:</b> Heme-oxigenasa
<b>CAT:</b> catalasa	<b>HO<sub>2</sub>•:</b> Radical perhidroxilo
<b>COX:</b> ciclo-oxigenasa	<b>IAP:</b> inhibidor de apoptosis
<b>CREB:</b>	<b>IFNAR:</b> Receptores de membrana de interferón
<b>CRP:</b> Proteína C reactiva	<b>IGF-I:</b> factor de crecimiento similar a insulina
<b>CTE:</b> Cadena de transporte de electrones	<b>IkBs:</b> I-kappa-B
<b>DG:</b> diglicéridos	<b>IKK:</b> IκB kinasas
<b>DM:</b> Diabetes Mellitus	<b>IL:</b> Interleuquina
<b>EGF:</b> Factor de crecimiento epidérmico	<b>IL-1R:</b> recetor de IL1
	<b>INF:</b> Interferón

---

<b>JAK:</b> Janus kinasa	<b>PG:</b> Prostaglandina
<b>JNK:</b> kinasa del dominio n-terminal de c-Jun	<b>PGC:</b> Peroxisome proliferator-activated receptor-coactivator
<b>LPO:</b> Hidroperóxidos de Lipidos	<b>PI3K:</b> fosfoinositol quinasa 3
<b>LPS:</b> Lipopolisacárido	PI3-quinasa/ AKT
<b>MAPK:</b> mitogen activated protein kinase	<b>PKC:</b> proteina kinasa C
<b>MCP1:</b> monocyte chemotactic protein-1	<b>PLC:</b> fosfolipasa C
<b>MDA:</b> malondialdehído	<b>RAK:</b> kinasa asociada a receptor
<b>mRNA:</b> RNA mensajero	<b>RANK:</b> activador del receptor del ligando del factor nuclear kB
<b>MT:</b> receptor de membrana de melatonina	<b>RER:</b> retículo endoplasmático
<b>NADPH:</b> Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato	<b>RHD:</b> Rel Homology Domain
<b>NAT:</b> N-acetil-transferasa	<b>RIA:</b> radio inmuno ensayo
<b>NFkB:</b> Factor de transcripción kappa B	<b>RL:</b> radicales libres
<b>NK:</b> natural killer	<b>RO•:</b> Radicales alcoxilo
<b>NLS:</b> Nuclear Localization Signal	<b>ROO•:</b> radicales peroxilo
<b>NO<sub>2</sub>:</b> Dióxido de nitrógeno	<b>RT-PCR:</b> Reacción de la Cadena de Polimerasa en Transcripción Reversa
<b>NOS:</b> óxido nítrico sintasa	<b>SAM:</b> senescence-accelerated mouse
<b>O<sub>2</sub>:</b> Oxígeno molecular	<b>SAMP:</b> senescence-accelerated prone mouse
<b>ONOO<sup>-</sup>:</b> anión peroxinitrito	<b>SAMR:</b> senescence-accelerated resistant mouse
<b>PCNA:</b> antígeno nuclear de células en proliferación	<b>SC:</b> subcutanea
<b>PDGF:</b> platelet-derived growth factor	<b>Sei 1:</b> SERTA 1 domain containing 1
<b>Pdx-1:</b> pancreatic and duodenal homeobox 1	<b>SIRS:</b> síndrome de respuesta inflamatoria sistémica
<b>PEP:</b> fosfoenol piruvato	<b>SIRT:</b> Sirtuina
	<b>SOD:</b> superóxido dismutasa
	<b>SS:</b> somatostatina

---

**STAT:** signal transduction with  
activation of transcription

**TGF:** Factor de crecimiento  
transformante.

**TLR:** Toll-like receptors

**TNF:** Factor de necrosis tumoral

**TNFR:** receptor de TNF

**TRAF:** factor asociado a TNF

**TRAIL:** ligando asociado a la  
activación de la apoptosis similar al

**TRH:** hormona liberadora de  
tirotropina

**TX:** Tromboxano

**VLDL:** lipoproteínas de baja  
densidad

---

---

# *Introducción*

---

## 1. EL ENVEJECIMIENTO

### 1.1. Concepto de envejecimiento

Debido al aumento de la esperanza de vida y a la disminución de la tasa de fecundidad, la proporción de personas mayores de 60 años está aumentando más rápidamente que cualquier otro grupo de edad en casi todos los países. El envejecimiento de la población puede considerarse un éxito de las políticas de salud pública y el desarrollo socioeconómico, pero también constituye un reto para la sociedad, que debe adaptarse a ello para mejorar al máximo la salud y la capacidad funcional de las personas mayores, así como su participación social y su seguridad. La esperanza de vida en países como Japón y Francia era superior a 80 años ya en 2005, y también está aumentando en los países en desarrollo: un niño que nazca hoy en Chile, Costa Rica, Jamaica, el Líbano, Sri Lanka o Tailandia puede tener una vida de más de 70 años. Sigue habiendo grandes desigualdades, como demuestran las diferencias con respecto a la esperanza de vida al nacer. Por ejemplo, mientras que en Japón, el país con mayor esperanza de vida, es de 82,2 años, en varios países africanos la cifra puede llegar a ser de 40 años menos. También hay importantes desigualdades dentro de un mismo país. Por ejemplo, en los Estados Unidos de América los grupos socioeconómicos más favorecidos tienen una esperanza de vida hasta 20 años mayor que los menos favorecidos.

No es fácil definir el concepto de envejecimiento, existen numerosas definiciones pero no existe una aceptada universalmente. En general, el envejecimiento podría definirse como **“el conjunto de procesos post-madurativos los cuales inducen una serie de cambios en las células y tejidos que progresivamente disminuyen la capacidad de mantenimiento de la homeostasis y aumentan la vulnerabilidad del**

---

**organismo, incrementando el riesgo de enfermedad y muerte”** (Harman D, 2001; Troen BR, 2003).

Es importante distinguir el envejecimiento como proceso, del proceso de envejecimiento. El envejecimiento como proceso (“envejecimiento normal”) representa los cambios biológicos universales que se producen con la edad y que no están afectados por la influencia de enfermedades o del entorno. Por el contrario, el proceso de envejecimiento está muy influenciado por los efectos de los estados del entorno, del estilo de vida y de las enfermedades, que, a su vez, están relacionados con el envejecimiento. Así, la menopausia forma parte del envejecimiento como proceso mientras que, por ejemplo, la diabetes mellitus tipo 2 constituye un ejemplo de proceso de envejecimiento.

## **1.2. Características del envejecimiento**

El envejecimiento tiene una serie de características que lo definen:

- ❖ Paulatino y progresivo: tiene lugar a lo largo de la vida, especialmente en la etapa post-madurativa o post-reproductiva.
- ❖ Irreversible: A diferencia de las enfermedades, no puede detenerse ni revertirse, aunque puede ralentizarse mediante determinadas intervenciones.
- ❖ Universal: Propio de todos los seres vivos.
- ❖ Heterogéneo e individual: Cada especie tiene una velocidad característica de envejecimiento, pero la velocidad de declinación

---

funcional varía enormemente de sujeto a sujeto, y de órgano a órgano dentro de la misma persona.

- ❖ Deletéreo: Lleva a una progresiva pérdida de función.
- ❖ Intrínseco: No debido a factores ambientales modificables.

Aunque bien es cierto que en los últimos 2000 años se ha observado un aumento progresivo en la expectativa de vida de la población, la máxima esperanza de vida del ser humano se manifiesta alrededor de los 118 años. A medida que se ha logrado prevenir y tratar mejor las enfermedades, y se han mejorado los factores ambientales, se observa que una mayoría de la población logra vivir hasta edades muy avanzadas con buena salud, y muere generalmente alrededor de los 80 años.

### **1.3 Alteraciones y consecuencias del envejecimiento**

El envejecimiento está asociado con una serie de alteraciones comunes que se dan en todos los seres vivos. Prácticamente todas las funciones fisiológicas pierden eficiencia, en general se puede afirmar que se da una *pérdida de la capacidad de homeostasis (adaptación a los estímulos ambientales) de los individuos* que puede traducirse tanto en respuestas exageradas como disminuidas o retardadas ante diversos estímulos. Estos hechos determinan que los ancianos sean más sensibles y frágiles ante traumatismos, infecciones, intervenciones quirúrgicas...

Observamos también una *disminución progresiva de la capacidad fisiológica*. Como ejemplo se puede destacar el descenso de la capacidad vital, la filtración renal y la capacidad cardiaca máxima, alteraciones en los órganos de los sentidos (especialmente en la visión y audición), deterioro

---

del sistema músculo-esquelético, cambios hormonales, inmunitarios, alteraciones cognitivas, alteraciones nutricionales, aumento de citoquinas proinflamatorias y del estrés oxidativo, etc.

Podemos percibir *cambios en la composición tisular* disminuyendo la masa ósea y magra y aumentando la masa adiposa. Este hecho puede estar relacionado con otros fenómenos asociados a la edad, como discapacidad funcional, reducción de la densidad mineral ósea, intolerancia a la glucosa, resistencia a la insulina y reducción de la tolerancia al calor y al frío (de Teresa Galván C, 2004). Además del aumento observado en la masa adiposa, Shimokata en 1989 (Shimokata y cols 1989) observó que se produce una redistribución de la grasa corporal, incrementándose proporcionalmente más la adiposidad central o abdominal, especialmente en los varones y en las mujeres a partir de la menopausia (Nassis P y Geladas D, 2003). Este fenómeno tiene importantes repercusiones en la salud, ya que la obesidad, y especialmente la central o abdominal, es un reconocido factor de riesgo cardiovascular, y está relacionada con la resistencia a insulina y la diabetes mellitus tipo 2 (Beaufrère B y Morio B, 2000).

Todos los hechos citados anteriormente conducen a un *aumento de la susceptibilidad y vulnerabilidad a la enfermedad* y a una peor capacidad de recuperación. Y por último a un *aumento de la mortalidad de los individuos*.

#### **1.4. Teorías sobre el envejecimiento**

Como se ha mencionado anteriormente, el envejecimiento es un proceso complejo y no es fácil de definir, por ello se han postulado numerosas teorías a lo largo del último siglo con el fin de explicar los mecanismos que subyacen a este proceso pero ninguna de ellas es capaz de explicarlo

---

por sí sola. Hay teorías evolutivas, genéticas, celulares, moleculares y orgánicas.

- ❖ Teorías evolutivas
- ❖ Teorías genéticas
- ❖ Teorías celulares: Límite de la duplicación celular
- ❖ Teorías moleculares: Acumulación de productos de desecho, Entrecruzamientos, Mutaciones somáticas, Teoría de los radicales libres.
- ❖ Teorías orgánicas: Inmunológica, Neuroendocrina

#### **1.4.1. Teorías evolutivas**

Consideran el envejecimiento como un subproducto de la evolución. Consideran que la expectativa de vida habría evolucionado igual que cualquier otra característica biológica.

Un ejemplo de estas teorías es la Teoría del soma desechable formulada por Thomas Kirkwood (1977) en la que afirma que las células somáticas serían “prescindibles” una vez se ha asegurado la supervivencia de la especie a través de la reproducción y los organismos no han desarrollado sistemas de reparación y mantenimiento de las células somáticas en etapas tardías de la vida.

George Sacher en 1978 (Sacher G, 1978) propuso que la evolución ha ido favoreciendo el desarrollo de genes que aumentan la longevidad (Teoría del aseguramiento de la longevidad).

---

### **1.4.2. Teorías genéticas**

Consideran el envejecimiento como parte del programa controlado de desarrollo y maduración de los organismos. Según estas teorías existirían una serie de genes de longevidad implicados en procesos de reparación y prevención de daños, señalización celular, estabilización del genoma, resistencia al estrés etc., cuya manipulación da lugar a individuos más longevos que otros de su misma especie.

La teoría del programa genético del envejecimiento sugiere que este proceso es el resultado de un programa contenido en nuestros genes, es decir, formaría parte del programa de desarrollo de los organismos, desde su nacimiento hasta su muerte, y existiría un “reloj biológico” que iría marcando la aparición de los distintos cambios (Wickens AP, 1998d).

### **1.4.3. Teorías celulares**

Consideran la célula como unidad mínima para intentar explicar los mecanismos del envejecimiento.

Hayflick y Moorehead en los años 60 (1961) observaron que fibroblastos en cultivo presentan una capacidad mitótica limitada, el conocido como “límite de Hayflick”. Éste hallazgo les llevó a formular una hipótesis en la que identifican la pérdida de capacidad mitótica de las células con el envejecimiento del organismo.

Un hallazgo más reciente relacionado con el envejecimiento celular es el acortamiento de los telómeros, unas estructuras situadas en las porciones distales de los cromosomas y que previenen su degradación y fusión con otros cromosomas. Estas estructuras se acortan con cada división celular, y se ha sugerido que cuando han alcanzado una longitud mínima, la célula deja de dividirse. De hecho, las células transformadas e inmortalizadas y las células germinales expresan un enzima denominado “telomerasa” que

---

previene el acortamiento de los telómeros, y la elongación experimental de los mismos es capaz de prolongar la vida de las células.

#### **1.4.4. Teorías moleculares**

Hay muchas y muy variadas teorías que intentan explicar el proceso de envejecimiento a nivel molecular. La teoría de la acumulación de productos de desecho postula que el envejecimiento se produce por el depósito de productos de degradación del metabolismo celular, los cuales, al llegar a un nivel crítico, interferirían con las funciones vitales de la célula. La más característica de estas sustancias es la lipofucsina, un pigmento granular marrón-amarillento, que aparece disperso en el citoplasma de las células viejas. Sin embargo, no parece comprometer la función de las células (Wickens AP, 1998f).

La teoría de los entrecruzamientos (cross-linkage) propuesta en 1968 por Johan Björkstén postula que las reacciones metabólicas que tienen lugar en el interior de las células inducen el establecimiento de uniones químicas entre las macromoléculas. Estos entrecruzamientos se acumularían con la edad, provocando alteraciones en las células y en la matriz extracelular (Wickens AP, 1998f).

La teoría de la mutación somática (Wickens AP, 1998d; Troen BR, 2003) sostiene que el proceso de envejecimiento es consecuencia de la acumulación de daño al material genético de las células somáticas inducido por la radiación presente en el ambiente. Este fenómeno llevaría a la pérdida de células y la generación de células anormales y/o con alteraciones funcionales.

---

#### 1.4.5. Teorías orgánicas

Estas teorías consideran que los cambios y alteraciones que acompañan al proceso de envejecimiento se deben a alteraciones de dos sistemas básicos en la regulación del organismo, el sistema inmunitario y el endocrino.

La teoría inmunológica del envejecimiento se basa en que la capacidad funcional del sistema inmune declina con la edad y se produce un aumento de los fenómenos autoinmunes (Wickens AP, 1998; Troen BR, 2003).

La teoría neuroendocrina del envejecimiento se basa en los cambios degenerativos que el cerebro y el sistema nervioso muestran con la edad. Defiende que los cambios degenerativos que sufre el sistema nervioso afectan a la regulación de la secreción hormonal y, por extensión, de sus órganos diana (Troen BR, 2003). Numerosos estudios, muchos de ellos realmente “curiosos y llamativos”, han sido desarrollados para determinar el papel de las hormonas en el envejecimiento, y su capacidad como agentes “rejuvenecedores”. Cabe mencionar las auto-inyecciones de extracto testicular del ilustre y septuagenario Profesor Brown-Sequard, a finales del siglo XIX, los trasplantes testiculares de Sergei Voronoff a principios del siglo XX, o las inyecciones de células aisladas de glándulas de animales “jóvenes” del Premio Nobel P. Niehans, quien aplicó dicha terapia a personajes como Winston Churchill, los Duques de Windsor o Pío XII. Al margen de estas anécdotas, déficits hormonales han demostrado tener relación con el proceso del envejecimiento. Algunas de ellas son los *estrógenos*, en la mujer, la *hormona de crecimiento* y la *melatonina*. Estas hormonas disminuyen con la edad y se encuentran asociadas a una serie de alteraciones corporales características del envejecimiento, su administración sustitutiva parece ejercer efectos beneficiosos a varios niveles.

---

Como hemos mencionado anteriormente son muchas las teorías propuestas pero, al igual que no es fácil definir el proceso de envejecimiento, tampoco es fácil definir sus causas. Dos de las teorías más aceptadas por la comunidad científica son la Teoría de los radicales libres y la Teoría inflamatoria. Éstas últimas son en las que nos vamos a basar en esta Tesis Doctoral.

#### **1.4.6. Teoría de los radicales libres o del estrés oxidativo** (Harman D, 1956).

Según esta hipótesis, el envejecimiento se debería a la acumulación de daño intracelular inducido por radicales libres. Un radical libre es aquella especie química, ya sea átomo, molécula o parte de ésta, con existencia independiente que posee uno o varios electrones desapareados en su orbital más externo (Fridovich., 1978) lo que los hace altamente reactivos. La mayoría de ellos son generados en el transcurso de diversas reacciones químicas que tienen lugar en el interior de la célula, especialmente durante la fosforilación oxidativa mitocondrial, por lo que la mayoría de ellos derivan del oxígeno, siendo por ello conocidos como especies reactivas de oxígeno (ROS, *del inglés reactive oxygen species*). Aunque la célula cuenta con mecanismos de defensa contra estas ROS, parte de los radicales generados escapan a su control, y reaccionan con los componentes celulares (proteínas, lípidos, ácidos nucleicos) produciéndoles daños que alteran su estructura y función.

Numerosos datos experimentales apoyan esta teoría. Se ha comprobado que la tasa de producción de radicales libres y de daño oxidativo en distintos tejidos de varias especies es inversamente proporcional al su expectativa de vida máxima. Asimismo, la cantidad de daño oxidativo inducido a las distintas macromoléculas, incluidos lípidos, proteínas y ADN, aumenta con la edad, y este daño tiene consecuencias funcionales importantes (Sohal RS y cols., 2002; Troen BR, 2003).

---

En resumen, esta teoría defiende que los cambios estructurales y funcionales que reconocemos como “envejecimiento” son el resultado de la acumulación de daño intracelular (a proteínas, membranas y ácidos nucleicos) inducida por radicales libres generados durante el metabolismo celular y que escapan a las defensas antioxidantes de la célula.

Es bien conocido que los radicales libres de oxígeno y los peróxidos están generados continuamente en la cadena de transporte mitocondrial (Boveris y Chance, 1973) (Chance y cols., 1979). Además, cerca del 1-2% del oxígeno usado por la mitocondria de mamíferos en estado 4 no da lugar a agua, sino especies activadas del oxígeno (Boveris y Chance, 1973; Chance). Por ello Miquel y colaboradores proponen en 1980 la **Teoría Mitocondrial del Envejecimiento Celular** (Miquel y cols., 1980) en la que se sugiere que la senescencia es un producto derivado del ataque de los radicales libres de oxígeno al genoma mitocondrial en células postmitóticas fijadas (Miquel, Economos y cols., 1980). Las mitocondrias de las células postmitóticas consumen O<sub>2</sub> a velocidades altas, liberando entonces radicales de oxígeno que exceden la capacidad de las defensas antioxidantes celulares (Miquel y Fleming, 1986). Diversos autores han comprobado que las mitocondrias de animales viejos producen más radicales libres que las de los jóvenes (Sohal y cols., 1990; Sastre y cols., 1996). Además, existe una relación inversa entre la producción mitocondrial de peróxidos y la longevidad de los mamíferos (Sohal y Sohal, 1991; Barja, 2002)

#### **1.4.7. Teoría inflamatoria del envejecimiento**

Hoy en día, se considera que muchas de las patologías más comunes relacionadas con el proceso de envejecimiento, como la hipertensión arterial (Peeters AC y cols., 2001), la aterosclerosis (Libby P, 2003), la

---

obesidad, la diabetes (Fresno y cols., 2011) y las enfermedades neurodegenerativas (Mc Cann SM y cols., 1998) son procesos con un claro componente inflamatorio. También se ha comprobado que la producción de muchas moléculas pro-inflamatorias aumenta con la edad, como citoquinas (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, TGF- $\beta$ , INF- $\gamma$ ), prostaglandinas (TXA<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGH<sub>2</sub>, PGG<sub>2</sub>), enzimas (iNOS, COX-2) y factores de transcripción relacionados con estas moléculas (NF $\kappa$ B) (Chung HY y cols., 2001; 2002). Basándose en estos hallazgos, Chung ha propuesto una **hipótesis inflamatoria del envejecimiento** (Chung HY y cols., 2001; 2002), la cual postula que, con el envejecimiento se produce un desbalance entre factores anti- y pro-inflamatorios a favor de éstos últimos, dando lugar a un estado pro-inflamatorio persistente que produciría daño tisular.

Estas teorías se complementan entre sí ya que los radicales libres están muy relacionados con los procesos inflamatorios. Los radicales libres forman parte de las moléculas efectoras de la respuesta inflamatoria, y a su vez, inducen la expresión de moléculas inflamatorias.

Además son teorías especialmente atractivas debido a que permiten una intervención racional, por ejemplo, la administración de antioxidantes y antiinflamatorios podría retardar el daño que acompaña al proceso de envejecer.

---

## **2. MECANISMOS MOLECULARES IMPLICADOS EN EL ENVEJECIMIENTO: ESTRÉS OXIDATIVO, INFLAMACIÓN Y APOPTOSIS**

El proceso de envejecimiento está asociado con inflamación, activación de NFκB, aumento de la apoptosis (Zhang y Hernan, 2002; Chung y cols, 2002), daño a las mitocondrias (Rodriguez y cols, 2007), descenso de la función inmunitaria (Baeza y cols, 2009) y aumento en la tasa de producción de radicales libres (Wickens, 2001). Junto a todo esto se ha observado un descenso en las sustancias antioxidantes y en la actividad de muchas hormonas como la hormona de crecimiento y la melatonina.

### **2.1. ESTRÉS OXIDATIVO**

El estrés oxidativo se define como una alteración del equilibrio entre las especies pro-oxidantes y las antioxidantes, a favor de las primeras (Sies, 1986).

Según la teoría de Radicales Libres que hemos mencionado al principio de esta Tesis Doctoral, el envejecimiento se debe a la acumulación de radicales libres. El envejecimiento y la disminución de la longevidad parecen ser debidos en parte a la acción de los radicales libres encargados de diversas reacciones de oxidación enzimática.

#### **2.1.1. Concepto de radical libre**

Un radical libre es aquella especie química, ya sea átomo, molécula o parte de ésta, con existencia independiente que posee uno o varios electrones desapareados en su orbital más externo (Fridovich., 1978).

---

## 2.1.2. Tipos de radicales libres

Existen gran cantidad de radicales libres, tanto derivados del oxígeno como del nitrógeno, o radicales libres del azufre. Nosotros nos vamos a centrar en las especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno ya que son las mayoritarias.

### 2.1.2.1. Radicales libres de oxígeno

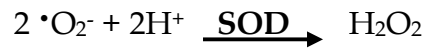
Oxígeno molecular ( $O_2$ ): En la naturaleza el oxígeno aparece mayoritariamente en forma molecular o diatómica ( $O_2$ ) y de este modo se mantiene estable, tiene muy poca reactividad.

Oxígeno singlete ( $^1O_2$ ): El oxígeno singlete es una forma excitada del oxígeno generada a partir del oxígeno molecular. Su vida media es muy corta pero tiene capacidad para sustraer un hidrogenión ( $H^+$ ) de un ácido graso insaturado iniciando la reacción de peroxidación lipídica (Halliwell y Gutteridge., 1989).

Radical superóxido ( $\cdot O_2$ ): Procede de la reducción univalente del oxígeno molecular. Se produce en todas las células eucariotas, sobre todo en la mitocondria y en el retículo endoplasmático (Fridovich., 1978; Nohl y Hegner., 1978). También se forma como producto de muchas reacciones enzimáticas llevadas a cabo por deshidrogenasas, oxidasas e hidrolasas (diamino oxidasa, galactosa oxidasa, citocromo p450...). Este radical puede lesionar los transportadores de electrones de la cadena respiratoria mitocondrial (Sohal y cols., 1990) y del ácido desoxirribonucleico (ADN), así como inducir la oxidación de otras moléculas como la adrenalina, el dihidroxifumarato o la hidroxidopamina (Halliwell y Gutteridge., 1989).

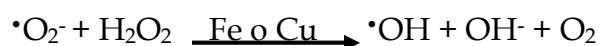
---

La eliminación del  $\cdot\text{O}_2^-$  que se genera en las células se realiza por las Superóxido dismutasas (SOD) de la siguiente manera:



El  $\cdot\text{O}_2^-$  no es muy tóxico pero es la principal fuente de formación del peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), precursor a su vez del radical hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ), la especie reactiva de mayor toxicidad (Sawyer., 1998; Fridovich., 1997). El  $\cdot\text{O}_2^-$  también puede reaccionar con el radical óxido nítrico ( $\cdot\text{NO}$ ) dando lugar a la formación de anión peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) (Halliwell y Gutteride., 1990)

Peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ): No es un radical libre como tal pero está dentro de las especies reactivas de oxígeno ya que puede dar lugar a la formación de radicales libres propiamente dichos. Su importancia reside en la capacidad que tiene de atravesar las membranas biológicas. Como hemos visto anteriormente, el  $\text{H}_2\text{O}_2$  por la reacción que cataliza la SOD (dismutación del  $\cdot\text{O}_2^-$ ), pero también se puede formar por una reducción directa de la molécula de oxígeno, como producto de algunas enzimas (glucosa oxidasa, uricasa...) y por reacciones químicas de autooxidación. Se ha comprobado que el  $\text{H}_2\text{O}_2$  está implicado en la regulación de la transducción de la señal de la expresión de genes a través del NFkB y la proteína activadora 1 (AP-1) (Yi y cols., 2002). El  $\text{H}_2\text{O}_2$  no es tóxico a concentraciones fisiológicas pero puede dar lugar a  $\cdot\text{OH}$  mediante la reacción de Fenton-Haber-Weiss (Fenton., 1894; Haber y Weiss., 1934) dependiendo de las disponibilidades de Fe o Cu.



---

La detoxificación del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se lleva a cabo por la acción de sistemas enzimáticos como la glutatión peroxidada (GPx) que dan lugar a la formación de agua.



Radical hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ): es el radical libre más reactivo (y dañino) que existe. No tiene gran poder de difusión y no se conoce si alguna enzima es capaz de detoxificarlo directamente. En los seres vivos se puede producir por varios mecanismos. Este radical es capaz de reaccionar con las bases púricas y pirimidínicas del ADN, por lo que es un agente genotóxico (Sastre y cols., 2000). Así mismo el  $\cdot\text{OH}$  puede quitar un H<sup>+</sup> de la cadena carbonada de los ácidos grasos poliinsaturados iniciando la peroxidación lipídica (Halliwell y Gutteridge., 1989) y es capaz de dañar las proteínas (Yu., 1990).

Radical perhidroxilo ( $\text{HO}_2\cdot$ ): Se genera a partir de  $\cdot\text{O}_2^-$ . Es un radical libre muy liposoluble y es, por lo tanto, un potente inductor de la peroxidación lipídica en las membranas biológicas (Kanner y cols., 1987)

Radicales alcoxilo y peroxilo ( $\text{RO}\cdot$  y  $\text{ROO}\cdot$ ): Son generados durante la peroxidación lipídica. Son menos reactivos y más selectivos que los radicales  $\cdot\text{OH}$  de la peroxidación lipídica (Kanner y cols., 1987).

---

### 2.1.2.2. Radicales libres de nitrógeno

Óxido nítrico ( $\cdot\text{NO}$ ): Es un gas lipofílico e hidrosoluble. Se produce en numerosos tipos celulares por reacciones catalizadas por la óxido nítrico sintasa (NOS). En realidad, el óxido nítrico (NO) no es estrictamente un radical libre, ya que es un compuesto inorgánico. Se trata de un gas paramagnético cuya vida media es de 5-45 segundos y sobre el que actúa el radical superóxido, generándose peroxinitrito. Dicho compuesto es lesivo de por sí o bien puede participar en la generación de lipoperóxidos en combinación con hierro mediante la reacción de Fenton.

El  $\cdot\text{NO}$  tiene distintas funciones, actúa como regulador del flujo sanguíneo local, como antigregante plaquetario, se produce por los macrófagos activados contribuyendo a la defensa inmunitaria primaria, actúa como neuromodulador, segundo mensajero y mediador del neurotransmisor excitador glutamato (Czapski y Goldstein., 1995). Posee una acción antiinflamatoria importante pero a la vez promueve la disfunción celular y tisular a través de un efecto proinflamatorio (Grisham y cols., 1999). Tiene la capacidad de reaccionar con el hierro de las proteínas intracelulares, principalmente mitocondriales siendo inactivadas por él la mayoría de los enzimas que poseen un grupo hemo. Además a nivel de ADN puede reaccionar con los ácidos nucleicos dando lugar a mutaciones y roturas. Por todo esto, el  $\cdot\text{NO}$  es considerado como una “espada de doble filo”.

Radical peroxinitrito ( $\text{ONOO}\cdot$ ): Este radical se forma in vivo por la reacción entre el  $\cdot\text{NO}$  y el  $\cdot\text{O}_2^-$  (Pietraforte y Minetti., 1997). Es capaz de inducir peroxidación lipídica, interferir con la señalización celular mediante la nitración de residuos aromáticos en las proteínas, degradar carbohidratos, nitrar y oxidar la guanosina y fragmentar el ADN (Beckman y cols., 1994; Beckman y Koppenol., 1996).

---

Dióxido de nitrógeno (NO<sub>2</sub>): Se produce principalmente a partir de la oxidación del •NO atmosférico y se considera que es un iniciador muy efectivo de la cadena de peroxidación lipídica (Halliwell., 1994).

### **2.1.3. Génesis de los radicales libres**

Los radicales libres pueden tener un origen endógeno o exógeno (Freeman y Crapo, 1982; Frei, 1994).

#### **2.1.3.1. Fuentes exógenas generadoras de radicales libres**

Las fuentes exógenas más importantes en la generación de especies activadas de oxígeno son:

- ❖ *Agentes antineoplásicos* tales como la adriamicina, bleomicina, daunorrubicina y algunos antibióticos (Doroshov y Hochstein, 1982) que dependen de grupos quinoides o de unión a metales para su actividad. Algunos de los efectos de estas drogas se han atribuido a su capacidad para reducir el oxígeno a superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo.
- ❖ La *irradiación de los organismos* debido a las radiaciones electromagnéticas (rayos X y  $\gamma$ ) o debido a radiaciones de partículas (electrones, protones, neutrones, deuterones y partículas  $\alpha$  y  $\beta$ ) (Bielsky and Gebieki, 1977).
- ❖ *Factores ambientales* como contaminantes aéreos fotoquímicos, hiperoxia, pesticidas, humo del tabaco, solventes, anestésicos e

hidrocarburos aromáticos. Estos agentes, o bien poseen radicales libres, como el humo del tabaco, o bien se convierten en radicales mediante el metabolismo celular y los procesos de desintoxicación (Mason, 1982).

### 2.1.3.2. Fuentes endógenas de radicales libres

#### ❖ La cadena de transporte electrónico mitocondrial

Los radicales libres son compuestos altamente reactivos que se producen como resultado de la actividad metabólica de las células en los sistemas biológicos. Clásicamente se ha considerado la cadena mitocondrial como la principal fuente de ROS. Está compuesta por una serie de proteínas con capacidad redox que reducen al oxígeno molecular hasta la formación de una molécula de agua. Esta reacción está acoplada a la fosforilación oxidativa, en la cual se produce energía en forma de ATP.

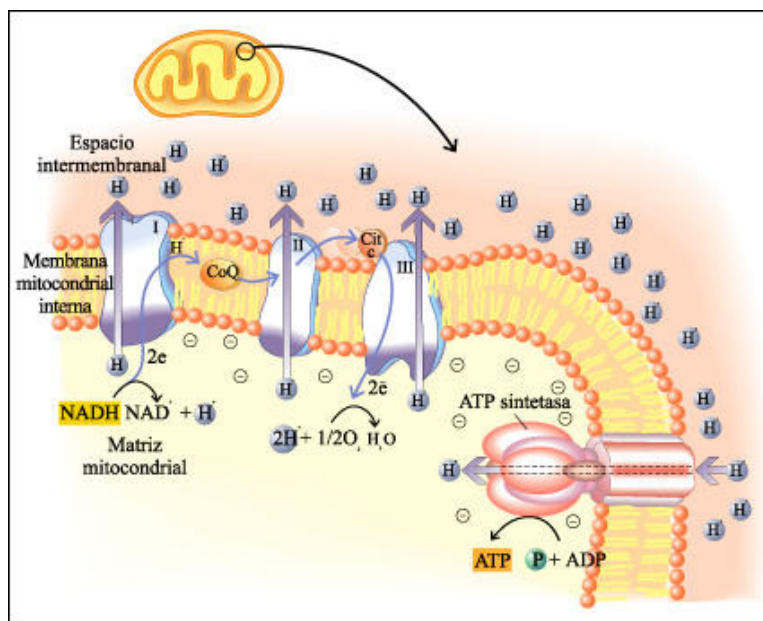


Figura 1. Cadena electrónica mitocondrial

---

Sin embargo, a este nivel, además de la formación de moléculas de agua, aproximadamente entre 1-5% de las moléculas de oxígeno diatómico ( $O_2$ ) son activadas formando  $O_2^{\bullet-}$  a causa de la incorporación de un electrón. La producción de  $O_2^{\bullet-}$  es por lo tanto proporcional a la actividad de la cadena de transporte de electrones (CTE), siendo importante aclarar que esta última no necesariamente es proporcional al consumo de oxígeno en el humano (Tiidus y cols, 1996). La CTE contiene además varios centros redox (como los complejos I, II y III) que pueden agregar electrones a las moléculas de  $O_2$  constituyendo fuentes primarias de  $O_2^{\bullet-}$  (Starkov, 2008)

El  $O_2^{\bullet-}$  producido a nivel de la CTE puede reducir al citocromo C (en el espacio intermembrana) o ser convertido en  $H_2O_2$  y  $O_2$  (en la matriz o espacio intermembrana). Si la actividad mitocondrial es incrementada y mantenida en el tiempo, se puede constituir un estado estable de generación de  $O_2^{\bullet-}$ , que puede reducir metales de transición (favoreciendo la formación de  $OH^{\bullet}$ ) o reaccionar con el NO para formar  $ONOO^{\bullet}$  (Turrens, 2003). Sin embargo, la liberación de ROS fuera de la mitocondria depende de factores como el potencial de membrana de la misma. En este sentido, diferentes estudios coinciden en que la liberación de ROS ocurre principalmente cuando es alcanzado un potencial máximo (estado IV) de la membrana mitocondrial (Han y cols, 2003).

La idea clásica que propone la hiperactividad mitocondrial como la principal fuente de ROS, ha sido progresivamente sustituida en las últimas décadas por una teoría más amplia, que considera la participación de otras fuentes de generación de ROS, como los fenómenos de isquemia reperusión, las reacciones enzimáticas e inmunitarias, la autooxidación de catecolaminas, la producción de ácido láctico, etc. Además, otras características como por ejemplo las condiciones ambientales podrían potenciar la actividad de estas fuentes de generación de ROS y determinar un fallo o insuficiencia de los mecanismos capaces de contrarrestar su formación, conduciendo a un daño molecular y estrés oxidativo.

---

Las fuentes de formación de ROS podrían clasificarse según su capacidad de regulación o “previsión” por parte de los sistemas de homeostasis del organismo en:

1) Formación regulada de ROS: en ella se incluye específicamente el sistema inmune que posee una necesidad fisiológica de ROS. La formación regulada de un ambiente oxidativo es una condición esencial para que los macrófagos y neutrófilos puedan desarrollar su metabolismo normal y realizar la eliminación de antígenos y células apoptóticas (Hampton y Orrenius, 1998). Desde el punto de vista bioquímico, dos moléculas de oxígeno en presencia de NADPH-oxidasa producen dos moléculas de  $O_2^{\bullet-}$  en la reacción llamada “estallido oxidativo” (Fehrenbach y Northoff, 2001). El objetivo final de esta reacción es la formación de  $H_2O_2$  a través de la reacción de Fenton en presencia de SOD (Babior, 1978). Aunque su estructura no permite calificarlo como un radical libre, el  $H_2O_2$  está considerado dentro las ROS debido a su capacidad para generar otros radicales libres. En los leucocitos la mieloperoxidasa produce, a partir de  $H_2O_2$ , un potente ácido antimicrobiano denominado ácido hipocloroso, que además es un fuerte agente oxidante (Hampton y cols, 1998)

2) Formación no regulada de ROS: es decir, aquella que se produce espontáneamente y de manera dosis-dependiente a los estímulos que la activan, como ocurre con los factores ambientales como el ejercicio físico, la dieta, la temperatura ambiental, las radiaciones, etc.

---

### ❖ Peroxidación de Lípidos

La lipoperoxidación es un fenómeno asociado a los fenómenos inflamatorios cuyo iniciador principal es el radical libre hidroxilo. En realidad esta molécula tiene una vida media corta y no tiene efectos “a larga distancia”. Sin embargo, puede desencadenar fenómenos bioquímicos secundarios, entre ellos, la peroxidación de lípidos (Gutteridge, 1988). Los lípidos más susceptibles de ser peroxidados son los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI), generándose un radical alquilo que en presencia de oxígeno pasa a peroxilo, el cual, a su vez, mediante una reacción en cadena sigue oxidando a otros AGPI con lo que se acumulan las especies reactivas de oxígeno. Así, la peroxidación lipídica es un fenómeno que genera más estrés oxidativo por concatenación de sucesivas oxidaciones pudiendo llegar a tener repercusión sistémica (Esterbauer y Cheeseman, 1987). Las consecuencias inmediatas de este fenómeno son estructurales ya que como sustrato se emplean los AGPI de la membrana celular, que queda seriamente dañada. Por otro lado, la cascada de lipoperóxidos se va automagnificando. Pero además se van anulando otros procesos metabólicos necesarios para la supervivencia celular que pueden ser importantes inhibidores enzimáticos (Sugino y cols, 1987)

### ❖ Reacción de Fenton-Haber-Weiss

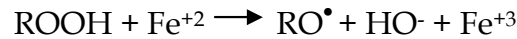
Consiste en la reducción del  $H_2O_2$  por iones de metales de transición, sobre todo el ion ferroso ( $Fe^{+2}$ ) y, en menor medida, el cuproso ( $Cu^+$ ) y otros iones. El agua oxigenada ( $H_2O_2$ ) es una molécula relativamente estable en ausencia de catalizadores que promuevan su descomposición. Fenton (Fenton, 1894) descubrió, a finales del siglo pasado, que se podían oxidar moléculas orgánicas por mezclas de peróxido de hidrógeno y  $Fe^{+2}$  (reactivo de Fenton). Fueron Haber y Weiss los que posteriormente

---

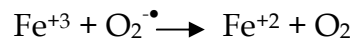
comprobaron cómo el Fe<sup>+2</sup> reduce al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que a su vez se descompone en radical hidroxilo e ión hidroxilo (Haber and Weiss, 1934).



Y en general,



Aunque esta reacción puede tener lugar con varios metales, el hierro parece ser el más importante en sistemas biológicos. El Fe<sup>+2</sup> se oxida a Fe<sup>+3</sup> con mucha facilidad, y éste es muy insoluble. Por ello, el hierro libre que pueda haber en los sistemas biológicos estará en muy pequeñas cantidades y en forma férrica (Halliwell and Gutteridge, 1989). Pero el ion férrico puede ser reducido por el ascorbato (Sawyer, 1988) y por el radical superóxido (Frei, 1994), con lo que se genera un ciclo de producción continua de radicales hidroxilo:



#### ❖ Sistema de transporte electrónico del retículo endoplásmico.

Estos sistemas contienen los citocromos P450 y b5, que pueden oxidar ácidos grasos insaturados y xenobióticos. De hecho, los citocromos P450 (término utilizado para designar a un amplio número de proteínas con grupos hemo muy numerosas en los seres vivos) son considerados como los más poderosos agentes oxidantes in vivo, aunque también pueden actuar como agentes reductores. Son monooxigenasas capaces de formar especies electrofílicas de oxígeno (bien radicales o bien generadoras de radicales) que pueden ser liberadas en la célula (Dolphin, 1988; Foster y Estabrook, 1993).

---

#### ❖ **Membrana plasmática**

La enzima NAD(P)H-oxidasa está presente en la membrana plasmática de las células fagocíticas y es una importante fuente biológica de producción de radicales libres debido a la activación de los leucocitos polimorfonucleares y macrófagos que consumen gran cantidad de oxígeno, el cual será transformado en radical superóxido. Estos radicales libres de oxígeno pueden dañar a la propia célula que los origina y a células próximas a los fagocitos estimulados.

#### ❖ **Fagocitos activados**

Los fagocitos activados (neutrófilos, monocitos, macrófagos, eosinófilos) poseen diversas enzimas que les permiten generar  $O_2^{\bullet}$  y  $H_2O_2$  como mecanismo de defensa frente a microorganismos (Babior, 1978)

#### ❖ **Enzimas solubles y proteínas**

Enzimas como xantina oxidoreductasa, óxido nítrico sintasa, aldehído oxidasa, flavinprotein deshidrogenasa y triptófano dioxigenasa, generan radicales libres durante su ciclo catalítico (Aleman and Handler, 1967).

#### ❖ **Peroxisomas**

Los peroxisomas son una fuente importante de peróxido de hidrógeno. Poseen una concentración elevada de oxidasas, como la D-aminoácido oxidasa y la acil-CoA oxidasa, enzimas utilizadas en la degradación de

---

ácidos grasos y aminoácidos, que producen peróxido de hidrógeno como producto de la reacción que catalizan (Boveris y cols., 1972).

#### ❖ **Autooxidación de pequeñas moléculas**

En la célula existe una gran variedad de componentes solubles, capaces de producir reacciones de oxidación-reducción, tales como los tioles, hidroquinonas, catecolaminas, flavinas y tetrahidropterinas. En todos estos casos, el radical superóxido es el radical primario formado por la reducción del dioxígeno por estas moléculas. Asimismo, también se produce peróxido de hidrógeno como producto secundario, a partir de la dismutación del radical superóxido, bien espontánea, o bien catalizado enzimáticamente por la superóxido dismutasa (SOD).

### **2.1.4. Mecanismos de protección frente a los radicales libres**

#### **2.1.4.1. Antioxidantes**

La mayoría de las células poseen sistemas antioxidantes (enzimáticos y no enzimáticos) que les protegen frente al stress oxidativo. Halliwell en 1995 definió antioxidante como “cualquier sustancia que, cuando está presente en bajas concentraciones comparado con el sustrato oxidable, disminuye significativamente o inhibe la oxidación de este sustrato” (Sies, 1993; Halliwell, 1996)

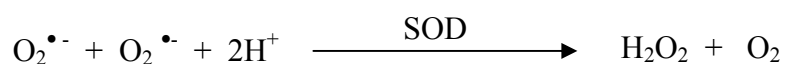
Los antioxidantes se pueden clasificar en antioxidantes enzimáticos y antioxidantes no enzimáticos.

---

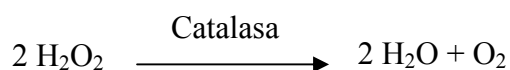
### ❖ Antioxidantes enzimáticos

La mayoría de las células poseen una batería de enzimas que neutralizan los radicales libres (RL). Este sistema antioxidante enzimático puede ser modulado por varios factores. Las enzimas antioxidantes incluyen la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y los encargados del metabolismo del glutati6n, glutati6n peroxidasa (GPx) y glutati6n reductasa (GR). Uno o varios de estos complejos enzimáticos pueden aumentar a causa del estr6s oxidativo, sin embargo cuando los niveles de RL son muy altos, estos sistemas antioxidantes pueden verse superados.

Super6xido dismutasa (SOD): cataliza la dismutaci6n de un electr6n del super6xido en per6xido de hidr6geno y ox6geno. En las c6lulas animales, la Cu/Zn-SOD est6 presente en el citosol y las mitocondrias, mientras que la Mn-SOD est6 presente s6lo en la matriz mitocondrial.



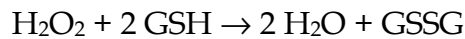
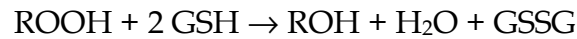
Catalasa: es una enzima que contiene porfirina y cataliza la dismutaci6n de dos electrones del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> convirti6ndolo en ox6geno y agua.



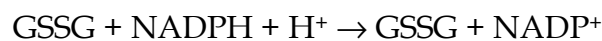
Se encuentra en el citoplasma de los eritrocitos, y en los peroxisomas de las otras c6lulas.

---

Glutación peroxidasa (GPx): involucrada no sólo en la eliminación de peróxido de hidrógeno, sino también en la conversión de hidroperóxidos de lípidos (LOOH) a sus correspondientes alcoholes (LOH) y la oxidación de GSH a glutación disulfuro (GSSG).



Glutación reductasa (GR): Cataliza la reducción de GSSG a GSH utilizando NADPH como elemento reductor.



El sistema antioxidante glutación peroxidasa/reductasa está relacionado con otros sistemas antioxidantes como el superóxido dismutasa/catalasa. Los dos sistemas, en condiciones normales no actúan a la vez, de tal manera que el sistema de la glutación peroxidasa se activa cuando los niveles de especies reactivas de oxígeno (en especial peróxido de hidrógeno) son comparativamente más bajos. La reducción del glutación no es la única función de la glutación reductasa, las concentraciones intracelulares adecuadas de glutación reducido permiten también la recuperación de ácido ascórbico (Vit. C), alfa tocoferol (Vit. E) así como la eliminación de compuestos xenobióticos, el almacenamiento y el transporte de cisteína, la participación en la producción de mediadores derivados del ácido araquidónico, la síntesis de nucleótidos etc.

Los descensos o ausencia de actividad de este complejo enzimático tienen un claro efecto negativo en el balance de óxido-reducción celular, de modo que trastornos en el mismo se han relacionado con enfermedades tan diversas como obesidad, úlcera péptica, enfermedad de Parkinson, isquemia/repercusión, envejecimiento prematuro...

---

Glutación-transferasa: Las glutación S-transferasas (GST) catalizan la adición del glutación a sustancias tanto endógenas como exógenas con grupos funcionales electrofílicos. Juegan un importante papel en funciones de detoxificación y en el metabolismo de numerosas sustancias ya que la unión del glutación a otras moléculas incrementa su hidrosolubilidad haciendo que sea más fácil degradarlos enzimáticamente.

Dentro del espectro de sustancias eliminadas por las GST se encuentran carcinógenos químicos, contaminantes atmosféricos, agentes antineoplásicos etc, pero además inactivan aldehídos insaturados, quinonas, epóxidos, e hidroperóxidos formados como metabolitos secundarios en situaciones de estrés oxidativo. También están implicadas en la síntesis de leucotrienos, prostaglandinas, testosterona y progesterona, así como en la degradación de la tirosina.

Las GST humanas muestran polimorfismos genéticos cuya variabilidad aumenta la susceptibilidad de padecer neoplasias y enfermedades inflamatorias. Por ejemplo, se han relacionado con las alteraciones de la función pulmonar, aumento del riesgo de padecer infarto de miocardio y accidentes cerebrovasculares.

---

### ❖ Antioxidantes no enzimáticos

Glutación (GSH): es el sustrato de la GPx, reacciona con  $\cdot\text{OH}$ ,  $\cdot\text{O}_2^-$  y radicales libres orgánicos y regenera de vitamina C. El GSH puede reaccionar directamente con los radicales libres sin necesidad de intervención enzimática, o bien por medio de la glutación peroxidasa, enzima clave del ciclo redox del glutación.

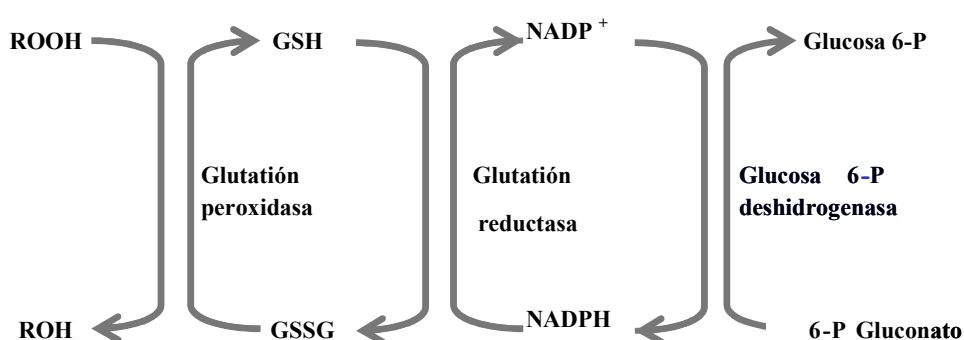


Figura 2. Ciclo redox del glutación

Vitamina C: efectiva contra el radical anión superóxido, el peróxido de hidrógeno, el radical hidroxilo y el oxígeno singlete.

Vitamina E: secuestra radicales peroxil lipídicos dando hidroperóxidos lipídicos y radical tocoperóxido. Este último puede ser reducido por el ascorbato y el glutatiol oxidado a la respectiva quinona.

Flavonoides: gran grupo de antioxidantes polifenólicos que además de encontrarse en el vino también se hallan en muchas frutas, vegetales y bebidas como el té y la cerveza principalmente como O-glicósidos.

---

Estilbenos: Entre los más destacados podemos encontrar el resveratrol, uno de los polifenoles del vino más estudiado, sus concentraciones puede variar entre 0,003 y 3,0 uM en vino tinto.

#### **2.1.4.1. Sistemas reparadores**

En sentido estricto no deben ser considerados como antioxidantes porque no eliminan radicales libres, son una serie de enzimas que participan en la reparación de biomoléculas dañadas por radicales libres. Está comprobado que la peroxidación lipídica estimula la fosfolipasa A2 que tiene como sustrato las formas peroxidadas de los fosfolípidos (Halliwell y Gutteride., 1989), de esta manera, esta enzima degrada los fosfolípidos oxidados de la membrana. También se pueden destacar sistemas reparadores del ADN, la metionina sulfóxido reductasa y las enzimas proteolíticas intracelulares que degradan proteínas dañadas oxidativamente evitando que se acumulen (Davies y cols., 1986; Giulivi y Davies., 1990)

---

## 2.2. INFLAMACIÓN

### 2.2.1. Concepto de inflamación

La inflamación es una respuesta inespecífica, inmediata y no elaborada frente a las agresiones del medio para proteger al organismo del daño celular. Esta respuesta es compleja desde su inicio ya que utiliza varios mecanismos tisulares y humorales para librarse del agente agresor, y cesa cuando alcanza el objetivo, que es el restablecimiento de la integridad del tejido. El proceso inflamatorio consiste en la reacción del tejido vivo de un organismo vascularizado ante una agresión local. Es un proceso que se origina en los vasos sanguíneos, provocando la acumulación de fluido y leucocitos en el tejido extravascular, y está íntimamente relacionado con el proceso de reparación a través de la regeneración de las células y de otros componentes tisulares, el cual configura el mecanismo fundamental para la supervivencia, que es la defensa contra los agresores externos en su totalidad.

Existen dos tipos de inflamación: la aguda y la crónica. La aguda es de corta duración (minutos, horas o algunos días) y sus características principales son la exudación de fluido y de proteínas plasmáticas (edema), así como la migración de leucocitos, predominantemente los neutrófilos. La inflamación crónica, por otro lado, tiene una duración más prolongada y está asociada histológicamente a la presencia de linfocitos y macrófagos, así como a la proliferación del tejido conjuntivo y de vasos sanguíneos. Las respuestas vascular y celular de la inflamación aguda y crónica son mediadas por factores químicos derivados del plasma o de células, y desencadenadas por el estímulo inflamatorio.

El envejecimiento fisiológico y muchas de las enfermedades asociadas a él son debidas a un aumento de las citoquinas pro-inflamatorias y/o quimioquinas, además del estrés oxidativo. Este aumento parece estar mediado, al menos en parte, a través de la activación de NFkB el cual

---

parece jugar un papel central en la inflamación. Un desbalance en el estado inflamatorio del organismo puede ser el responsable de enfermedades relacionadas con la edad como la diabetes mellitus tipo 2, la arteriosclerosis, el cáncer y el Alzheimer (Franceschi y cols., 2000; Franceschi y Bonafe, 2003)

### **2.2.2. Papel de la inflamación en el envejecimiento**

Según la teoría inflamatoria del envejecimiento descrita por Chung y cols en 2001 (Chung y cols, 2001) con la edad se produce un desbalance entre factores anti- y pro-inflamatorios a favor de éstos últimos, dando lugar a un estado pro-inflamatorio persistente que produciría daño tisular. Últimamente se está acuñando el término de *inflammaging* (del inglés *inflammation+aging*) que postula que el envejecimiento, ya sea fisiológico o patológico sería debido a un aumento de las citoquinas proinflamatorias.

#### **2.2.2.1. Mediadores de inflamación**

Las **citoquinas** son glicoproteínas de bajo peso molecular que intervienen en la transmisión de señales de una célula a otra. Son secretadas en muy pequeñas concentraciones y para ejercer sus efectos se unen a receptores específicos en sus células blanco donde provocan modificaciones que llevan a la síntesis y liberación de mediadores secundarios.

Son liberadas por células inmunitarias en la mayoría de los casos, pero también por células endoteliales o del parénquima de algunos órganos como el hígado, el tejido adiposo o los islotes de Langerhans pancreáticos. Aunque su función más importante es la regulación de la respuesta

---

inmunitaria tanto innata como adaptativa, también participan en fenómenos como la diferenciación y el crecimiento celular. Las citoquinas se liberan, en principio, de un modo limitado en el tiempo, es decir, mientras dure la respuesta inmunitaria. Poseen un marcado pleiotropismo ya que, con frecuencia tienen más de una acción biológica y pueden actuar sobre más de un tipo celular. Muchas citoquinas comparten efectos y además pueden generar la síntesis y liberación de otras citoquinas, habiéndose observado tanto efectos contrapuestos así como sinérgicos.

De forma general, las citoquinas se clasifican en citoquinas pro o anti-inflamatorias. Las principales citoquinas que actúan en la respuesta inflamatoria son: Interleuquina 1 beta (IL-1 $\beta$ ), Factor de Necrosis Tumoral Alfa (TNF- $\alpha$ ), Interleuquina 8 (IL-8), Interleuquina 12 (IL-12), Interleuquina 16 (IL-16) y los interferones. Todas ellas son pro-inflamatorias. IL-6 e IL-12, además, actúan en la inmunidad específica. Por otra parte también existen interleuquinas anti-inflamatorias como la interleuquina 10 (IL-10) y la interleuquina 4 (IL-4).

A continuación se muestra un resumen de las acciones de las citoquinas que hemos estudiado:

- ❖ Factor de necrosis tumoral alpha (TNF- $\alpha$ ) (del inglés *Tumor necrosis factor alpha*). Es considerado como la principal citoquina proinflamatoria. Se trata de un homotrímero de 17kD que pertenece a una superfamilia responsable de la activación de un grupo de receptores de membrana que incluye a Fas-ligando, activador del receptor del ligando del factor nuclear kB (RANK), CD40-ligando y el llamado ligando asociado a la activación de la apoptosis similar al TNF (TRAIL). Es un mediador potente de funciones inflamatorias e inmunitarias. Regula el crecimiento y la diferenciación de un

---

gran número de tipos celulares y es citotóxico para una gran variedad de células transformadas.

Los principales productores de TNF- $\alpha$  son las células del sistema retículo-endotelial, principalmente los macrófagos. Sin embargo, se ha demostrado que otras células como linfocitos T y B, células polimorfonucleares, células cebadas, células endoteliales, queratinocitos etc también pueden secretarlo.

La lista de estímulos capaces de desencadenar la producción de TNF- $\alpha$  es numerosa. De modo resumido diremos que por un lado son casi todas las citoquinas proinflamatorias y otros factores endógenos relacionados (proteínas del shock térmico 60 y 70, PAF...) y por otro múltiples antígenos procedentes de microorganismos, fundamentalmente bacterias.

Se conocen varios receptores transmembrana para TNF- $\alpha$  (TNFR). De ellos, TNFR1 (p55) y 2 (p75) son los mejor conocidos, predominando TNFR1 en células de estirpe no hematopoyética.

Una vez unido TNF- $\alpha$  al TNFR1, se activa el dominio de muerte celular asociado al receptor, situado dentro de su citoplasma (TRADD). Posteriormente se activan y reclutan tres proteínas más: RIP (proteína 1 de interacción con TNFR1), el dominio de muerte celular de Fas (FADD) y dominio de muerte celular de Fas (FADD). En el caso de la unión TNF-TNFR2, se activa directamente TRAF2 que se asocia a TRAF1 (factor 1 asociado a TNF). Una vez reclutados los dominios de muerte, la cascada de acontecimientos es dual, ya que por un lado se puede inducir la apoptosis y por el otro, la respuesta inflamatoria. En la primera opción, los dominios de muerte interaccionan con las caspasas iniciadoras (principalmente caspasa 8). En la vía inflamatoria es predominante la activación del NF- $\kappa$ B y 2 vías

---

dependientes de kinasas: p38 y JNK (kinasa del dominio n-terminal de c-Jun).

Existe un mecanismo alternativo que potencia la acción del TNF- $\alpha$  y es la secreción aumentada por parte de los propios macrófagos tanto de TNFR1 como 2 en presencia de estímulos proinflamatorios (Mira y cols, 1999). Sin embargo, este mecanismo es concentración-dependiente, pero saturable, de modo que concentraciones excesivas de receptores solubles pueden bloquear los efectos proinflamatorios y proapoptóticos del TNF- $\alpha$ .

- ❖ Interleuquina 1 (IL-1 $\beta$ ): Se produce en grandes cantidades como respuesta a infecciones o cualquier tipo de lesión o estrés y es un mediador clave en la respuesta inflamatoria ocasionando fiebre, neutrofilia y producción de proteínas de fase aguda. Es producida por la práctica totalidad de las células del sistema inmunitario; además, gran parte de las células de los epitelios de mucosas, células estromales como los fibroblastos, queratinocitos o islotes de Langerhans pancreáticos pueden secretarla.

Del mismo modo que en el caso del TNF- $\alpha$ , la variedad de estímulos inductores es enorme, si bien de nuevo estímulos exógenos procedentes de microorganismos (LPS, ácido lipoteicoico, cimosán...) son los más potentes. Dentro de los mediadores endógenos relacionados, destacan tanto el TNF- $\alpha$  como la propia IL-1 $\beta$  y el factor estimulante de colonias granulocítico/monocíticas (GM-CSF).

Se conocen dos receptores principales para IL-1 $\beta$ : IL-1RI e IL-1RII. No se conoce exactamente la función biológica del receptor II ya que sus dominios intracelulares no parecen transmitir ninguna señal biológica. En cambio los dominios

---

intracitoplásmicos del receptor I sí lo hacen, así, se postula una misión contrarreguladora del receptor II. Como en el caso del TNF- $\alpha$ , ambos tipos de receptores pueden ser secretados como formas solubles, de modo que cuando alcanzan altas concentraciones pueden aminorar los efectos de IL-1 $\beta$ .

La región intracelular de IL-1 $\beta$  pertenece al grupo de los llamados “Toll-like receptors” (TLR), de gran similitud estructural. Este grupo de receptores juega un papel decisivo en la respuesta celular durante la respuesta inflamatoria ya que median en la traducción de estímulos originados tanto por antígenos microbianos directamente como por otros mediadores. El dominio intracitoplasmático del IL1-R activa, con la colaboración de la proteína MyD88, a la kinasa asociada a ese receptor (IRAK), quien es liberada tras fosforilarse. De este modo activa al llamado “factor 6 activado por el receptor del TNF- $\alpha$ ” (TRAF6), desencadenando la transcripción de NF $\kappa$ B y activando la cascada de proteín-quinasas sensibles a mitógenos (MAP-quinasas) (Rao y cols, 2005)

- ❖ Interleuquina 2 (IL-2): Producido en células T. Estimula el crecimiento y la diferenciación de células T, células B y NK. Tiene un papel muy importante en el desarrollo de las respuestas inflamatorias crónicas humorales y celulares.
  
- ❖ Interleuquina 6 (IL-6): Producida por fibroblastos, células endoteliales, monocitos y tejido adiposo. El papel más importante de esta citoquina es controlar la producción hepática de proteínas inflamatorias como CRP y fibrinógeno. Es una de las citoquinas inflamatorias implicadas en la patogénesis

---

de la resistencia a insulina. Existen estudios en los que se muestra que esta citoquina se encuentra aumentada en estados de hiperinsulinemia. Además en músculo esquelético IL-6 aumenta la sensibilidad a la insulina, esto sugiere que el efecto de esta citoquina es tejido-dependiente.

❖ Interleuquina 4 (IL-4): Se produce en mastocitos, células estromales de la médula ósea y células T. Es una citoquina muy pleiotrópica y ejerce numerosos efectos en diferentes tipos celulares, promueve la diferenciación de linfocitos T a células Th2 e impidiendo la formación de Th1. Posee efectos inmunosupresores inhibiendo la producción de determinados mediadores inflamatorios. También afecta a células fuera del sistema inmunitario como células endoteliales y fibroblastos.

❖ Interferón  $\gamma$ : Existen tres tipos de interferones: el tipo I comprende a su vez 18 subtipos (14 isoformas del subtipo  $\alpha$  y los subtipos  $\beta, \omega, \epsilon, \text{ y } \kappa$ ) y utilizan los receptores de membrana IFNAR 1 y 2. El tipo II corresponde al interferón  $\gamma$  (IF-  $\gamma$ ) y el tipo III, recientemente descubierto corresponde al tipo  $\lambda$ .

En la mayoría de las ocasiones, la producción de interferones se desencadena tras la liberación de otras citoquinas (IL-1 $\beta$ , IL-2, TNF- $\alpha$ , CSF...), principalmente como respuesta a infecciones virales, aunque ambas formas son activas frente a tumores. Tanto los linfocitos T como los B pueden producirlos, así como las células NK, los macrófagos, células endoteliales, fibroblastos, osteoblastos... En condiciones normales sus órganos excretores principales son el hígado y el riñón.

---

Los efectos biológicos principales del interferón son la producción de otros mediadores (principalmente IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ ) así como la generación de estrés oxidativo a través de la activación de la nitróxido-sintetasa inducible. Es una citoquina “predominantemente mediadora” ya que es capaz de desnivelar la balanza celular de la respuesta inflamatoria, pero también “efectora” ya que desencadena por sí misma fenómenos biológicos que desencadenan en la muerte celular.

La vía de señalización intracelular del INF- $\gamma$  es una de las mejor estudiadas y es compartida por otros mediadores. Este mediador tiene un receptor de membrana con dos subunidades:  $\alpha$ , de reconocimiento y unión al interferón, y  $\beta$ , que inicia la señal intracelular. El primer paso tras la unión al receptor es la activación de la vía de las JAK kinasas (Griffith y Stuehr, 1995). El segundo paso lo constituye un complejo íntimamente relacionado con las JAK, las proteínas STAT (signal transduction with activation of transcription). Éstas forman homodímeros al ser activadas por la subunidad  $\beta$  del receptor del interferón que a su vez había sido activada/fosforilada por las JAK. Los dímeros se traslocan al núcleo donde se unen a regiones del ADN promotoras de genes que transcriben otras citoquinas, entre ellas, el propio INF- $\gamma$

- ❖ Interleuquina 10 (IL-10): Clásicamente se la ha considerado, junto con IL-4 e IL-13, como una citoquina inhibidora o antiinflamatoria. De hecho, la IL-10 fue denominada en un primer momento como “factor inhibidor de la síntesis de citoquinas”. Sintetizada fundamentalmente por la rama de la respuesta inmunológica dependiente de los linfocitos Th2, regula negativamente la producción de IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-8,

---

IL-12 y GM-CSF ante situaciones de respuesta inmunitaria innata. Cuando predomina la inmunidad celular, también disminuye la producción de IF- $\gamma$ , IL-2 e IL-12. A su vez, el IF- $\gamma$  puede inhibir la producción de IL-10.

La interacción entre IL-10 e IF- $\gamma$  está bien estudiada, se sabe que IL-10 bloquea la fosforilación de un residuo tirosina de la proteína STAT1 $\alpha$  necesaria para la ejecución de los efectos de IF- $\gamma$  a nivel intracelular. Ejerce muchas actividades inmunomoduladoras y estimula e intensifica la proliferación de células B, timocitos y mastocitos.

### **2.2.3. Factor de transcripción nuclear NF $\kappa$ B**

NF $\kappa$ B (del inglés *Nuclear Factor-Kappa B*) fue propuesto por Leonardo y Baltimore en 1989. Es un factor de transcripción pleiotrópico sensible a varios estímulos, especialmente a ROS (Bowie and O'Neill., 2000). Está implicado en procesos de diferenciación, apoptosis (Zhang y Herman, 2002; Chung y cols, 2002; Rodriguez y cols, 2007; Baeza y cols, 2009) y crecimiento (Wickens, 2001) además de jugar un papel importante en los procesos inflamatorios y en la respuesta inmune, regulando muchas de las moléculas implicadas en ellos.

NF $\kappa$ B es una proteína heterodimérica compuesta por las diferentes combinaciones de los miembros de la familia de factores de transcripción Rel. Se compone de homodímeros y heterodímeros de cinco miembros de la familia Rel incluyendo NF $\kappa$ B 1 (p50), NF $\kappa$ B 2 (p52), p65, Rel B y Rel C. Todas las proteínas Rel contienen una región conservada N-terminal, llamado RHD (del inglés *Rel Homology Domain*), esta parte es la que contiene el dominio de unión al DNA, mientras que el dominio de

dimerización está localizado en la región C-terminal de la RHD. Al final del extremo C-terminal se encuentra el NLS (del inglés *Nuclear Localization Signal*), que es esencial para el transporte de complejos activos de NFκB en el núcleo. Dependiendo de los dímeros que se formen, la función de este factor de transcripción puede ser anti o pro-apoptótica a la vez que anti o pro-inflamatoria. Cuando NFκB está inactivo se encuentra en el citoplasma de las células unido a proteínas inhibitorias (IκBs) o precursores inactivos como p100 y p105 (Pereira y Oakley, 2008) En respuesta a un estímulo externo o interno, se activan proteínas quinasas que pueden activar IκB kinasas (IKKs), IKKα e IKKβ, que fosforilan a las IκBs las cuales son ubiquitinadas y degradadas en los proteasomas. A partir este momento, NFκB se trasloca al núcleo de la célula donde activa la transcripción de diversos genes especialmente de tipo inflamatorio (Yamamoto y Gaynor, 2001). Mediante un sistema de retroalimentación negativa, la activación de NFκB induce la transcripción de genes IκB para así limitar la actividad de NFκB (Sun y cols, 1993; Brown y cols, 1993). Tanto IKKβ como NFκB están relacionados con procesos de resistencia a insulina y diabetes tipo 2 (Yuan y cols, 2001; Arkan y cols, 2005).

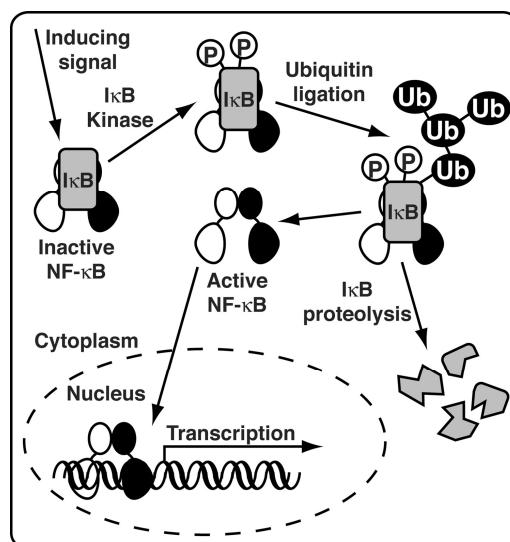


Figura 3. NFκB se encuentra en el citosol, unido a IκB (proteína inhibitoria), formando un complejo inactivo. En respuesta a un estímulo, se activa el complejo IκB quinasa (IKK), que consta de varias subunidades que fosforilan al complejo IκB. Este IκB fosforilado es reconocido por una

---

ubiquitina proteína ligasa E3 específica que produce su poliubiquitinación. El proteosoma 26S lo reconoce y se produce la proteólisis, dejando a NFκB libre y activo que se transporta del citosol al núcleo, ligándose específicamente a los promotores de genes específicos, activando su transcripción.

### 2.2.3.1 NFκB y envejecimiento

Diversos estudios llevados a cabo en roedores han demostrado que con el envejecimiento se da un aumento de la actividad de este factor de transcripción. Muchos son los investigadores que han estudiado el efecto del envejecimiento en la regulación de NFκB. Existen datos que demuestran que la actividad transcripcional de NFκB aumenta con el envejecimiento en todos los tejidos. Helenius y cols. (1996) encontraron que el corazón, hígado, riñones y cerebro de roedores viejos expresan mayores niveles de NFκB que los animales jóvenes. Adler y cols (2007) muestran que la unión de este factor de transcripción al DNA aumenta con la edad en piel, corazón, bazo, riñones e hígado de ratones. El modelo preciso de cómo el envejecimiento afecta a la activación de NFκB aún no se conoce. Varios genes inflamatorios están activados por NFκB, por ejemplo, citoquinas proinflamatorias como IL-1β (Goto y cols., 1999), IL6 y TNFα, así como enzimas proinflamatorias como ciclo-oxigenasa 2 (COX-2) y la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) (Taylor y cols., 1998). El sistema NFκB actúa como un sensor citoplasmático contra cualquier estrés ya sea externo o interno como estrés oxidativo, hipoxia... El estrés oxidativo provocado por radicales libres es un ejemplo clásico asociado con el proceso de envejecimiento (Mann y Oakley, 2005; Chung y cols, 2006). Los efectos nocivos de las ROS y RNS dependen de su concentración y del microambiente en el que son liberadas. La sobreproducción o la producción incontrolada de estas especies reactivas son un factor causal

---

muy importante en el desarrollo del proceso inflamatorio (Hakim, 1993). Las especies reactivas de oxígeno (ROS) están involucradas en la activación de NFκB inducida por citoquinas pro-inflamatorias como TNF-α e IL1β (Stancovski y Baltimore, 1997).

### **2.2.3.2. Sirtuinas, factores FoxO y NFκB**

La vía del NFκB media la respuesta inmune del invasor y del huésped. La inmunidad innata es la forma de defensa más primitiva de los organismos multicelulares y es probable que el sistema del NFκB se desarrollara de manera simultánea a ésta. Los receptores Toll like (TLRs del inglés *Toll like receptors*) son la parte mejor conservada que se encuentra en el sistema de defensa de los mamíferos. La vía de señalización de estos TLRs está muy bien estudiada (Helenius y cols, 2001). Brevemente, la vía principal de los TLRs está unida al sistema de NFκB mediante diferentes proteínas. IKKβ kinasa regula la activación de NFκB mediada por señales inflamatorias. Muchos receptores de citoquinas tienen interrelaciones con el sistema de NFκB potenciando la respuesta inflamatoria. No es tan importante el NFκB por sí mismo como los productos génicos a los que da lugar. Hay autores que señalan que genes como Sirtuinas y los factores FoxO pueden suprimir la señalización de NFκB y de esta manera retrasar el proceso de envejecimiento y prolongar la vida.

Las sirtuinas son enzimas deacetilasas dependientes de NAD<sup>+</sup>, directamente relacionadas con las histonas y muchos factores de transcripción como p53, la familia FoxO y PGC-1α (Rodgers y cols, 2005; Lagouge y cols, 2006; Sano y Schneider, 2005). Además participan en el mantenimiento de la estabilidad genómica, en silenciamiento y en la reparación del DNA. Tienen un papel importante en la gluconeogénesis y en la movilización lipídica (Finck y Kelly, 2007) y todos los miembros de la

---

familia en mamíferos juegan un papel muy importante en la longevidad y el metabolismo relacionándose con muchas enfermedades asociadas al envejecimiento como la diabetes, el síndrome metabólico y enfermedades neurodegenerativas (Dasgupta y Milbrandt, 2007; Picard y cols, 2004; Sun y cols, 2007). SIRT1 es la más estudiada en mamíferos, ésta tiene un papel central en la regulación del metabolismo y supervivencia (Dasgupta y Milbrandt, 2007). Yeung y cols en 2004 muestran que SIRT 1 se une físicamente a la proteína p65/RelA y lo deacetila inhibiendo la activación de este componente. Esto demuestra que SIRT1 es un potente inhibidor intracelular de la transcripción de NFkB (Yeung y cols, 2004).

Los factores FoxO regulan la resistencia al estrés, el ciclo celular, el balance metabólico y la longevidad (Greer y Brunet, 2005). La vía de señalización de estos factores tiene un papel importante en la regulación de la respuesta inmune de los mamíferos. Lin y cols en 2004 demostraron que ratones knockout para FoxO3A desarrollan enfermedades asociadas con la respuesta inflamatoria en muchos tejidos. De hecho, esta inflamación multisistémica inducida por la pérdida de FoxO3A podría inhibir la activación de NFkB (Lin y cols, 2004).

Los factores de longevidad pueden suprimir el proceso de activación de NFkB asociado con el envejecimiento. SIRT1 inhibe la activación de NFkB y la respuesta inflamatoria, a la vez que induce la señalización de los factores FoxO los cuales inhiben el sistema NFkB. Esta interacción entre señales nos da unas bases muy interesantes para dilucidar la función de los genes de longevidad que, según parece, aumentan la esperanza de vida mediante la inhibición de la vía del NFkB.

En resumen podemos afirmar que la activación de NF-kB conduce a la inducción de múltiples genes que regulan el sistema inmune y la respuesta inflamatoria. Además NFkB tiene un papel importante en el

control de la regulación de la proliferación celular y la apoptosis (Wickens, 2001). Por todo esto, en la actualidad NFκB está considerado como uno de los factores de transcripción claves en el proceso de envejecimiento y aunque no se conocen de manera precisa los mecanismos por los que toma una u otra función, ésta sería determinada por la naturaleza del estímulo.

En la Figura 4 se representa un resumen de los cambios bioquímicos y moleculares asociados a la respuesta inflamatoria:

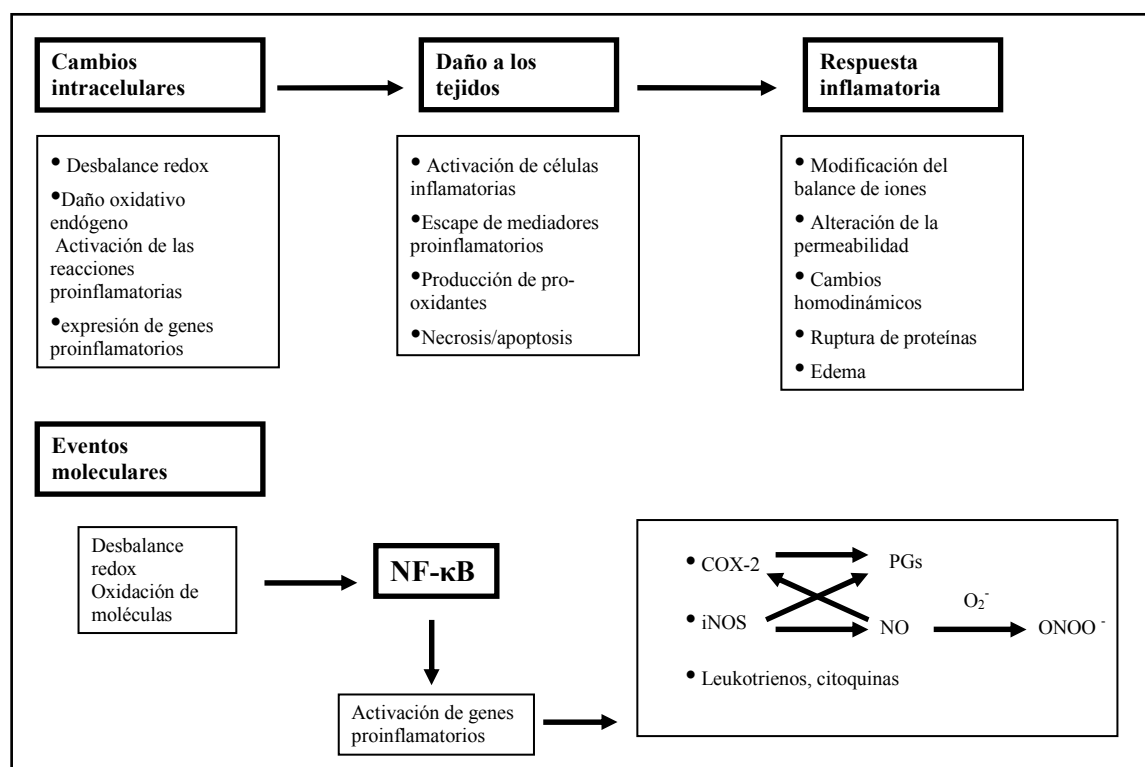


Figura 4. Cambios bioquímicos y moleculares asociados a la respuesta inflamatoria

---

## 2.3. APOPTOSIS

### 2.3.1. Concepto e importancia del proceso de apoptosis

El proceso de apoptosis fue descrito por primera vez por Curri en 1972 (Kerr et al., 1972), la apoptosis, también denominada muerte celular programada, constituye una forma fisiológica de “suicidio celular” programado. Es un mecanismo esencial en el mantenimiento de la homeostasis. Se observa prácticamente en todas las células vivas y su desarrollo se traduce en una serie de cambios moleculares que tiene una contrapartida morfológica evidenciable.

Los signos morfológicos de apoptosis o “muerte celular programada” son: plegamiento de la membrana celular con formación de vesículas, condensación cromatínica, fragmentación nuclear y aparición de los llamados cuerpos apoptóticos o apoptosomas.

La apoptosis es un fenómeno fisiológico que interviene tanto en la destrucción celular durante la embriogénesis, necesaria para la implantación, organogénesis e inducción al desarrollo, como en involución hormono-dependiente en individuos adultos, muerte celular inducida por linfocitos T, destrucción de células inmunes autorreactivas etc. Aunque también interviene en procesos anormales como la atrofia patológica hormono-dependiente, atrofia de órganos tras obstrucción ductal, muerte neuronal, muerte celular secundaria a enfermedades virales, muerte celular tras estímulos que a mayores dosis causarían necrosis y como mecanismo implicado en la muerte celular debida al síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (S.I.R.S.), entre otros (Chang y Yang, 2000).

---

Los fallos en los mecanismos reguladores de la apoptosis muchas veces se traducen en la aparición de neoplasias, enfermedades autoinmunes y/o neurodegenerativas. En este aspecto, el proceso de envejecimiento implica la acumulación de daño celular y da lugar a la agregación de proteínas en las células, en particular, en células post mitóticas, lo cual indica que hay deficiencias en los procesos de autofagia y apoptosis. Hay estudios que demuestran que hay deficiencias en estos procesos durante el envejecimiento (Fadeel y cols, 1999b). El proceso de apoptosis es un arma de doble filo porque el incremento en marcadores antiapoptóticos podría degenerar en un cáncer pero, por otro lado, la resistencia a la apoptosis en células que no están en mitosis previene la eliminación y renovación de células de muchos tejidos.

### **2.3.2. Mecanismos moleculares de regulación de la apoptosis**

No se conocen completamente los mecanismos de regulación de la apoptosis pero se ha demostrado la participación de dos familias: las caspasas y las proteínas de la familia Bcl-2.

#### **❖ La familia Bcl-2**

Con el nombre de genérico de Bcl-2 se denomina a una superfamilia de proteínas producto de genes estrechamente relacionados con el control del ciclo celular.

La superfamilia Bcl-2 tiene 2 subgrupos diferenciados en su efecto sobre la apoptosis, ya que unas son inductoras (Bax, Bad, Bak, Bcl-Xs, Bid, Bim...) y otras inhibidoras (Bcl-2, Bcl-Xl). Confusamente se denomina a la superfamilia con el nombre de uno de sus miembros. Si bien, diremos que

---

en general, cuando se hace referencia a Bcl-2 se señala a la variante antiapoptótica.

Tras una señal de daño o estrés celular la respuesta del complejo Bcl-2 es dual: Por un lado, las moléculas pro-apoptóticas tienden a situarse alrededor de la membrana mitocondrial, que es donde constitutivamente se encuentran las anti-apoptóticas. Posteriormente, se produce una heterodimerización al unirse variantes pro y anti-apoptóticas, como resultado, se desencadena la cascada de la apoptosis fundamentalmente por la vía mitocondrial en el caso de que sean mayores las concentraciones de las formas pro-apoptóticas. Por el contrario, altas concentraciones de variantes anti-apoptóticas confieren a la célula una resistencia a la muerte celular programada que puede llevar a persistencia incluso en presencia de alteraciones nucleares que en condiciones normales significarían su eliminación por parte del propio organismo.

El papel principal de las proteínas Bcl-2 es el de controlar la homeostasis mitocondrial: en determinadas condiciones se forman canales o poros en la membrana externa mitocondrial, permitiendo la salida de componentes mitocondriales, entre ellos el citocromo c, que además de desempeñar un papel fundamental en la cadena de transporte electrónico, es un componente esencial de la activación de la caspasa-9 en el citosol.

#### ❖ Citocromo C

El citocromo C es un polipéptido de 104 aminoácidos de 15kDa que está implicado tanto en la fosforilación oxidativa, como en la apoptosis (Evans y Scarpulla, 1988). Presenta escasas variaciones estructurales entre mamíferos, de hecho, el 91% de la secuencia de aminoácidos en el hombre coincide con la que se ha encontrado en roedores (Evans y Scarpulla, 1988). Tiene un papel decisivo en la fosforilación oxidativa actuando como

---

transportador de electrones. Por otro lado puede salir al citoplasma en respuesta a señales pro-apoptóticas. En el citoplasma participa en una de las múltiples vías de la activación de la cascada de las caspasas (Gross y cols, 1998; Slee y cols, 1999). Los fenómenos que potencian las señales pro-apoptóticas no son del todo conocidas pero se ha sugerido que en respuesta a señales pro-apoptóticas que involucran al citocromo C se produce una traslocación de proteínas de la superfamilia Bcl-2, concretamente Bax y Bad, hacia la membrana mitocondrial, donde generan inestabilidad estructural (Jurgensmeier y cols, 1998). Como resultado, el citocromo C sale al citoplasma (Jurgensmeier y cols, 1998) donde se une al factor-proteasa activador de la apoptosis 1 (Apaf-1), d-ATP, Apaf-3 y pro-caspasa 9 (Jurgensmeier y cols, 1998). Así, la caspasa 9 es activada y subsecuentemente las caspasas 3, 6 y 7 con el resultado final de la muerte de la célula (Slee y cols, 1999; Kuida y cols, 1998).

#### ❖ Las caspasas

Son una familia de cisteína-proteasas “aspartato-específicas” que poseen cisteína en su centro activo y se sintetizan como zimógenos, es decir, precursores enzimáticos inactivos. Tienen el papel principal en lo que a la destrucción celular se refiere; esto es, son el verdadero mecanismo efector. Actúan en cadena, de tal manera que se distinguen 2 grandes grupos: caspasas activadoras y caspasas efectoras. Las primeras serían sustrato de los numerosos estímulos tanto iniciales como intermedios de la apoptosis y activarían a las segundas, verdaderas encargadas de la destrucción celular mediante un mecanismo, muy similar a la cascada del complemento.

Se han identificado gran número de caspasas, pero no todas juegan un papel determinante en la apoptosis. De hecho, las caspasas 1 y 5 son predominantemente “inflamatorias”, mientras que las caspasas 3, 8 y 9 son las más características de los fenómenos de muerte celular programada.

---

Las caspasas presentan claras similitudes en su secuencia de aminoácidos, estructura y sustratos. Se presentan como proenzimas de 30-50 kDa con tres dominios regulares: Nterminal, una subunidad mayor de 20kDa y otra menor de unos 10kDa. Se secretan como zimógenos inactivos y aquellas relacionadas con la apoptosis pueden clasificarse como ya se ha comentado, en activadoras (2,8,9,10) y efectoras (3, 6, 7). La diferencia fundamental está en que las activadoras poseen grandes “pro-dominios” N-terminal que emplean para interacciones proteína-proteína. El modo de interactuar de estos dos grupos es en cascada (Cohen, 1997). De esta manera, la activación de las caspasas activadoras se traduce en interacción con las efectoras cuando son zimógenos inactivos y su ulterior activación. La activación de las caspasas efectoras conlleva a cambios moleculares y en definitiva, funcionales y morfológicos típicos de la apoptosis: detención del ciclo celular, alteraciones en la reparación del ADN, inhibición del “factor inhibidor de la apoptosis” (XIAP) y desestructuración del citoesqueleto.

Se han descrito cuatro vías fundamentales para la activación de la cascada de las caspasas: vía mitocondrial, vía relacionada con los receptores asociados a “dominios de muerte celular”, vía de la granzima B y vía relacionada con el retículo endoplasmático (Hail y cols, 2006).

### **2.3.3. Vías de inducción de la apoptosis**

#### **❖ Vía mitocondrial (o intrínseca)**

Esta ruta se activa frente a la privación de factores tróficos o frente al daño celular (como por ejemplo, el provocado por la exposición a las radiaciones ionizantes a lo largo de la vida, como en el caso del envejecimiento).

---

Tanto los agentes neoplásicos como las radiaciones ultravioleta, la pérdida de estímulos tróficos en forma de factores de crecimiento, el daño en el ADN o la respuesta inflamatoria sistémica pueden alterar las características biofísicas de las diversas membranas biológicas, principalmente su potencial de electroquímico. Una de las más sensibles a este daño es la membrana mitocondrial. Las alteraciones en el potencial de membrana se traducen en una alteración de la permeabilidad de membrana. Esta “permeabilidad” facilita la salida de proteínas de la mitocondria al citosol, en este caso del citocromo C que enseguida forma un heptámero con forma de rueda tras la unión a Apaf-1, Apaf-3, procaspasa 9 y d-ATP para la activación de la caspasa 9, iniciadora de la activación de las caspasas efectoras 3, 6 y 7.

❖ **Vía de los receptores de muerte (o extrínseca)**

En esta vía se requiere la participación de un grupo de receptores de membrana que tienen acoplados dominios intracitoplásmicos llamados “de muerte celular” (Mirkes, 2002). Por lo general pertenecen a la superfamilia de los receptores para el TNF- $\alpha$  (RTNF) y los mejor conocidos son el TNFR, los receptores “NF-related apoptosis inducing ligand” y el sistema Fas/ Fas-ligando (CD 95). Cuando estos receptores se unen a sus ligandos se producen una serie de cambios conformacionales que se traducen en señales intracelulares pro-apoptóticas.

La producción de TNF- $\alpha$  por parte de las células inmunitarias en el contexto de la respuesta inflamatoria inespecífica, lleva a la unión de esta molécula a su receptor cuyos dominios de muerte celular se activan. La activación de los dominios de muerte celular en asociación con parte del sistema Fas y con proteínas intracelulares como RIP y RAIP acaban por activar la cascada de las caspasas.

---

El sistema Fas/CD 95 ha sido ampliamente estudiado y es una de las vías principales en la destrucción celular vía apoptosis inducida por las células T CD8. Se da la autodestrucción de los propios linfocitos T tras realizar sus funciones y la destrucción de células inflamatorias en sitios “inmunológicamente selectos”. La unión Fas-CD 95 activa su dominio de muerte (FADD), que a su vez induce el reclutamiento de la pro-caspasa 8 y la formación del “Death Inducing Signaling Complex” (CD 95 + FADD + pro-caspasa 8). De este modo la pro-caspasa 8 pasa a caspasa 8 y se inicia la cascada efectora (Pinkoski y cols, 2001).

En cuanto a los “TNF-related apoptosis inducing ligand”, se trata de un sistema muy similar a Fas-APO1-CD95. Sus receptores son DR4 y DR5, se expresan constitutivamente y poseen dominios efectores que no necesitan adaptadores tipo FADD. Debido a que existen otras proteínas ubicuas que competirían con DR4 y 5 por TRAIL (DcR1 y 2) se postula que podrían tener un significado antiapoptótico.

El nexo entre la vía mitocondrial y la relacionada con estos receptores se cree que podría estar en relación con la activación de la proteína Bid (de la superfamilia Bcl-2) que es activada por la caspasa 8 y que, una vez traslocada a la mitocondria, activa a otra proteína de la superfamilia Bcl-2 llamada Bax que facilita la salida del citocromo C al citosol.

Por otro lado, XIAP es un miembro de la familia de inhibidores de apoptosis (del inglés *inhibitor of apoptosis (IAP)*) el cual ejerce su acción inhibiendo la actividad de las caspasas especialmente uniéndose a las caspasas 3, 7 y 9. Además a elevadas concentraciones es capaz de estabilizar la membrana mitocondrial inhibiendo la salida de Smac/DIABLO, HtrA2/Omi... (Holcik y cols, 2001; Bratton y Cohen, 2003). Hay estudios que demuestran que XIAP protege los islotes pancreáticos y mantiene la viabilidad celular mediante un aumento en la expresión de proteínas antiapoptóticas (Eberhardt y cols, 2000; Simons y cols, 1999; Nomura y cols, 2003)

---

❖ **Vía de la granzima B**

Es la vía empleada predominantemente por las células NK y los linfocitos T CD8, responsables, entre otras, de la destrucción de las células infectadas por virus y neoplásicas.

Para cumplir dicha misión tienen dos mecanismos de inducción de la apoptosis en la célula a destruir:

- ❖ a través de la vía ya descrita que emplea el receptor Fas
- ❖ mediante exocitosis de gránulos que contienen perforinas y granzima B (GB).

En realidad, la perforinas crean poros en la membrana celular que facilitan el paso de la GB. La GB es otra serín proteasa con gran similitud con las caspasas en lo que a su especificidad por el sustrato se refiere (Berthou y cols, 1998). Tiene 2 mecanismos de acción principales que son complementarios: uno nuclear, que altera el ciclo celular al estimular la ciclina CdC283 y otro que en el citosol activa a la caspasa 3. Este segundo mecanismo necesita la presencia de cofactores mitocondriales como son Smac/ Diablo y Htra/ oni84 y puede ser neutralizado por Bcl-2 o bien puede activar la secuencia Bid-Bax ya descrita.

El efecto final consiste en la interacción con la enzima endonuclear topoisomerasa II que conlleva la fragmentación del ADN.

❖ **Vía relacionada con el retículo endoplasmático (RER)**

Como respuesta a las señales de estrés celular, el RER puede acumular moléculas proteicas en su interior, o bien alterar la estructura de otras que ya se encuentran en su superficie externa. En esta vía es de vital importancia la participación de la caspasa 12, localizada en la cara externa

de la membrana del RER. La caspasa 12 estaría, inicialmente, anclada como pro-caspasa 12 en la membrana del RER y sería activada por otra proteasa, la calpaína M, quien escindiría su predominio N-terminal y así la activaría (Lamkanfi y cols, 2002). Este mecanismo está todavía en discusión ya que en la especie humana la caspasa 12 es inactiva la mayoría de las veces (Lamkanfi y cols, 2002). Como la caspasa 9, la caspasa 12 también tiene un dominio de anclaje/reclutamiento, de tal manera que se postula que también podría unirse a moléculas como Apaf-1 para la formación de complejos pro-apoptóticos (Putchá y cols, 2003). Otra posibilidad es que la llegada de señales de estrés celular al RER induzca la traslocación hacia la membrana mitocondrial de la kinasa JNK quien fosforilaría a Bim, de la superfamilia Bcl-2, quien a su vez, a través de Bax, facilitaría la salida del citocromo C al citoplasma.

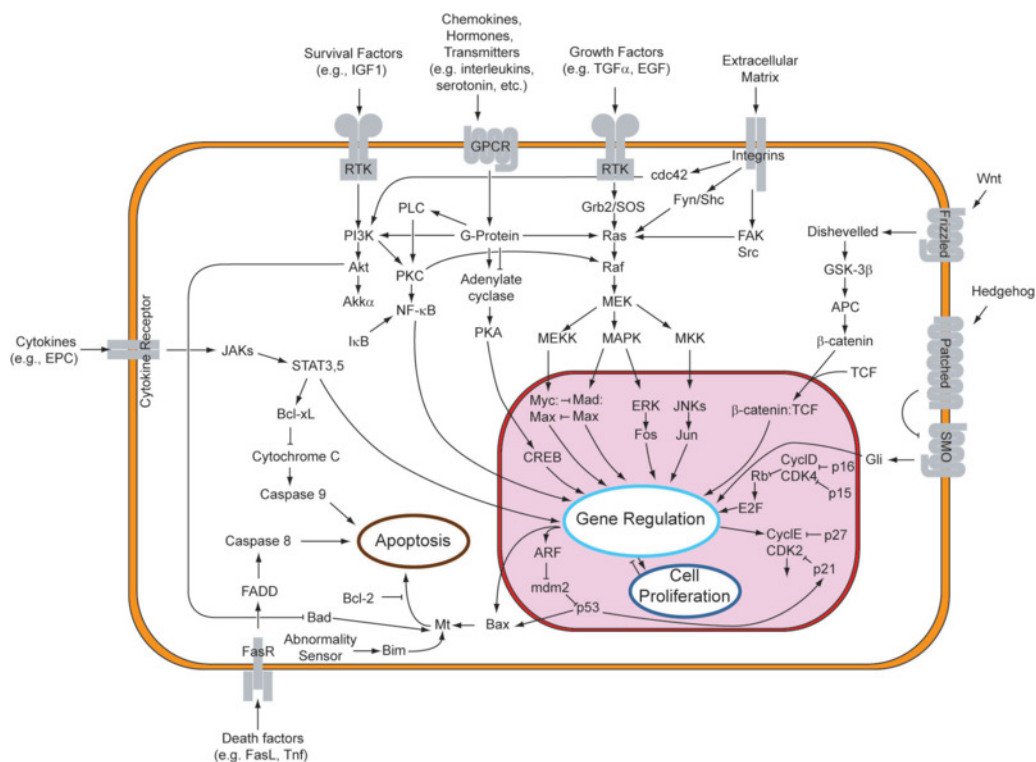


Figura 5 . Vías de la apoptosis

---

#### **2.3.4. Mecanismos de protección frente a la apoptosis**

Factores tróficos como IGF-I, insulina, EGF, PDGF o NGF tienen vías de señalización que previenen el desencadenamiento de la apoptosis a través de la fosfatidilinositol (PI) 3-quinasa. Además los factores de crecimiento inducen supervivencia a través de su habilidad para inducir la fosforilación de Bad (del Peso y cols., 1997), creando una zona de unión para la proteína adaptadora 14-3-3, de forma que una vez unida, Bad es incapaz de heterodimerizarse e inhibir el efecto de supervivencia de las proteínas Bcl-2 o Bcl-X<sub>L</sub>. Por otra parte AKT fosforila e inhibe la caspasa-9 humana. Otros trabajos indican que esta misma proteína actúa por encima de la caspasa-9, previniendo la salida del citocromo-c y, por lo tanto, manteniendo la integridad de la membrana mitocondrial. Los mecanismos moleculares por los que la proteína Ras protege frente a la apoptosis se han relacionado con la activación de diversas vías de señalización, como PI3-quinasa/AKT o como la ruta Raf/MAP-quinasa e incluso con la expresión de Bcl-2. Los trabajos que implican a la Ras en la inducción de la apoptosis son cada vez más numerosos y parecen sugerir la existencia de dos rutas de señalización distintas a partir de Raf, una anti-apoptótica (MEK/MAPK) y otra pro-apoptótica, hasta el momento desconocida. El balance de las dos vías estaría regulado por el suero y/o factores de crecimiento, de manera que en presencia de los mismos, el efecto anti-apoptótico de MEK/MAPK, predominaría frente a la señalización apoptótica en la que estarían implicadas Ras/Raf. Mientras que la ausencia de estos factores de crecimiento, potenciaría esta última vía, dando lugar a la muerte celular.

---

### 3. HORMONA DE CRECIMIENTO (GH)

La hormona de crecimiento (GH, del inglés *growth hormone*) es la hormona adenohipofisaria más abundante. En condiciones normales, la hipófisis humana contiene entre 5-10 mg de GH, lo que supone un 10% del peso de la glándula. Su principal acción es estimular el crecimiento corporal aunque, a diferencia de otras hormonas adenohipofisarias la GH carece de un órgano diana definido, siendo el crecimiento corporal, en gran medida, resultado de sus múltiples e importantes acciones sobre el metabolismo. Es sintetizada por las células somatotropas de la adenohipófisis, almacenada en vesículas en el citoplasma celular y secretada en forma de descargas puntuales. Es una hormona peptídica que consta de 191 aminoácidos y se libera de forma endocrina (Tresguerres, 2010).

#### 3.1. Secreción y regulación de la GH

La síntesis y secreción de GH están reguladas por el hipotálamo mediante dos neurohormonas: una de carácter estimulador, la hormona liberadora de la hormona de crecimiento (GHRH *de inglés Growth hormone-releasing hormone*) que estimula la secreción y otra de carácter inhibitor, la somatostatina (SS) que inhibe la secreción de GH. La liberación de estas neurohormonas a la circulación portal hipotálamo-hipofisaria ocurre de forma rítmica y alternante, lo que lleva a que la secreción de GH se produzca en forma de picos de secreción, que se originan por un aumento de la liberación de GHRH y una disminución de la liberación de SS. Otros factores tales como hormonas, neurotransmisores, factores metabólicos y otros neuropéptidos participan en el control de la secreción de GH. Alguno de ellos puede actuar directamente sobre la hipófisis pero la mayoría actúa sobre el hipotálamo regulando la liberación de GHRH y SS.

La secreción de esta hormona se produce de manera episódica con fases de brusca liberación separadas entre sí con periodos en los que no hay secreción. Este patrón de secreción es debido al vertido rítmico y alternante con un desfase de 180° de GHRH y SS a la circulación portal. Cada pico de secreción se corresponde con un aumento de la secreción de GHRH junto a una disminución de secreción de SS, y viceversa. Este patrón parece ser fundamental para la acción de la hormona ya que impediría la aparición de fenómenos de desensibilización en las células diana.

El patrón de secreción de la GH presenta una gran variabilidad con pulsos de mayor amplitud y menores niveles entre pulsos en varones. Estos pulsos de mayor tamaño se dan en la pubertad, etapa en la cual empiezan a disminuir progresivamente. En ancianos la secreción está muy disminuida considerándose uno de los factores responsables de los cambios somáticos que se producen en el envejecimiento.

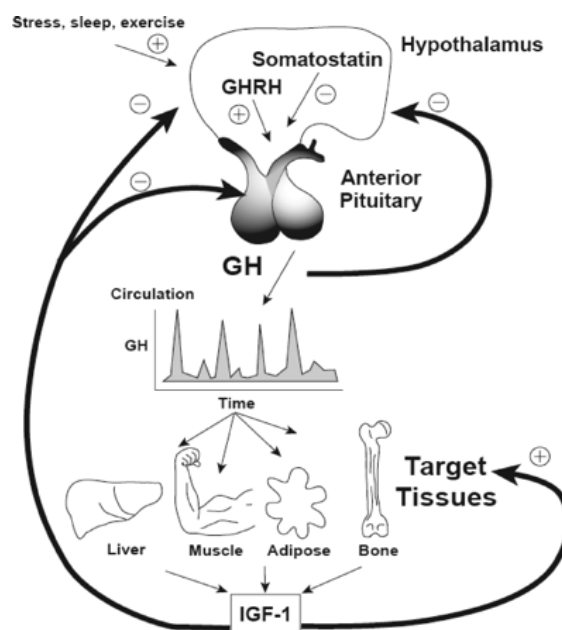


Figura 6. Regulación de la secreción de GH

---

Además la secreción de GH está regulada de manera periférica, así se estimula por el estrés, el ejercicio físico, la hipoglucemia y, algunas drogas, como la bromocriptina; mientras que el aumento de la glucosa sanguínea inhibe su secreción. El descenso de ácidos grasos libres (AGL) estimula la secreción de GH y anulan su pulsatilidad. El aumento de la glucosa disminuye la secreción de GH y viceversa.

### **3.2. Receptor y señalización de la GH**

Los efectos de la GH están mediados a través de la unión a su receptor que pertenece a la superfamilia de los receptores hematopoiéticos (Derfalvi y cols., 1998) en la que también se incluyen las interleuquinas IL-3, 4, 6, 7 y la cadena  $\beta$  del receptor de la IL-2 (Bazán, 1990). La unión de una molécula de GH al dominio transmembrana del receptor implica la formación de un complejo que activa la proteína tirosina Janus Kinasa (JAK-2) fosforilando un transductor de señal y activando las proteínas STAT que son las que controlan la transcripción de muchos genes (Postel-Vinay y Finidori., 1995). Además la activación de JAK-2 por la unión de la GH a su receptor conlleva la fosforilación de muchas otras proteínas intracelulares como Ras, Raf, serina/treonina kinasas, PI-3 kinasa, Akt/proteína kinasa B, MAPK (proteína kinasa activada por mitógeno), PLC (fosfolipasa C) y PKC (proteína kinasa C). Todas ellas tienen un papel importante en el mecanismo de señalización de la GH (Moutoussamy y cols., 1998)

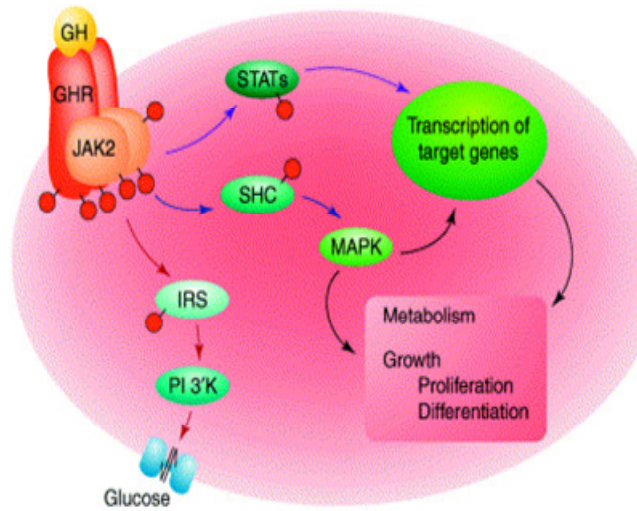


Figura 7. Receptor y señalización de la GH

### 3.3. Efectos de la GH

A diferencia del resto de hormonas, la GH no tiene un órgano diana único sino que ejerce sus acciones sobre todo el organismo.

Sobre el sistema esquelético su principal función es el mantenimiento de un crecimiento corporal armónico y la consecución de una talla adulta normal. Estos efectos se obtienen tanto por acción directa de la GH sobre los tejidos como a través del incremento de la síntesis de IGF-I (*insulin-like growth factor-I*), fundamentalmente en el hígado y en el hueso.

Sin embargo el efecto biológico más importante de la GH se produce sobre el metabolismo mediante sus acciones anabolizantes, lipolítica e hiperglucemiante.

Por último la GH también ejerce importantes efectos sobre el sistema inmunitario, la hematopoyesis, el sistema cardiovascular, el sistema nervioso, las gónadas, el equilibrio hidrosalino etc.

### 3.4. Factores de crecimiento tipo insulina (IGF)

Los factores IGF-I son pequeños péptidos que reciben este nombre por su similitud estructural con la insulina. Actúan en el organismo como

---

importantes reguladores del crecimiento y ejercen sus funciones mediante mecanismos endocrinos, paracrinos y autocrinos. Como sucede con otros factores de crecimiento, los IGF tienen una expresión ubicua y ejercen sus acciones sobre un gran número de órganos y tejidos. Los cambios que se observan a lo largo de la vida en los niveles plasmáticos de estos factores de crecimiento van en paralelo a los cambios observados en la secreción de GH que es el principal regulador de su síntesis, los estrógenos también son capaces de estimular su transcripción siendo responsables del incremento en los niveles producidos en la pubertad (Tresguerres, 2010).

### **3.5. Somatopausia**

Con la edad se produce una reducción progresiva de la producción de GH que conduce a una situación en la que los ancianos presentan una disminución de los niveles de GH e IGF-I con respecto a los individuos jóvenes, tanto en humanos como en animales de experimentación (Breese y cols, 1991; Corpas y cols, 1993; D'Costa y cols, 1993). La persistencia de la producción de GH, incluso tras la finalización del período de crecimiento prueba la importancia de los efectos metabólicos de dicha hormona. De hecho, varias de las alteraciones que aparecen en la vejez, como la disminución de la masa y fuerza muscular, el incremento del tejido adiposo, la reducción de la densidad mineral ósea y del grosor de la piel, se asemejan a las presentadas por los individuos con SDGHA, por lo que han sido relacionadas con la disminución de la producción de GH e IGF-I (Corpas y cols., 1993), llegándose a acuñar el término “somatopausia” para referirse a este fenómeno. Por tanto, podría considerarse el envejecimiento como una forma fisiológica de “déficit de GH del adulto” (Toogood y cols., 1996; Toogood y Shalet, 1998; Arce y Devesa, 2000).

---

## 4. MELATONINA

La melatonina es una molécula de al menos dos mil millones de años (Poeggeler y Hardeland., 1994; Macías y cols., 1999), que está presente en todos los animales y plantas con la misma estructura molecular. Se cree que la melatonina apareció con la misión fundamental de “neutralizar el efecto dañino del oxígeno” como productor de radicales libres, poseyendo un potente efecto antioxidante.

La melatonina o N-acetil-5-metoxitriptamina es una indolamina descrita por primera vez por McCord y Allen (1917) y aislada por Lerner y cols en 1958 a partir de extractos de la glándula pineal.

### 4.1. Síntesis y regulación de la secreción de melatonina

La melatonina se sintetiza a partir del triptófano (aminoácido aromático esencial). Esta biosíntesis tiene lugar en la glándula pineal y en otros tejidos productores de melatonina como la retina (Grace y cols., 1991), glándula lacrimal (Mhatre y cols., 1988), cuerpo ciliado del iris (Aimoto y cols., 1985), ovario (Itoh y cols., 1997), sistema inmune (Guerrero y Reiter., 2002), aparato digestivo (Bubenik., 1980; Vakkuri y cols., 1985a; Huether y cols., 1992; Tan y cols., 1999b) y el sistema portal hepático (Huether y cols., 1992).

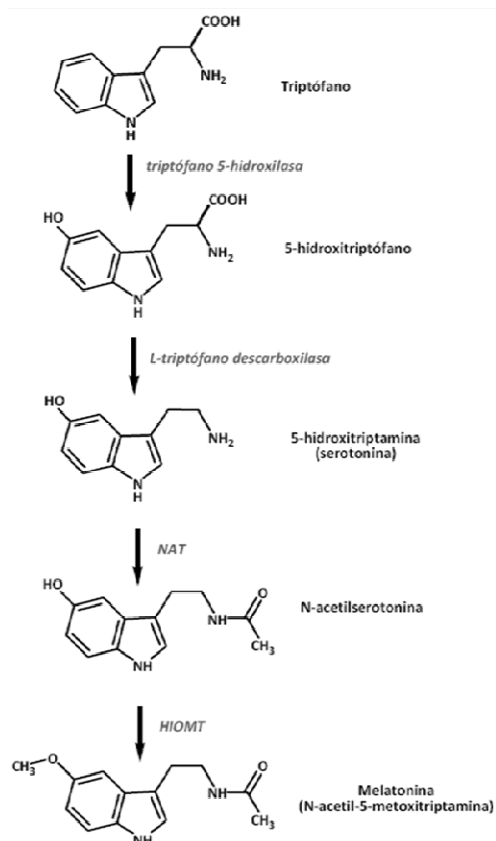


Figura 8. Biosíntesis de la melatonina a partir del triptófano. NAT: N-acetil-transferasa; HIOMT: hidroxiindol-O-metil transferasa

La actividad de la N-acetil-transferasa determina el ritmo pineal de producción hormonal. Puede regularse mediante la expresión génica o mediante la activación y estabilidad de la enzima (para revisión ver Hardeland., 2008).

La expresión de la enzima puede regularse por vía nerviosa controlada por el núcleo supraquiasmático del hipotálamo, el llamado **reloj biológico**.

#### 4.2. Mecanismo de acción de la melatonina

La melatonina es una molécula bastante liposoluble que atraviesa fácilmente por difusión simple la bicapa de la membrana del pinealocito. Esto da lugar a que el estímulo de la síntesis de melatonina en la glándula pineal eleva muy rápido sus niveles en plasma y en todos los

---

compartimentos del organismo (Reiter., 1991b). La melatonina es transportada unida a la albúmina (70%) y libre en plasma (30%). La vida media en plasma oscila entre 20 y 40 minutos (Illerova y cols., 1979; Vakkuri y cols., 1985b). De cualquier forma los niveles plasmáticos de melatonina están condicionados por el ciclo luz/oscuridad siguiendo un ritmo circadiano con concentraciones altas durante la noche y basales durante el día (Menéndez-Peláez y cols., 1987; Reiter., 1991a).

Los mecanismos de acción de la melatonina pueden dividirse en dos:

- ❖ Mediados por la unión a su receptor (de membrana o nuclear)
- ❖ Independientes de receptor (interacción con proteínas intracelulares y actividad antioxidante).

#### Receptores de membrana

MT1 y MT2 se encuentran acoplados a proteínas G inhibitoras y ejercen su acción principalmente mediante la inhibición de la adenilatociclasa haciendo que disminuya el AMPc intracelular, disminuyendo a su vez la actividad de la proteína quinasa A y fosforilando CREB. Los receptores MT1 se expresan especialmente en cerebro y en otras regiones del sistema nervioso central, vasculatura de ciertos órganos y células del sistema inmunitario (Martin y cols., 1982; Song y cols., 1997; García- Perganeda y cols., 1999). Los MT2 se encuentran en la retina y en otras estructuras cerebrales de mamíferos (Reppert y cols., 1996; Mor y cols., 1999)

---

### Receptores nucleares

Son proteínas localizadas en el interior del núcleo capaces de unirse a la región reguladora de algunos genes. Cuando estas proteínas se unen a su ligando específico se activan y son capaces de regular la actividad de la RNA polimerasa II necesaria para la expresión génica.

### Interacción con proteínas intracelulares

La unión de la melatonina a los sitios de unión no mediados por receptor como unión a:

- ❖ calmodulina cuya función es quelar calcio por lo que puede modular actividad de muchas enzimas.
- ❖ calreticulina diversas funciones como la actividad de las chaperonas, la homeostasis intracelular del  $\text{Ca}^{2+}$  y la regulación de la adhesión celular mediante integrinas.
- ❖ PKC es una quinasa de serina y treonina activada por  $\text{Ca}^{2+}$ . Fosforila diversos sustratos y modifica la estructura del citoesqueleto.

La unión de la melatonina a sitios de unión no mediados por receptor permite explicar por qué no se libera en grandes cantidades al torrente sanguíneo (aunque es capaz de atravesar las membranas biológicas) y aparece en mayor concentración en los tejidos que en el plasma (Hardeland., 2008).

### **4.3. Acciones antioxidantes de la melatonina**

La primera observación de que la melatonina tenía propiedades antioxidantes la realizaron Lanas y cols. en 1991. Después fue confirmada

---

por Tan y cols en 1993 (Tan y cols., 1993b) que demostraron que la melatonina neutraliza OH<sup>-</sup>.

Son miles los trabajos que demuestran la capacidad de la melatonina para reaccionar con los ROS. Su acción directa se debe a que la melatonina y alguno de sus metabolitos poseen la capacidad de depurar por sí mismos algunas especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno (Acuña-Castroviejo y cols., 2001; Reiter y cols., 2003b). Además la melatonina es capaz de estimular la actividad y expresión de otros sistemas antioxidantes dando lugar a la reducción de estrés oxidativo (Antolín y cols., 2002; Mayo y cols., 2002)

Estimula el ciclo del glutatión, aumentando la actividad de la GPx y GR, regulando así el balance GSSG/GSH (Pablos y cols., 1998; Martín y cols., 2000a). Además aumenta la producción de glutatión mediante

- ❖ estimulación de la  $\gamma$ -glutamato-cisteína sintasa, limitante en la ruta de síntesis de glutatión (Urata y cols., 1999).
- ❖ estimulación de la Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, encargada de generar NADPH requerido por la GR (Pierrefiche y Laborit., 1995).

La melatonina estimula otras enzimas antioxidantes como la SOD (Antolín y cols., 1996) y la catalasa (Coto-Montes y Hardeland., 1999; Acuña-Castroviejo y cols., 2001; Reiter y cols., 2003a). También inhibe enzimas generadoras de radicales libres como la aminolevulinato sintasa (Antolín y cols., 1996) y la NOS (Pozo y cols., 1994; 1997). La melatonina también ejerce una acción sinérgica con otros antioxidantes como las vitaminas E y C (Reiter y cols., 2003a).

Además de todo esto es un agente neuromodulador e inhibe la translocación del factor de transcripción NFkB al interior del núcleo (Chuang y cols., 1996).

---

#### 4.4. Melatonina y envejecimiento

La edad influye fuertemente en el ritmo circadiano de melatonina. Los recién nacidos y hasta los tres meses de vida producen cantidades muy elevadas de melatonina en relación con los adultos pero carecen de ritmo circadiano. Los niveles plasmáticos nocturnos y diurnos empiezan a diferenciarse al final del primer año de vida (Waldhauser y cols., 1993; Reiter., 1998). Durante la pubertad encontramos que hay una caída en los valores nocturnos de esta hormona. Este ritmo circadiano se mantiene hasta los 45-65 años, periodo en el cual decae progresivamente hasta igualarse los valores diurnos y nocturnos (Reiter., 1995b). El ciclo menstrual, la exposición solar, los fármacos ( $\beta$  bloqueantes), el ejercicio y el estrés son algunos factores que afectan al ritmo circadiano de melatonina (Ariznavarreta y cols., 2002)

---

## 5. HÍGADO

### 5.1. Generalidades

Debido a su situación anatómica y a sus múltiples funciones bioquímicas, el hígado tiene un papel central en el metabolismo. Es la central metabólica del organismo, regula los niveles de metabolitos en el plasma para asegurar el adecuado suministro de los mismos al cerebro, músculo y otros órganos periféricos.

La organización estructural del parénquima hepático y los elementos vasculares de este órgano, son los más idóneos para llevar a cabo esta función. Todos los nutrientes que se absorben en el intestino (a excepción de los ácidos grasos), se liberan en la vena porta que drena directamente en el hígado. Además de los productos de la digestión, todos los fármacos ingeridos y otros xenobióticos pasan por el hígado antes de entrar a la circulación sistémica. Podemos considerar el hígado, órgano que actúa así, como un "vigilante" interpuesto entre el tubo digestivo y el resto del organismo para controlar y distribuir tales nutrientes. El hígado juega un papel central en el metabolismo de los hidratos de carbono, especialmente en el mantenimiento de las concentraciones circulantes de glucosa. Juega también un papel importante en el metabolismo de lípidos, aminoácidos, en la síntesis y degradación de las proteínas plasmáticas y en el almacenamiento de vitaminas y minerales. Tiene la capacidad de metabolizar, y por tanto desintoxicar una variedad amplia de xenobióticos. También tiene una función excretora por la que los productos de desecho metabólico son segregados a un sistema ramificado de conductos conocido como árbol biliar, que a su vez drena en el intestino delgado; los constituyentes de la bilis son finalmente eliminados por las heces.

Es especialmente importante la función del hígado como "regulador de la glucemia". Aunque es sensible a distintas hormonas, la concentración de

---

glucosa en plasma es en sí el verdadero sensor que alerta al hígado del estado metabólico del organismo. Dos proteínas hepáticas intervienen en este proceso: la proteína transportadora de glucosa GLUT2 y la glucocinasa, proteína enzimática que cataliza la fosforilación de la glucosa en el hepatocito. El suministro de glucosa hepática al torrente sanguíneo e indirectamente a los tejidos extrahepáticos está asegurado por la actividad glucosa 6 fosfato fosfatasa, ligada al retículo endoplásmico de los hepatocitos. Es de destacar que el hígado posee G6Pasa que permite la liberación de glucosa a la sangre. También lleva a cabo la ruta de la gluconeogénesis al biosintetizar glucosa a partir de precursores no glucídicos (piruvato, lactato, glicerol y ciertos aminoácidos). En estado de ayuno, el hígado libera 9 g de glucosa/hora a la sangre para mantener sus niveles en la circulación periférica.

El hígado también juega un papel importante en el metabolismo de proteínas. La mayoría de las proteínas plasmáticas se sintetizan en el hígado que son esenciales para cumplir determinadas funciones del organismo y constituyen la mayor parte de sólidos del plasma. La concentración total de estas proteínas en sangre es de entre 6 a 8 gr. por cada 100ml. La enfermedad hepatocelular puede alterar la síntesis de proteínas tanto cuantitativa como cualitativamente. Además, el hígado sintetiza una serie de proteínas de fase aguda. La producción de estas proteínas es estimulada en respuesta a citoquinas pro-inflamatorias liberadas por los macrófagos y de entre ellas la IL6, IL-1 $\beta$  y el TNF- $\alpha$  tienen un papel fundamental.

El hígado es un órgano que preserva su función relativamente bien con el envejecimiento. El hecho de que tenga esa "resistencia" a los cambios inducidos por la edad en el organismo en general podría deberse a su gran reserva funcional y su capacidad de regeneración. A pesar de esto, no se ve totalmente exento de sufrir cambios con la edad.

---

## 5.2. Cambios morfológicos y funcionales debidos al envejecimiento

Con el envejecimiento se puede observar que tanto el tamaño como el peso y el flujo sanguíneo del hígado disminuyen, mientras que la fibrosis aumenta. Aparecen macrohepatocitos y hepatocitos poliplodes y multinucleados (Popper H, 1986; Anantharaju A y cols., 2002). Se reduce el número de mitocondrias y su densidad matricial tanto en ratas como en humanos (Popper H, 1986). El retículo endoplasmático rugoso (RER) de los hepatocitos de ratas viejas parece estar reducido y esta reducción podría implicar una disminución en la capacidad de síntesis proteica de los hepatocitos. Aunque con el envejecimiento se dan una serie de cambios morfológicos en el hígado, los parámetros bioquímicos de función hepática no se ven generalmente alterados. Parece que en animales de experimentación la capacidad funcional de las células de Kupffer se reduce con la edad (Popper H, 1986; Anantharaju A y cols., 2002). En cuanto a la actividad de los enzimas hepáticos, se produce una disminución de algunos de los relacionados con la respiración mitocondrial y la síntesis de ATP, así como con el metabolismo de la glucosa (Tollet-Egnell P y cols, 2001). También se hace más lenta la capacidad de regeneración, dando lugar a una mayor mortalidad tras resección hepática parcial en los pacientes mayores (Popper H 1986; Anantharaju A y cols, 2002; Bixquert Jiménez M 2004).

---

## 6. PÁNCREAS

### 6.1. Generalidades

El páncreas es una glándula alargada anexa al aparato digestivo, anidada alrededor del duodeno, con una función digestiva exocrina y una función endocrina basada en los islotes de Langerhans. En condiciones normales, el páncreas humano pesa entre 50 y 65 gramos, de los que solo un gramo corresponde a tejido insular. Al microscopio, los islotes se ven como grupos de células relativamente pálidas diseminadas por el tejido exocrino. El número de islotes oscila entre 250.000 y 1.750.000; su diámetro aproximado es de 150  $\mu\text{m}$ , y son más numerosos hacia la cola del páncreas, aunque se encuentran distribuidos por todo el órgano.

En el islote se diferencian distintos tipos celulares especializados en la producción de diferentes hormonas.

- ❖ **Células beta ( $\beta$ ):** producen y liberan insulina. La insulina es una hormona que regula el nivel de glucosa en la sangre, facilitando el uso de glucosa por las células y retirando el exceso de glucosa que se almacena en el hígado en forma de glucógeno. Además estas células producen TRH y constituyen alrededor de un 70% de las células de los islotes.
- ❖ **Células alpha ( $\alpha$ ):** sintetizan y liberan glucagon. El glucagon aumenta el nivel de glucosa sanguínea estimulando la formación de ésta a partir del glucógeno almacenado en los hepatocitos. También tiene efecto en el metabolismo de las proteínas y grasas. La hiperglicemia inhibe la secreción de glucagon. Representan entre el 10-20% del tamaño del islote.

- 
- ❖ **Células delta ( $\delta$ ):** producen somatostatina, se cree que regula la producción y liberación de la insulina por las células  $\beta$ , así como la producción y liberación de glucagon por las células  $\alpha$ .
  
  - ❖ **Células PP:** producen polipéptido pancreático
  
  - ❖ **Células épsilon ( $\epsilon$ ):** hacen que el estómago produzca y libere ghrelina.

Estas células endocrinas representan el 60% de las células de los islotes. El resto son células nerviosas endoteliales y células del tejido conectivo incluyendo fibroblastos y macrófagos. Además, las células de los islotes contienen metaloproteinasa, metalotienina, kinasas dependientes de ciclina, factores de crecimiento semejantes a la insulina (IGF), y otros péptidos y enzimas. Así, la función del islote no es solo secretar insulina y otras hormonas pancreáticas, sino que puede ser considerado como un órgano complejo cuya misión principal es mantener la homeostasis de la glucosa.

La organización de estas células varía de unas especies a otras, pero de forma general puede decirse que las células  $\alpha$  y  $\delta$  se encuentran en la superficie, rodeando a las células  $\beta$  situadas en el centro del islote. En el humano existen grandes vasos que dividen el islote en unidades, cada una de las cuales consiste en una unidad central rodeada por células  $\alpha$  y  $\delta$ . En el hombre y otras especies se ha establecido que la composición celular endocrina así como su distribución en los islotes es diferente entre las distintas regiones del páncreas de acuerdo con su diferente embriología, vasculatura, tipo de células exocrinas y contenido de hidrolasa. La proporción de células  $\beta$  es menor en los islotes del área ventral (17%) comparada con los islotes del área dorsal (74%). La región periférica de ambos tipos de islotes contiene células productoras de polipéptido

---

pancreático, glucagón y somatostatina. En los islotes del área ventral, las células productoras de polipéptido pancreático representan un porcentaje mucho mayor con respecto al número total de células endocrinas comparadas con las células  $\alpha$  productoras de glucagón. En el caso de islotes de área dorsal ocurre lo contrario. El número de células  $\delta$  productoras de somatostatina es del mismo orden de magnitud para los dos tipos de islotes. Esta distribución de las células endocrinas de los islotes no es al azar y sugiere una posible interrelación funcional entre los distintos tipos celulares. Se postula que la actividad de la célula  $\beta$  en los islotes ventrales y dorsales podría estar influenciada por las diferencias en las concentraciones locales de las hormonas secretadas por las otras células endocrinas y/o por comunicaciones directas entre las células endocrinas vecinas. Estas distintas proporciones entre las células endocrinas podrían verse alteradas en algunos casos como por ejemplo la pancreatitis crónica.

Las hormonas pancreáticas juegan un papel fundamental regulando el metabolismo de los nutrientes en el organismo. Su papel mejor conocido es el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa. El organismo necesita que los niveles de glucosa en sangre varíen lo mínimo posible y las hormonas responsables del mantenimiento de los niveles plasmáticos de glucosa son la insulina y el glucagón. Ambas se consideran las principales hormonas reguladoras de la homeostasis metabólica debido a que fluctúan continuamente en respuesta al patrón diario de alimentación.

La insulina es la principal hormona anabólica que promueve el almacenamiento de nutrientes:

- ❖ Almacenamiento de glucosa en forma de glucógeno en hígado y músculo.

- 
- ❖ Conversión de glucosa en triglicéridos en el hígado y su almacenamiento en el tejido adiposo.
  - ❖ Captación de aminoácidos y síntesis de proteínas en el músculo esquelético.
  - ❖ Aumenta la síntesis hepática de albúmina y otras proteínas de la sangre.
  - ❖ Promueve la utilización de glucosa por los tejidos.

La insulina va a jugar un papel central en el control del metabolismo intermediario y tiene efecto no solo sobre el metabolismo de los hidratos de carbono, sino también sobre el metabolismo de lípidos y proteínas. Por todo esto, alteraciones en la producción de insulina puede tener efectos devastadores en la mayor parte de órganos y tejidos.

La insulina estimula la captación de sustratos combustibles en algunas células, el almacenamiento de lípidos y glucógeno y la biosíntesis de macromoléculas (ácidos nucleicos y proteínas). Los efectos específicos consisten en el aumento de la captación de glucosa en el músculo y el tejido adiposo; la activación de la glicolisis en el hígado; el aumento de la síntesis de ácidos grasos y triacilgliceroles en el hígado y tejido adiposo; la inhibición de la gluconeogénesis en el hígado; el aumento de la síntesis de glucógeno en hígado y músculo; el aumento de la captación de aminoácidos en el músculo con la consiguiente activación de la síntesis de proteínas musculares, y la inhibición de la degradación proteica. Debido a estas acciones podemos considerar la insulina como un factor de crecimiento.

El glucagon actúa para mantener la disponibilidad de combustible en ausencia de glucosa. Estimula la liberación de glucosa a partir del glucógeno hepático (glucogenolisis) y estimula su formación (gluconeogénesis) a partir de láctico y aminoácidos. Junto con el descenso de la insulina induce la movilización de los ácidos grasos de los

---

triglicéridos del tejido adiposo para proporcionar una fuente alternativa de combustible.

Aunque el hígado es el primer tejido diana mas importante para el glucagon se han identificado receptores para éste en otros tejidos como cerebro (se ha sugerido un posible papel neuroendocrino), riñón (ayuda a mantener la homeostasis electrolítica), islotes pancreáticos (aumenta la liberación de insulina), corazón (aumenta el ritmo cardíaco) y tejido adiposo (aumenta la lipólisis).

El efecto principal del glucagón en el hígado es aumentar la concentración de AMP cíclico (cAMP) en las células hepáticas, con el consecuente aumento del grado de fosforilación de los enzimas de las vías metabólicas. El resultado es un aumento de la glucogenolisis y una inhibición de la síntesis de glucógeno. Además al activar a la fructosa 2,6 bifosfato, el glucagon produce también la inhibición de la piruvato kinasa del hígado, causando la acumulación de fosfoenol piruvato (PEP), lo que impulsa la gluconeogénesis e inhibe la glicolisis. El glucagon aumenta también los niveles de cAMP en el tejido adiposo, aumentando la fosforilación de la triacilglicerol lipasa, produciendo glicerol y ácidos grasos libres.

## **6.2. Diabetes Mellitus**

La diabetes mellitus constituye con diferencia la principal patología que afecta al páncreas endocrino. Es un síndrome orgánico multisistémico que tiene como característica el aumento de los niveles de glucosa en sangre o hiperglucemia, atribuible a defectos en la secreción de insulina, en su acción o ambos. Se trata de una enfermedad compleja en la que coexiste un trastorno global del metabolismo de los hidratos de carbono, grasas y

---

proteínas. Es multifactorial por la existencia de múltiples factores implicados en su patogénesis. Se calcula una prevalencia estimada en la población adulta del 7,4 % con un valor esperado de alrededor del 9% para el 2025. Aunque existen varios tipos de diabetes, la mayoría de casos corresponde a dos clases principales: la diabetes mellitus tipo 1 y diabetes mellitus tipo 2.

- ❖ La DM tipo 1 se caracteriza por una destrucción masiva de las células  $\beta$  del páncreas, de manera que la secreción de insulina es nula o insignificante (en un diagnóstico precoz la secreción puede estar sólo disminuida).
- ❖ En la DM tipo 2, la deficiencia de insulina no es tan marcada y el trastorno principal es la resistencia de los tejidos periféricos a la acción de la hormona.

Independientemente del tipo de diabetes mellitus, un mal control de los niveles de glucosa en la sangre propicia el desarrollo de complicaciones secundarias como cetoacidosis, macro y microangiopatías, arteriosclerosis, neuropatías, retinopatías, hepatopatías y neuropatías (Tresguerres, 2010).

### **6.3. Cambios morfológicos y funcionales debidos al envejecimiento**

Durante el envejecimiento se ha observado que la capacidad secretora de las células del islote disminuye dando lugar, en primer lugar, a lo que se conoce como resistencia a insulina y, con el tiempo, desembocando en una diabetes mellitus tipo 2.

La diabetes tipo 2 se caracteriza por un complejo mecanismo fisiopatológico, cuyo rasgo principal una deficiente utilización periférica

---

por los tejidos de glucosa (resistencia a la insulina) asociada o no a un déficit relativo de producción de insulina vinculado con una menor sensibilidad de las células  $\beta$  a la glucosa. Se desarrolla a menudo en etapas adultas de la vida, y es muy frecuente la asociación con la obesidad. El defecto básico es, como se ha mencionado anteriormente, la resistencia de los tejidos periféricos a la acción de la insulina y en menor grado, una deficiencia relativa de secreción de la hormona. La mayoría de expertos considera que la resistencia a la insulina es el fenómeno primario, mientras que la deficiencia de la secreción, aparece como resultado de la hiperglucemia sostenida y la sobre estimulación persistente de la célula  $\beta$ . Es el tipo de diabetes más frecuente. Como el defecto fundamental es la deficiente respuesta de los tejidos a la acción de la insulina, los niveles plasmáticos de la hormona pueden ser normales e incluso elevados, la hiperglucemia se desarrolla en forma gradual y el riesgo de cetoacidosis es bajo, ya que no se acompaña de lipólisis exagerada. Suele ser asintomática durante un tiempo prolongado y las primeras manifestaciones aparecen a partir de los cuarenta años de edad. Sin embargo, los trastornos metabólicos subyacentes se traducen en aumento de peso, modificación del perfil lipídico, incremento de las cifras de presión arterial y daño vascular.

Comprende defectos prerreceptor (bien sea porque se produce una molécula de insulina anormal o por la presencia de anticuerpos contra la insulina), defectos del receptor (como resultado de mutaciones específicas) o defectos postreceptor, que implican tanto las mutaciones en las moléculas transportadoras de glucosa, como la síntesis deficiente de transportadores y las alteraciones de translocación de GLUT-4.

Los defectos prerreceptor comprenden: alteraciones en la estructura terciaria o cuaternaria de la molécula, unión de anticuerpos neutralizantes contra insulina y síntesis aumentada de hormonas contrarreguladoras (glucagón, hormona de crecimiento, glucocorticoides y catecolaminas. Los

---

defectos del receptor, están relacionados con mutaciones genéticas puntuales que generan un receptor con poca afinidad por la insulina o incapaz de autofosforilarse. En cuanto a los defectos postreceptor, cabe considerar tanto los defectos de activación de las IRS, que intervienen en numerosas reacciones intracitoplasmáticas conducentes a las conocidas acciones insulínicas, como de los transportadores de glucosa. Las mutaciones de los genes que codifican para los distintos transportadores de glucosa son poco comunes y entre ellas han sido identificadas diversas alteraciones de las proteínas GLUT-1, GLUT-2 y GLUT-4. Aunque estas mutaciones en las proteínas transportadoras de glucosa (en especial GLUT-4) podrían ocasionar resistencia a la insulina, tales alteraciones son muy raras y los estudios realizados en humanos indican que la prevalencia de las mismas es igual en sujetos sanos y en pacientes con diabetes mellitus tipo 2.

En los casos de diabetes, la resistencia a la insulina está mediada esencialmente por alteraciones post receptor. En los pacientes con cuadros genéticos de resistencia a la insulina (debido a defectos moleculares del receptor insulínico), es posible observar alteraciones importantes del crecimiento, atrofia del tejido adiposo, acantosis nigricans, y en las mujeres, hiperandrogenismo con disfunción ovárica. Sin embargo, los individuos afectados no desarrollan diabetes mellitus, a menos que también posean una susceptibilidad genética a la disfunción secretora de las células beta del páncreas.

En los últimos años, se ha podido establecer que el defecto principal que determina la aparición de resistencia a la insulina está relacionado con trastornos de translocación de las moléculas transportadoras de glucosa y con la cascada de fosforilaciones inducida por la interacción entre la insulina y su receptor. Es más, puesto que la fosforilación de la enzima fosfoinositol quinasa 3 y las quinasas B y C es fundamental para la migración de las vesículas intracelulares que contienen GLUT-4 hacia la membrana, es evidente que las anomalías antes mencionadas están

---

estrechamente relacionadas. Los estudios realizados en sujetos obesos y en pacientes con diabetes mellitus han encontrado una menor activación de la enzima fosfoinositol quinasa 3 (PI3K) (Becattini y cols, 2011).

La resistencia a la insulina se manifiesta, sobre todo en los tejidos periféricos como el músculo y el tejido adiposo, por una baja tasa de captación y oxidación de las moléculas de glucosa. Como ya se mencionó, la hiperinsulinemia compensadora es precisamente el mecanismo por el cual un sujeto resistente a la insulina logra mantener una tolerancia normal a los hidratos de carbono. Cuando dicho mecanismo es insuficiente, a causa de la aparición de defectos de la secreción hormonal por parte de las células beta del páncreas, sobreviene la intolerancia a los hidratos de carbono.

Por otro lado, numerosos investigadores han demostrado que los sujetos con resistencia a la insulina y que desarrollan diabetes mellitus tipo 2, invariablemente presentan un defecto de secreción de la hormona, que afecta, preferentemente, a la primera fase de este proceso. Tal anomalía, en algunos casos, puede ser detectada antes de la aparición de hiperglucemia franca.

La respuesta temprana de insulina, que es como se ha denominado a la capacidad de la célula beta para responder de forma inmediata a una carga de glucosa, se correlaciona de manera significativa con la concentración plasmática de la hormona, 30 minutos después de la inyección endovenosa de una carga estándar de glucosa. Un aspecto importante que hay que considerar es el hecho de que no todos los sujetos con resistencia a la insulina desarrollan diabetes mellitus tipo 2, lo cual indica que el defecto de la célula beta es esencial para que aparezca la enfermedad clínicamente manifiesta.

La resistencia a la insulina se encuentra asociada en mayor o menor grado con una amplia gama de alteraciones metabólicas, que implican, a largo plazo, graves riesgos para la salud. Los sujetos con resistencia a la acción

---

de la insulina presentan una actividad disminuida de la enzima lipoprotein lipasa asociada al endotelio vascular; esta alteración se correlaciona con la presencia de altas concentraciones séricas de lipoproteínas ricas en triacilgliceroles, en especial las de muy baja densidad (VLDL), y baja concentración de lipoproteínas de alta densidad (HDL) (Ai y cols, 2000). Otro trastorno característico de los lípidos plasmáticos, es la formación de partículas más pequeñas y densas de lo normal, que tienen una mayor capacidad aterogénica, porque son más susceptibles a la oxidación, debido a su bajo contenido en compuestos antioxidantes. Las múltiples anomalías asociadas a una pobre sensibilidad a la insulina, han recibido, en conjunto, el apelativo de síndrome X. Los individuos afectados, además de ser obesos y tener hiperinsulinemia en ayunas, exhiben las alteraciones lipídicas antes mencionadas y muestran grados variables de hipertensión arterial y, en algunas ocasiones, hiperuricemia. Esto va asociado a una mayor susceptibilidad al desarrollo de trombosis intra-arterial, tanto en individuos resistentes a la insulina, como en quienes han desarrollado diabetes.

La toxicidad de la glucosa se debe en parte a su participación en reacciones que generan ROS. En presencia de metales de transición como Cu, la glucosa se autooxida. Esto genera ROS. La glucosa se une a proteínas modificando su estructura y función, las proteínas glicosiladas (productos de Amadori). La posterior oxidación, deshidratación, reordenamiento y fragmentación de estos productos da lugar a la formación de una familia de compuestos conocidos como productos finales de glicosilación avanzada (AGE). El exceso de producción de estos compuestos es en parte responsable de la toxicidad de la glucosa que se observa en la diabetes. De hecho, algunos de los AGE son interconexiones entre proteínas que se forman por ejemplo en el colágeno o la mielina disminuyendo la elasticidad de estas proteínas. La concentración de los AGE aumenta con la edad, pero en la diabetes su acumulación es más

---

rápida y ocurre a cualquier edad. La formación de AGE parece importante en el desarrollo de las complicaciones microvasculares de la diabetes. Entre las proteínas que se glucosilan no enzimáticamente se encuentra la hemoglobina (de hecho los niveles de hemoglobina glucosilada son considerados como índice de control metabólico), pero en los diabéticos se pueden glucosilar también otras proteínas como la albúmina sérica y las proteínas del cristalino, lo que podría contribuir a la elevada incidencia de cataratas en estos pacientes. La glucosilación también puede implicar al tejido conjuntivo y a la mielina por lo que se piensa que contribuye a alterar la función de gran cantidad de tejidos (Liu y cols, 2009)

Los AGE se unen a sus receptores de membrana en las células endoteliales y esto puede generar estrés oxidativo. Esto lesiona las células endoteliales y estimula la vía proinflamatoria implicando al factor de transcripción NFkB. El NFkB controla a su vez, la expresión de una serie de citoquinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6. Todo ello causa una inflamación crónica de grado leve de la que se sabe daña posteriormente al endotelio vascular (Esser y cols, 2011). Además en estas alteraciones parecen estar implicadas también la proteína quinasa C (PKC) y los diglicéridos (DG). Las concentraciones de DG y PKC se modifican en respuesta a citoquinas y también por cambios metabólicos, entre ellos la hiperglucemia que induce un aumento de DG y PKC en retina, aorta, corazón y glomérulo renal, aunque no parece modificarla en cerebro y nervios periféricos. Por otro lado, el incremento de radicales libres podría bloquear el efecto relajante del óxido nítrico (NO) que se libera en el propio endotelio, limitando así la capacidad de respuesta vasodilatadora del endotelio. El NO (vasodilatador) es generado por las células endoteliales a partir de arginina en una reacción que utiliza NADPH. Es desactivado rápidamente por el anión superóxido que forma un radical peroxinitrito que también es oxidante.

La hiperglucemia aumenta también la cantidad de donadores de H<sup>+</sup> en la mitocondria. Esto da lugar a un incremento de la diferencia de potencial

---

electroquímico a través de la membrana mitocondrial interna y en consecuencia al aumento de la producción de ROS por parte de la cadena respiratoria. Cuando aumenta el NADH, la cadena de transporte de electrones se satura y el potencial de membrana aumenta y se incrementa la producción de ROS. Se ha sugerido que el aumento mitocondrial de ROS juega un papel importante en las complicaciones a largo plazo de la diabetes (Baynes, 1991). La hiperglucemia altera el estado redox al aumentar la relación NADH/NAD y disminuir NADPH/NADP. Esto incrementa el flujo de sustratos a la vía de los polioles en la que la aldosa reductasa (AR) reduce la glucosa a sorbitol que es oxidado posteriormente a fructosa. La arginina tiene una Km alta para la glucosa que en condiciones normales es poco activa, sin embargo, durante la hiperglucemia la concentración de glucosa en los tejidos no dependientes de insulina como glóbulos rojos, nervios y cristalino, aumenta y esto activa la vía. La acumulación de sorbitol en el tejido del ojo puede contribuir al desarrollo de las cataratas diabéticas (Miwa y cols, 2003).

Por otro lado en el tejido nervioso la concentración alta de cortisol disminuye la captación de mioinositol. Esto reduce la actividad Na/K ATPasa de la membrana y afecta a la función nerviosa. La acumulación de sorbitol junto con la hipoxia y la reducción del flujo sanguíneo en el tejido nervioso contribuyen a la aparición de la neuropatía diabética (Feldman, 2003). Entre el 60 y 70% por ciento de las personas con diabetes tienen formas moderadas o severas de daño neurológico, el cual, en los casos severos puede llevar a amputaciones de las extremidades inferiores. De hecho, la diabetes es la causa principal de amputaciones de las extremidades inferiores por causas no traumáticas. El riesgo de amputaciones de las piernas es de 15 a 40 veces más alto en las personas con diabetes. Cada año se llevan a cabo más de 80000 amputaciones en personas que sufren de diabetes. El riesgo relativo de neuropatía es, al menos, 7 veces superior en el diabético, la neuropatía autonómica a nivel cardiovascular afecta a más del 40% de la población diabética con más de

---

10 años de evolución, la impotencia sexual afecta a casi el 40% de los hombres con diabetes.

Las enfermedades cardiovasculares (enfermedades del corazón y derrames cerebrales) son la causa principal de muerte en las personas con diabetes. Las personas con diabetes tienen un riesgo entre 2 y 4 veces más alto de sufrir enfermedades del corazón y derrames cerebrales, las cuales están presentes en un 65% de las muertes relacionadas con la diabetes. Esto representa más de 77000 muertes anuales. La primera causa de muerte entre los pacientes con diabetes es el infarto de miocardio, que causa el 50-60% de las muertes de los pacientes con DM tipo 2.

## **9. MODELO ANIMAL UTILIZADO**

Establecer un modelo animal adecuado que tenga características similares a las de los humanos es fundamental para dilucidar los cambios que tienen que ver con el envejecimiento y para el desarrollo de medicamentos eficaces en la prevención de enfermedades relacionadas con la edad como es la diabetes mellitus tipo 2.

### **Ratones con senescencia acelerada y retardada.**

El ratón de envejecimiento acelerado (del inglés *senescence-accelerated mouse* [SAM]) es un ratón caracterizado por su rápida progresión hacia el envejecimiento una vez ha alcanzado la edad de reproducción. Estos

---

ratones se obtuvieron en la Universidad de Kyoto, por selección fenotípica de un grupo de ratones de la cepa AKR/J que mostraban manifestaciones seniles de forma temprana (Takeda, 1999).

En 1968 varias parejas de ratones AKR/J se donaron del Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA) al departamento de Patología Chest Disease Research Institute (CDRI currently Institute for Frontier Medical Sciences), Kyoto University, Japan.

Tras estudiar parámetros relacionados con curvas de supervivencia, grado de senescencia y patrones de peso corporal se observaron diferentes características fenotípicas. La reproducción endogámica permitió que alrededor de 1972-1973 se obtuvieran camadas de animales que mostraban un descenso de la actividad física, pérdida de pelo y de brillo en el pelo y morían más tempranamente. No se observaron retrasos en el crecimiento, malformaciones, parálisis de miembros ni otros signos neurológicos como temblores, convulsiones, etc (Takeda, 1999).

En 1975, cinco camadas de los ratones que se encontraban más exhaustos se eligieron como progenitores de la serie P (senescence prone serie) y tres camadas de ratones que presentaban un envejecimiento normal fueron los progenitores de la serie R (senescence resistant serie). Se hicieron cruzamientos selectivos basados en datos de senescencia y esperanza de vida. De cada una de las cinco camadas de los ratones progenitores más exhaustos se obtuvieron 5 series diferentes llamadas P-1, P-2, P-3, P-4 y P-5 y de cada una de las camadas que se seleccionaron como normales se obtuvieron tres series diferentes R-1, R-2 y R-3. Diversos parámetros relacionados con el envejecimiento se llevaron de nuevo a cabo en estas series originales basándose en curvas de supervivencia, tasas de senescencia, parámetros de crecimiento, peso corporal, etc. Estos parámetros revelaron que toda la serie P tenía la característica común de que eran ratones con senescencia acelerada: inicio precoz y avance acelerado de senescencia manifestado por varios signos y lesiones

---

macroscópicas como la pérdida de comportamiento normal, varias lesiones en la piel, acortamiento del tiempo de vida después de un periodo de normalidad del desarrollo. Por todas estas características la serie P fue nombrada SAM (del inglés *senescence accelerated mouse*). Para que estas variedades tuvieran éxito tenían que convertirse en cepas puras para lo cual se hicieron más de 20 generaciones y se establecieron homocigotos y una expresión fenotípica estable. Por otra parte, el nombre de SAM se convierte en un término general para las cepas puras de las dos series SAMP (*senescence prone*) y SAMR (*senescence resistant*).

La reproducción endogámica permite establecer la cepa de animales SAMP con un ciclo vital de unos 12 meses (propensos al envejecimiento) mientras que otro grupo sirve para instituir la línea SAMR (resistentes al envejecimiento) con una longevidad de unos 17 meses.

La causa principal del envejecimiento acelerado en estos ratones sería su elevado nivel de estrés oxidativo debido a disfunción mitocondrial, hecho que se ha demostrado en diferentes trabajos experimentales (Mori y cols, 1998; Hosokawa, 2002; Rodriguez y cols, 2008).

En el siguiente gráfico se muestra la genealogía de las distintas series en el año 2005.

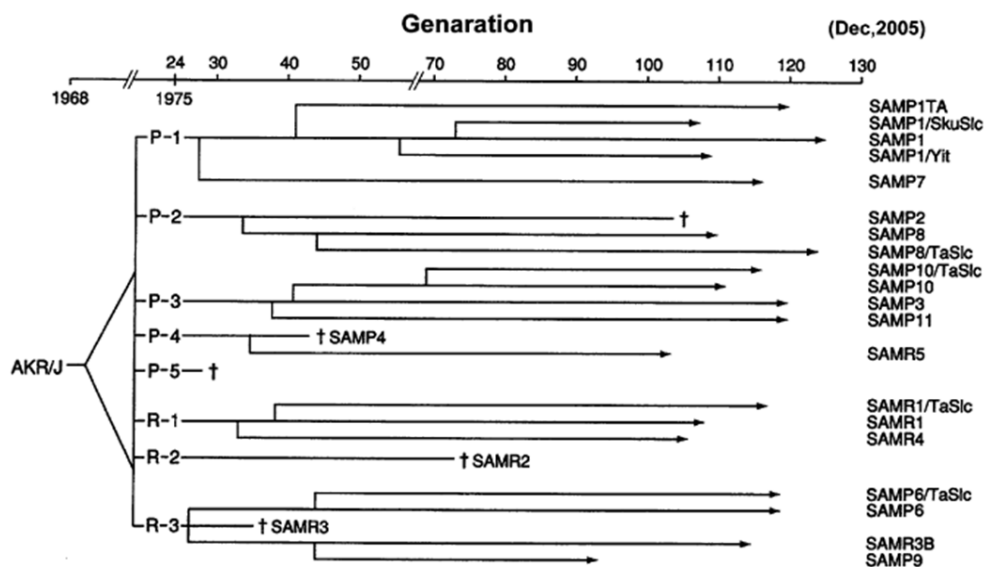


Figura 9. Genealogía de los ratones SAM.

Se han realizado diversos estudios relacionados con el envejecimiento en las diferentes cepas de ratones SAMP (SAMP6, SAMP8, SAMP10). En estos estudios se han analizado diferentes temáticas como las enfermedades neurodegenerativas, la osteoporosis, el estudio de la piel, los déficit en el aprendizaje y la memoria, la respuesta inmunitaria, la función vascular etc (Butterfield y Poon 2005; Niimi y cols 2008; Egermann y cols 2010).

No se conocen los factores genéticos que predisponen a que estos animales desarrollen senescencia acelerada aunque diferentes datos derivados de las investigaciones de Takeda (Takeda y cols, 1981) sugieren que existe una desviación genética del modelo SAM comparado con la cepa original AKR/J (Takeda y cols, 1999). Para la obtención de los perfiles genéticos también se han utilizado marcadores microsatélites (secuencias de nucleótidos repetidos en tandem). Son muy polimórficos y se encuentran distribuidos al azar en todo el genoma por lo que son muy buenos

---

marcadores genéticos ya que poseen un sistema muy poderoso para generar una identificación única de los individuos. Estas pruebas permitieron establecer que todas las cepas tenían diferentes perfiles genéticos (Mori y Higuchi, 2004).

Los ratones SAMP8 se han utilizado en la investigación del envejecimiento comparándolos con los ratones SAMR1, que sirven como su control (Kurokawa y cols 1998; Rodriguez y cols 2007b). Los SAMP8 son utilizados debido a que su rápido envejecimiento cursa con deterioro cognitivo y un déficit en el aprendizaje y la memoria a medida que progresa su ciclo vital (Magri y cols, 2004). Pero además de esto, los ratones SAMP8 muestran un elevado estrés oxidativo, hallazgo coherente con los efectos de la acción de los radicales libres de oxígeno en diversas biomoléculas que producen alteraciones en las funciones celulares. El modelo SAMR1 no muestra fenotípicamente signos de senescencia y por ese motivo es utilizado como cepa control de los SAMP8.

Además muchas de las características fenotípicas que observamos en los ratones SAM se encuentran asociadas al envejecimiento humano como osteoporosis, osteoartritis, desórdenes geriátricos, cataratas, pérdida auditiva etc (Takeda 1999, 2009; Fenton y cols 2004)

Por eso estos animales están considerados como un buen modelo para investigar el envejecimiento ya que no poseen ningún tipo de manipulación genética ni de otro tipo y a edades relativamente bajas (10-14 meses) muestran procesos y patologías que se observan en ratones realmente viejos (20 meses), lo que reduce los tiempos de espera para desarrollar las investigaciones.



---

# *Hipótesis y Objetivos*



---

El envejecimiento conlleva un deterioro progresivo del organismo asociado con cambios morfológicos y funcionales que repercute de forma evidente en el deterioro de los sistemas reguladores y da lugar a la pérdida de la homeostasis.

Las manifestaciones del envejecimiento están relacionadas con procesos inflamatorios, apoptóticos y oxidativos que podrían estar relacionados, al menos en parte, con un descenso en la actividad de distintas hormonas como la GH y la melatonina. Debido a esto, el tratamiento de sustitución hormonal con dichas hormonas podría restaurar la homeostasis del organismo disminuyendo las manifestaciones deletéreas asociadas a la edad.

### **8.1. Objetivo general**

Investigar los mecanismos moleculares involucrados en el daño pancreático secundario al envejecimiento y el posible efecto protector de los tratamientos hormonales con GH, melatonina y la combinación de ambas sobre los daños a este órgano y también al hígado de dos cepas diferentes de ratones SAMP8 (con envejecimiento acelerado) y SAMR1 (con resistencia al envejecimiento, como controles de los SAMP8).

---

## 8.2. Objetivos concretos

- Investigar el efecto del envejecimiento sobre los niveles de mediadores inflamatorios, oxidativos y apoptóticos en el hígado de ratones de las cepas SAMP8 y SAMR1.
- Investigar el efecto del envejecimiento sobre la expresión del mRNA de hormonas pancreáticas como insulina, glucagón y somatostatina. Además estudiar el transportador de glucosa GLUT-2 y estudiar la expresión mediante RIA del contenido de insulina en el páncreas de ratones SAMP8 y SAMR1.
- Investigar el efecto del envejecimiento sobre los niveles plasmáticos de insulina y glucosa en ratones SAMP8 y SAMR1
- Investigar el efecto del envejecimiento sobre la expresión de diferentes genes de supervivencia, proliferación y diferenciación celular en el páncreas de ratones de las cepas SAMP8 y SAMR1.
- Investigar el efecto del envejecimiento sobre los niveles de mediadores inflamatorios, oxidativos y apoptóticos en el páncreas de ratones de las cepas SAMP8 y SAMR1.
- Investigar el efecto del envejecimiento sobre los niveles de enzimas antioxidantes en el páncreas de ratones de las cepas SAMP8 y SAMR1.
- Investigar el efecto de la administración crónica durante 30 días de melatonina y/o GH sobre los parámetros indicados anteriormente.



---

# *Material y métodos*



---

## 9.1. Animales

Se han utilizado ratones de las cepas SAMP8 (del inglés senescence prone mice) y SAMR1 (del inglés senescent resistant mice), cuyos progenitores proceden de la colonia propia del Animalario de la Universidad de Granada. El ratón de envejecimiento acelerado (del inglés senescence-accelerated mouse [SAM]) es un ratón caracterizado por su rápida progresión hacia el envejecimiento una vez ha alcanzado la edad de reproducción. Estos ratones se obtuvieron en la Universidad de Kyoto, por selección fenotípica de un grupo de ratones de la cepa AKR/J que mostraban manifestaciones seniles de forma temprana<sup>1</sup>. La reproducción endogámica permite establecer la cepa de animales SAMP con un ciclo vital de unos 12 meses (propensos al envejecimiento) mientras que otro grupo sirve para instituir la línea SAMR (resistentes al envejecimiento) con una longevidad de unos 17 meses<sup>2</sup>.

El total de animales utilizados ha sido de 64 ratones macho SAMR1 y 80 ratones macho SAMP8 de 2 y 10 meses de edad a la fecha del sacrificio.

Los animales se han mantenido en el animalario de la Universidad Complutense de Madrid bajo condiciones controladas de luz, humedad y temperatura. La luz está regulada por ciclos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad (08:00-20:00). Las condiciones de temperatura son de 22°C y las de humedad del 50%. La ventilación en las instalaciones del animalario se realiza mediante extracción continuada.

Los animales se alojaron en grupos de 6-7 ratones en jaulas de policarbonato (MacrolonR, Panlab) de 46,5 x 21,5 x 14,5 cm. Tuvieron acceso a agua ad-libitum en biberones y se alimentaron con una dieta estándar (A.04; Panlab, Barcelona, España).

En todos los procedimientos experimentales empleados en este estudio se han seguido los principios y prácticas establecidos por la Normativa de la Unión Europea 86/6091/EEC, publicada en España en RD 223/1988.

---

## 9.2. Tratamientos

Todos los grupos experimentales que se sometieron a tratamiento comenzaron a recibirlo a los 9 meses de edad. Al cabo de 30 días, el tratamiento finalizó y los animales se sacrificaron por dislocación cervical, seguido de decapitación.

### 9.2.1. Hormona de crecimiento (GH)

La hormona de crecimiento que se utilizó fue rhGH (Omnitrope, Sandoz, España). Los animales recibieron 2 mg/Kg/día (GH) por vía subcutánea (S.C.) en el dorso, en dos inyecciones diarias, una a las 10 horas y otra a las 16 horas.

Esta hormona se diluyó en solución salina estéril previamente a su inyección, hasta lograr una concentración de 0,25 mg/ml.

El grupo control recibió inyecciones de solución salina.

### 9.2.2. Melatonina

La melatonina (Actafarma, Madrid, España) se administró a dosis de 1 mg/Kg/día (Mel 1) y de 10 mg/Kg/día (Mel 10) por vía oral en el agua de bebida. Previamente se preparó una solución stock (20 mg/mL) en etanol absoluto (Panreac Química SA, España), a una concentración de 20 mg/ml. Dado que se trata de una sustancia fotosensible, los biberones deben ser protegidos de la luz. La solución de melatonina se cambió tres veces por semana, para evitar su oxidación.

Los animales del grupo control recibieron etanol al 0,1% en el agua de bebida.

---

### 9.2.3. Hormona de crecimiento mas melatonina (GH+mel)

Se utilizaron la hormona de crecimiento y la melatonina antes descritas. La GH se administró a dosis de 2 mg/Kg/día en 2 inyecciones S.C. diarias (10 y 16 horas) y la melatonina se administró en el agua de bebida a dosis de 1 mg/Kg/día (Mel 1).

El grupo control recibió etanol al 0,1 % en el agua de bebida e inyecciones diarias de solución salina.

En la siguiente tabla se recogen los grupos con los distintos tratamientos

EDAD	CEPA	TRATAMIENTO	Nº animales	GRUPO
<b>2 meses</b>	SAMP8	Ninguno	16	Jóvenes
	SAMR1	Ninguno	16	Jóvenes
<b>10 meses</b>	SAMP8	Ninguno	16	Viejos
	SAMR1	Ninguno	16	Viejos
<b>9 meses (1 mes de tratamiento)</b>	SAMP8	Hormona de crecimiento (GH) (2mg/kg/día)	8	GH
		Melatonina (1mg/kg/día)	16	Mel 1
		Melatonina (10mg/kg/día)	16	Mel 10
		GH+Melatonina (2mg/kg/día de GH + 1 mg/kg/día de melatonina)	8	GH+Mel

<b>9 meses (1 mes de tratamiento)</b>	SAMR1	Melatonina (1mg/kg/día)	16	Mel 1
		Melatonina (10mg/kg/día)	16	Mel 10

### 9.3. Sacrificio de los animales y recogida de las muestras

Una vez finalizados los tratamientos, los animales se sacrificaron por dislocación cervical seguida de decapitación con guillotina. La sangre troncular se recogió en tubos de propileno con heparina:salino al 0.2% depositando el tubo en hielo. Las muestras de sangre se centrifugaron a 3000 rpm y 4°C durante 15 minutos (centrífuga Beckman, modelo TJ-6). Se recogió la fracción plasmática y se congeló a -80°C para su conservación hasta su posterior análisis.

Tras la extracción del páncreas e hígado de los animales con material quirúrgico adecuado estéril, los tejidos se lavaron en solución salina fría para retirar la sangre, se congelaron con N<sub>2</sub> líquido y se almacenaron en tubos eppendorf estériles a -80°C hasta el momento de su procesamiento. En el caso del páncreas, una parte de este tejido se introdujo en una solución con RNA later (RNeasy total RNA kit Ref. 50974104 (Qiagen)) para el correcto aislamiento del RNA mensajero.

---

### 9.4.3. Determinaciones realizadas

#### En hígado (Anexo Artículo I)

- ❖ Marcadores inflamatorios: TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-10, NFkB p50, p52 y p65.
- ❖ Marcadores de estrés oxidativo: iNOS, eNOS, HO-1, HO-2.
- ❖ Marcadores apoptóticos: Bcl2, BAX y BAD.

#### En páncreas (Anexo Artículos II, III, IV y V)

- ❖ Marcadores inflamatorios: TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-10, MCP1, IL-6, IL-4, IL-2, NFkB p52-100, NFkB p50-105, NFkB p65, Ikb- $\alpha$ , Ikb- $\beta$ .
- ❖ Marcadores de estrés oxidativo: iNOS, eNOS, HO-1, HO-2, NOx
- ❖ Marcadores apoptóticos: Bcl2, BAD, BAX, XIAP
- ❖ Genes relacionados con el metabolismo: Glucagon, GLUT-2, Insulina y Somatostatina
- ❖ Marcadores de proliferación: PCNA y Sei 1
- ❖ Marcadores de longevidad: FoxO1, FoxO 3A y Sirt-1
- ❖ Marcadores de diferenciación: Pdx-1
- ❖ Insulina y glucosa en plasma
- ❖ Insulina en páncreas (animales jóvenes y viejos)
- ❖ IGF-I
- ❖ Ácidos grasos libres

---

### Expresión y extracción de ARN mensajero (ARNm)

Se determinó mediante la técnica de reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

#### Extracción de ARN

Se han utilizado dos técnicas diferentes de extracción dependiendo del tejido, hígado o páncreas:

- ❖ El aislamiento de ARN hepático se realizó utilizando el kit comercial Tri Reagent™ (Sigma-Aldrich, Inc), basado en el método de Chomczynski y Sacchi (Chomczynski and Sacchi 1987).
- ❖ Para el aislamiento de ARN pancreático se utilizó el kit comercial RNeasy total RNA kit Ref. 50974104 (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

La integridad del RNA se determinó mediante un gel de agarosa al 1.5% y la concentración se determinó por espectrofotometría.

Para la transcripción reversa se utilizaron 2µg del ARNm de cada una de las muestras. El proceso se llevó a cabo utilizando un kit comercial (Promega, Madison, WI, USA). de acuerdo a las instrucciones detalladas en el manual y una mezcla de random primers pd(N)6. Para ello se usó un termociclador para PCR en tiempo real (Applied Biosystems 7300). Se utilizó el método inespecífico de fluorescencia SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Warrington, UK) y los primers se utilizaron a una concentración de 300nM. La secuencia de primers se muestra en la tabla XX. Se utilizó el gen endógeno 18S como control interno. Los cambios en la expresión del mRNA se analizaron siguiendo el método de  $\Delta C_t$  (Livak y Schmittgen 2001). El cADN obtenido se conservó a -20 °C hasta su utilización.

Las características de los cebadores se detallan en la siguiente tabla:

Nombre		Secuencia (5'-3')
18s	Sentido	GGTGCATGGCCGTTCTTA
	Antisentido	TCGTTTCGTTATCGGAATTAACC
TNF $\alpha$	Sentido	ATGAGAAGTTCCCAAATGGC
	Antisentido	CTCCACTTGGTGGTTTGCTA
IL-1 $\beta$	Sentido	TGTGATGAAAGACGGCACAC
	Antisentido	CTTCTTCTTTGGGTATTGTTTGG
IL-10	Sentido	ACTGCACCCACTTCCCAGT
	Antisentido	TTGTCCAGCTGGTCCTTTGT
iNOS	Sentido	CTTTGCCACGGACGAGAC
	Antisentido	TCATTGTACTCTGAGGGCTGAC
eNOS	Sentido	CCAGTGCCCTGCTTCATC
	Antisentido	GCAGGGCAAGTTAGGATCAG
HO-1	Sentido	GTCAAGCACAGGGTGACAGA
	Antisentido	ATCACCTGCAGCTCCTCAAA
HO-2	Sentido	TACGGCACCAGAAAAGGAAA
	Antisentido	GTGCTTCCTTGGTCCCTTC
Bcl2	Sentido	CAGGTATGCACCCAGAGTGA
	Antisentido	GTCTCTGAAGACGCTGCTCA
BAD	Sentido	GCCCTAGGCTTGAGGAAGTC
	Antisentido	CAAACCTCTGGGATCTGGAACA
BAX	Sentido	GTGAGCGGCTGCTTGTCT
	Antisentido	GGTCCCGAAGTAGGAGAGGA
XIAP	Sentido	GCTTGCAAGAGCTGGATTTT
	Antisentido	TGGCTTCCAATCCGTGAG
AIF	Sentido	AGTCCTTATTGTGGGCTTATCAAC
	Antisentido	TTGGTCTTCTTTAATAGTCTTGTAGGC
NIAP	Sentido	GAGAGGTGGCACAGTCAGGT

---

	Antisentido	TAAAACGGCCAGTCCTCAA
NFkB1	Sentido	CAGCTCTTCTCAAAGCAGCA
	Antisentido	TCCAGGTCATAGAGAGGCTCA
NFkB2	Sentido	TGGAACAGCCCAAACAGC
	Antisentido	CACCTGGCAAACCTCCAT
NKAP	Sentido	CGAGCTCTAAAGAGTCCCAAGA
	Antisentido	CCTCTGGGCCAATCAAATC
Glucagon	Sentido	CACGCCCTTCAAGACACAG
	Antisentido	GTCCTCATGCGCTTCTGTC
GLUT-2	Sentido	TGTGATCCAGTGAGTCTCCAA
	Antisentido	GGCGCACATCTATAATGCTCT
Insulin	Sentido	AGCAAGCAGCTCATTGTTCC
	Antisentido	TTGCGGGTCCTCCACTTC
Somatostatin	Sentido	CTGGAGCCTGAGGATTTC
	Antisentido	CTGCAGCCTGAGCCTCAT
Sirtuin 1	Sentido	TCGTGGAGACATTTTTAATCAGG
	Antisentido	GCTTCATGATGGCAAGTGG
FoxO 1	Sentido	CTTCAAGGATAAGGGCGACA
	Antisentido	GACAGATTGTGGCGAATTGA
FoxO 3A	Sentido	GCTAAGCAGGCCTCATCTCA
	Antisentido	TCCGTCAGTTTGAGGGTCT
IRS 1	Sentido	TCGTGGAGACATTTTTAATCAGG
	Antisentido	GCTTCATGATGGCAAGTGG
IRS 2	Sentido	CACGCCCTTCAAGACACAG
	Antisentido	GTCCTCATGCGCTTCTGTC

---

---

### Expresión de proteínas

Se realizó por Western blot utilizando anticuerpos específicos para medir la expresión proteica de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-10, HO-1, HO-2, iNOS, eNOS, NF $\kappa$ B p52-100, NF $\kappa$ B p50-105, NF $\kappa$ B p65, I $\kappa$ B-  $\alpha$ , I $\kappa$ B-  $\beta$ , Bcl-2 y BAD.

Las muestras se homogeneizaron en tampón de lisis (100mmol/L NaCl, 10mmol/L TRIS-Cl (pH 7,6) 1mmol/L EDTA (pH 8), 1□g/ml aprotinina, 100□g/ml PMSF). Todas las muestras se diluyeron (1:1) con tampón 2X (100mmol/L TRIS-HCl (pH 6,8), 4% SDS, 20% glicerol, 0,1 azul de bromofenol, 200mmol/L ditiotreitól) y se hirvieron 10 minutos a 100°C. Para corregir posibles variaciones en el tamaño de las muestras se determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford.

Cantidades equivalentes de proteína se sometieron a electroforesis en gel de SDS poliacrilamida (10%). Una vez separadas las proteínas, eran transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad, Mississauga, Ontario) a la que quedan unidas irreversiblemente y donde son más accesibles a los anticuerpos específicos. A continuación las membranas se incubaron 90 minutos a 37°C en un buffer (20mmol/L TRIS, 150 mmol/L NaCl, 0,2% Noninet P 40, 5% leche desnatada) para bloquear la unión inespecífica, y después se incubaron 60 minutos a 20°C en presencia de anticuerpos primarios específicos. Tras un lavado para eliminar el anticuerpo no unido, las membranas se incubaron de nuevo durante 60 minutos a 20°C en presencia de un anticuerpo secundario que reconoce inmunoglobulinas de conejo, acoplado covalentemente a una peroxidasa (horseradish peroxidase-conjugated polyclonal anti-rabbit IgG secondary antibody, Transduction Lab, Lexington, KY).

Tras el lavado de las membranas las proteínas se visualizaron mediante quimioluminiscencia (ECL system, Amersham, Oakville, Ontario).

Esta técnica se ha usado para medir la expresión proteica de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-10, HO-1, HO-2, iNOS, eNOS, NF $\kappa$ B p52-100, NF $\kappa$ B p50-105, NF $\kappa$ B p65, I $\kappa$ B-  $\alpha$ , I $\kappa$ B-  $\beta$ , Bcl-2 y BAD.

---

### Preparación de las muestras (hígado y páncreas)

Las muestras de tejido (50 mg) se transfirieron a tubos eppendorf con tampón de lisis (1 mmol/L phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF; Sigma Chemical Company), 1 µg/mL pepstatina A (Sigma Chemical Company), aprotinina (Sigma Chemical Company) y leupeptina (Sigma Chemical Company) in 1x tampón fosfato a pH 7.2 (Biofluids, Rockville, Md) conteniendo 0.05% azida sódica (Sigma Chemical Company)) a 4°C y se homogenizaron durante 30 segundos con un homogenizador eléctrico (Polytron; Brinkmann Instruments, Westminster, NY). A continuación, las muestras se sonicaron y congelaron en una mezcla de nieve carbónica y acetona. Este protocolo se repitió tres veces para optimizar la extracción. Tras la centrifugación (a 10000g, 1h, 4°C para separar los restos celulares) se recogió el sobrenadante que se congeló a -80°C hasta el momento de las determinaciones

### Determinación de la concentración de citoquinas en tejidos

Se realizó mediante un método inmuno-enzimático utilizando Kits comerciales específicos (Biosource International).

Se han determinado por este método: TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-2, MCP1, IL-4 e IL-10 en los homogenizados de páncreas mediante kits de ELISA siguiendo las instrucciones del fabricante (BioNOVA Científica Ltd, Madrid, Spain).

El fundamento de este método se basa en la unión específica de la proteína contenida en la muestra a anticuerpos monoclonales específicos inmovilizados sobre la superficie de placas de titulación. Para ello las muestras y estándares apropiados se incubaron con el anticuerpo primario. Después de un lavado para eliminar todas las sustancias no unidas que pudiesen interferir con el ensayo, se añadió un segundo anticuerpo específico para el primero y conjugado con biotina y se realizó

---

una segunda incubación. Tras la eliminación por lavado del segundo anticuerpo no unido, se incubaron de nuevo en presencia de un complejo estreptavidina-peroxidasa y se cuantificó la citoquina unida por una reacción enzimática que originó cambios de color detectables en el espectrofotómetro.

### Óxido Nítrico (NO)

Se determinó como contenido de nitrito + nitrato (NO<sub>2</sub>-+ NO<sub>3</sub>-). Para ello, las muestras se desproteinizaron por adición de ácido sulfosalicílico y se incubaron durante 30 minutos a 4°C. Tras centrifugación a 12000 x g durante 20 minutos, se separó el sobrenadante y se incubó en presencia de nitrato-reductasa para la reducción de nitrato a nitrito. A continuación se añadió a las muestras reactivo de Griess (0,5% naphylethylenediamine dihydrochloride, 5% sulfonilamide, 25% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>).

La reacción se llevó a cabo a 22°C durante 20 minutos, y se leyó su absorbancia a 546 nm utilizando una solución de NaNO<sub>2</sub> como estándar (Vara y cols., 1996).

### Niveles de insulina en plasma y páncreas

Se determinaron mediante una técnica de radioinmunoanálisis (RIA) utilizando kits comerciales específicos (Roche)

---

### Niveles de glucosa en plasma

La determinación cuantitativa de la glucosa en plasma se hizo con la prueba colorimétrica de la enzima Glucosa Oxidasa-Peroxidasa. Para ello se utilizó un kit comercial (Glucosa assay Kit, Sigma).

### Ácidos grasos libres en plasma

La concentración plasmática de ácidos grasos libres se hizo por el método enzimático (NEFA ACS-ACOD Method, Wako Chemicals GmbH) siguiendo las instrucciones del fabricante.

### Hidroperóxidos de Lipidos (LPO)

Se determinaron utilizando un kit específico (K-assay LPO -CC, Kamiya Biochemical Company, USA). Se basa en la reacción de los LPO con el cromógeno MCDP (10-N-metilcarbamoil-3-7-dimetilamino-10-10-fenotiacina) en una reacción enzimática catalizada por la hemoglobina en la que los LPO son reducidos a derivados hidroxílicos y el MCDP se oxida a azul de metileno en una reacción equimolar: Los LPO son así cuantificados colorimetricamente midiendo la absorbancia de las muestras a 675 nm.

### Enzimas antioxidantes (GPx, GST, GR, SOD)

Se midieron por un método espectrofotométrico utilizando Kits comerciales específicos (Biosource International).

---

## Glutación

Se dividió la muestra en dos fracciones, una para determinar glutación total y otra para glutación oxidado. La valoración se llevó a cabo por la técnica descrita por Tietze en 1969 (Tietze, 1969). El glutación reducido se calculó por diferencia entre el glutación total y el oxidado.

## **Análisis estadístico**

Los resultados se han expresado como Media  $\pm$ ESM (error estándar de la media). El análisis se realizó mediante la comparación de medias por métodos no paramétricos. Para las comparaciones entre grupos se ha empleado el test de Crucial-Wallis de análisis de la varianza por rangos, seguido en caso de dar significación, del test de May-Whitney para muestras independientes, con el fin de identificar el origen de las diferencias. Se consideraron resultados significativos y muy significativos unas confianzas superiores o iguales al 95% ( $p < 0.05$ ) y 99% ( $p < 0.01$ ) respectivamente.



---

# *Resultados*

---

# *Hígado*

---

El proceso de envejecimiento está asociado con inflamación, activación de NFkB, aumento de la apoptosis y aumento en la tasa de producción de radicales libres. Junto a todo esto se ha observado un descenso en la actividad de muchas hormonas como la hormona de crecimiento y la melatonina.

El hígado, debido a su situación anatómica y a sus múltiples funciones bioquímicas, tiene un papel central en el mantenimiento la homeostasis del organismo. Por ello, hemos decidido investigar el posible papel de estos mediadores en los efectos deletéreos del envejecimiento hepático.

El envejecimiento indujo un incremento de la expresión de mRNA del TNF- $\alpha$  en el hígado de ratones SAMP8 viejos comparados con los observados en animales jóvenes de la misma cepa ( $p < 0.01$ ). Este efecto de la edad no fue observado en ratones SAMR1, resistentes al envejecimiento. Un efecto similar fue observado cuando se estudió la expresión de la proteína ( $p < 0.001$ ) (**Figura 1a, Artículo I**)

Aunque la expresión de mRNA de IL1 $\beta$  también mostró una tendencia a aumentar en el hígado de ratones SAMP8 viejos comparados con animales jóvenes, hubo una gran dispersión en los resultados y la diferencia no llegó a ser significativa. Sin embargo cuando se determinó la expresión de la proteína por Western-Blot se observó un aumento significativo de esta citoquina con la edad (**Figura 1b, Artículo I**). Lo mismo que en el caso del TNF $\alpha$ , el envejecimiento no modificó la expresión de IL1 $\beta$  en ratones SAMR1.

No se observaron diferencias en la expresión de la citoquina antiinflamatoria, IL-10 entre animales jóvenes y viejos en ninguna de las dos cepas (**Figura 1c, Artículo I**).

El análisis comparativo de las dos cepas de ratones muestra que los ratones SAMP8 viejos presentan una mayor expresión de las tres citoquinas estudiadas que los SAMR1 de la misma edad (**Figura 1, Artículo I**)

---

El factor de transcripción nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) es un regulador transcripcional que parece jugar un papel central en la respuesta a los mediadores inflamatorios incluyendo las citoquinas. La expresión de mRNA de NF $\kappa$ B, NF $\kappa$ B 2 y NKAP fue mayor en los ratones SAMP8 comparados con los SAMR1 ( $p < 0.001$ ). El envejecimiento aumentó la expresión de NF $\kappa$ B, NF $\kappa$ B 2 y NKAP en los ratones SAMP8 ( $p < 0.001$ ) mientras que en los SAMR1 solo se observan diferencias entre jóvenes y viejos en la expresión de NKAP, aunque se siguen observando valores menores que en los SAMP8 ( $p < 0.001$ ) (**Figura 5, Artículo I**).

El MCP-1 es una proteína quimiotáctica, que junto con las moléculas de adhesión, contribuye a la migración de las células inflamatorias hacia el órgano diana, contribuyendo al aumento del estrés oxidativo y amplificando la respuesta inflamatoria. En este trabajo, hemos determinado la expresión de MCP-1 en el hígado de ratones SAMP8 y SAMR1 de 2 y 10 meses de edad. La expresión de este mRNA fue significativamente más alta en los animales SAMP8 viejos ( $p < 0.02$ ) al compararlos con los jóvenes de la misma cepa, mientras que en los ratones SAMR1 no se han observado diferencias significativas entre animales jóvenes y viejos. El análisis comparativo de las dos cepas de ratones de nuevo muestra que los ratones SAMP8 viejos ( $p < 0.05$ ) tienen mayores niveles que los SAMR1 de la misma edad (**Figura 2, Artículo I**).

Como ya se ha dicho, el NO puede jugar un papel importante como mediador de los efectos de las citoquinas. Cuando estudiamos la actividad nitrato sintasa, se han encontrado diferencias significativas en la expresión de mRNA de la isoforma inducible, iNOS, entre ambas cepas de ratones (SAMR1 y SAMP8) siendo mayores los valores en los SAMP8 ( $p < 0.05$ ) tanto en animales jóvenes como en viejos. Sin embargo, no se observaron diferencias en la expresión del mRNA entre jóvenes y viejos en la misma cepa. La expresión del mRNA de las isoformas constitutivas fue similar en todos los grupos (**Figura 3, Artículo I**).

Al analizar la expresión proteica observamos una disminución de la expresión de nNOS en los animales viejos al igual que lo observábamos en la expresión del mRNA aunque no era estadísticamente significativo y un aumento con el tratamiento con melatonina (**Tabla IV**).

	SAMP8					SAMR1	
	Jóven	Viejo	GH	Mel	GH+Mel	Jóven	Viejo
eNOS (u.a)	1.24±0.48	1.11±0.14	1.20±0.17	0.93±0.16	1.67±0.22	0.92±0.13	0.79±0.04
nNOS (u.a)	1.44±0.607	0.49±0.08	0.57±0.14	0.64±0.11	2.04±0.73	0.51±0.07	0.49±0.08
nNOS (OD*mm2)	9.20±2.15	5.14±0.80		10.97±3.34		3.61±0.56	4.61±1.42

u.a. unidades arbitrarias

**Tabla IV.** Expresión del mRNA de eNOS y nNOS, además de expresión proteica de nNOS en el hígado de ratones.

El CO es un gas que puede formarse endógenamente y comparte muchos de los efectos del NO. La principal fuente de CO es la degradación del grupo hemo por acción de la hemooxigenasa (HO). En este estudio hemos observado que la expresión de mRNA de HO-1 (isoforma inducible) aumentó en los animales SAMP8 con la edad ( $p<0.001$ ). Por el contrario, la expresión de la proteína, determinada por Western blot, fue menor. No hemos encontrado diferencias significativas en la expresión de HO-1 entre animales jóvenes y viejos en los ratones SAMR1. La expresión de HO-2 aumentó con la edad en ambas cepas de ratones, SAMP8 y SAMR1 ( $p<0.001$ ). Además, los valores observados en los animales SAMP8 son mayores que los encontrados en los SAMR1 tanto de la expresión de la proteína como del mRNA ( $p<0.001$ ) (**Figura 4, Artículo I**).

La edad también indujo un aumento significativo de los niveles de proteínas oxidadas y MDA inducido por la edad en los ratones SAMP8 ( $p<0.05$ ) (**Tabla V**). En los ratones SAMR1 no se observó este efecto de la

edad y tampoco se han encontrado diferencias significativas entre ambas cepas de ratones.

SAMP8						SAMR1	
	Jóven	Viejo	GH	Mel	GH+Mel	Jóven	Viejo
<b>Prot. ox</b>	46.56±10.05	69.16±9.59*	44.93±4.07 <sup>#</sup>	35.74±9.71	75.02±18.56	64.23±16.04	74.49±12.69
<b>MDA</b>	0.099±0.03	0.29±0.11*	0.136±0.047 <sup>#</sup>	0.128±0.04	0.15±0.13	0.06±0.025	0.122±0.07

**Tabla V.** Niveles de proteínas oxidadas y MDA en el hígado de ratones.

No se han observado diferencias significativas en la expresión del mRNA de Bcl-2, BAD ni BAX durante el proceso de envejecimiento en los ratones de ninguna de las dos cepas utilizadas en este estudio (**Tabla VI**).

SAMP8						SAMR1	
(u.a)	Jóven	Viejo	GH	Melatonina	GH+Mel	Jóven	Viejo
<b>Bcl-2</b>	1.12±0.27	1.23±0.16	1.18±0.27	0.81±0.05	1.76±0.30	0.68±0.07	0.71±0.049
<b>BAD</b>	0.65±0.22	0.42±0.03	0.30±0.08	0.26±0.02	0.65±0.21	0.518±0.06	0.61±0.06
<b>BAX</b>	1.04±0.18	0.82±0.08	0.62±0.11	0.72±0.06	0.81±0.06	0.76±0.06	0.61±0.03

**Tabla VI.** Expresión del mRNA de Bcl-2, BAD y BAX en el hígado de ratones.

Los efectos del envejecimiento fueron parcialmente bloqueados por los tratamientos con GH y/o melatonina.

La melatonina disminuyó la expresión tanto de mRNA ( $p < 0.01$ ) como de la proteína ( $p < 0.001$ ) de TNF- $\alpha$ , IL1 $\beta$ , y MCP1 ( $p < 0,05$ ). Por el contrario, aumentó la expresión de la citoquina antiinflamatoria IL10 ( $p < 0.001$ ). La

---

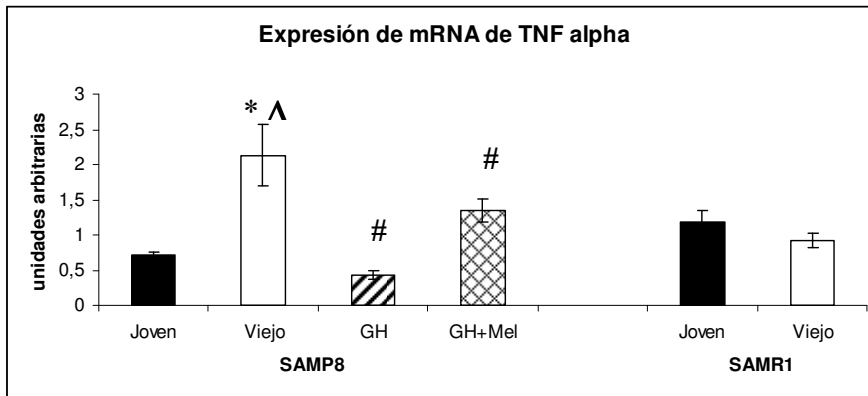
expresión de NFkB1, NFkB 2 y NKAP también fue significativamente menor ( $p<0,001$ ) en los animales tratados con melatonina, también redujo significativamente la expresión de iNOS ( $p<0.05$ ), HO-2 ( $p<0.001$ ) y HO-1 ( $p<0.05$ ) y los niveles de proteínas oxidadas ( $p<0.05$ ) y de MDA ( $p<0.05$ ). Al igual que el tratamiento con GH no se observaron efectos en el proceso de apoptosis.

En resumen, el tratamiento con melatonina redujo significativamente la expresión de mediadores proinflamatorios y de estrés oxidativo en el hígado de animales viejos, sugiriendo un posible efecto protector de la melatonina frente al daño hepático secundario al envejecimiento.

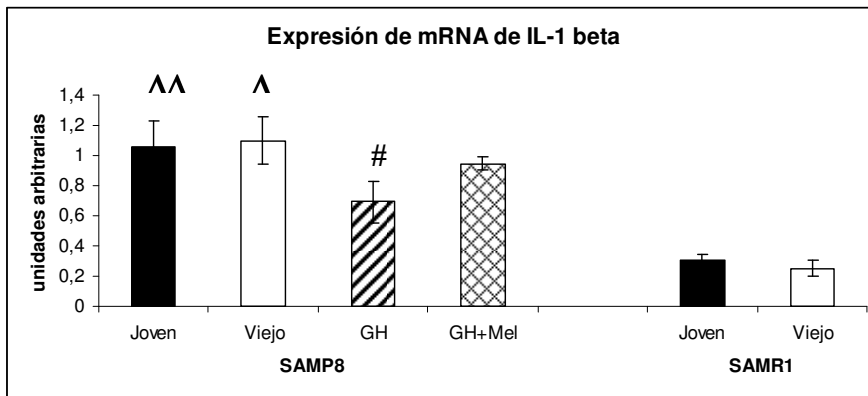
La administración de GH ejerció un efecto protector en el hígado frente al envejecimiento, ya que redujo la expresión de TNF- $\alpha$  ( $p<0.05$ ), de IL-1 $\beta$  ( $p<0.05$ ) y de MCP1 ( $p<0.05$ ), en cambio el tratamiento no fue capaz de modificar la expresión de IL-10 (**Figura I**). Si que disminuyó de forma significativa la expresión génica de iNOS ( $p<0.05$ ) y HO-2 ( $p<0.05$ ) (**Figura III**), y los niveles de proteínas oxidadas ( $p<0.05$ ) y MDA ( $p<0.05$ ) (**Tabla II**). El tratamiento también redujo la expresión de NFkB 1, NFkB 2 y NKAP de manera significativa ( $p<0.001$ ) (**Figura II**). El tratamiento no ejerció ningún efecto en cuanto al proceso de apoptosis (**Tabla III**).

El tratamiento combinado de GH con melatonina disminuyó la expresión de TNF- $\alpha$  (**Figura VIII**) y de todas las subunidades del factor de transcripción NFkB (**Figura IX**). Por otra parte el tratamiento combinado es capaz de aumentar la síntesis del mRNA de HO-1 (**Figura X**). Sin embargo no se observa efecto en cuanto a las expresiones de IL-1 $\beta$ , IL-10 y MCP1 (**Figura VIII**), iNOS y HO-2 (**Figura X**). Por todo ello podemos decir que el tratamiento combinado no presenta efectos aditivos claros y no supone, a priori, ninguna ventaja.

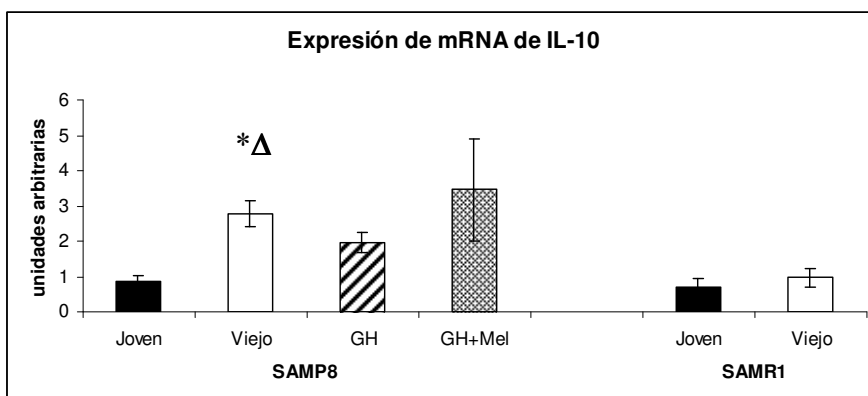
Figura VIII



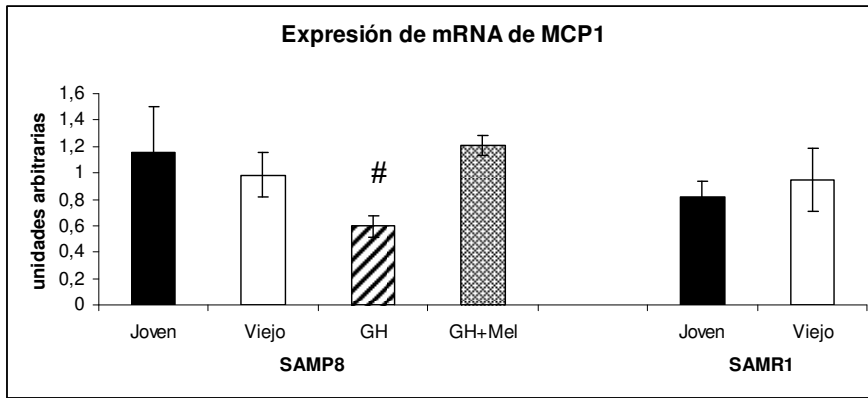
\*  $p < 0.01$  vs jóvenes SAMP8  
 $\Delta$   $p < 0.01$  vs viejos SAMR1  
 $\#$   $p < 0.05$  vs viejos SAMP8



$\Delta\Delta$   $p < 0.01$  vs jóvenes SAMR1  
 $\Delta$   $p < 0.01$  vs viejos SAMR1  
 $\#$   $p < 0.05$  vs viejos SAMP8

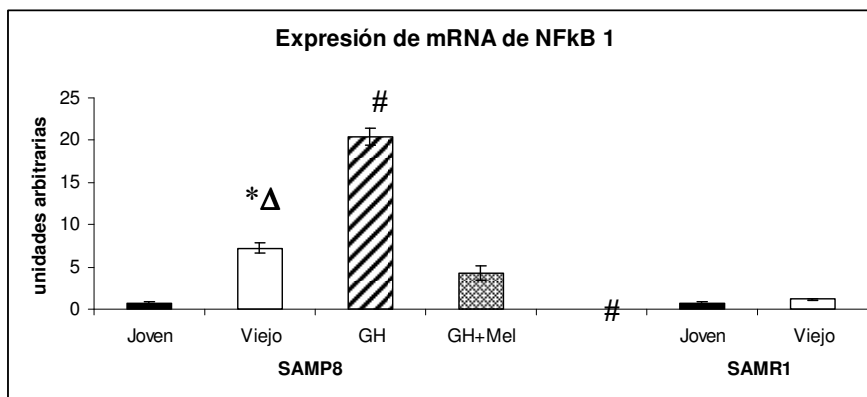


\*  $p < 0.05$  vs jóvenes SAMP8  
 $\Delta$   $p < 0.01$  vs viejos SAMR1

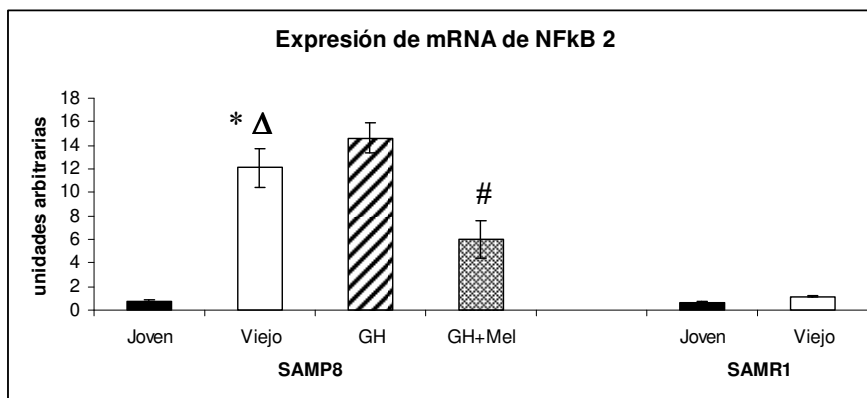


<sup>#</sup> p<0.05 vs viejos SAMP8

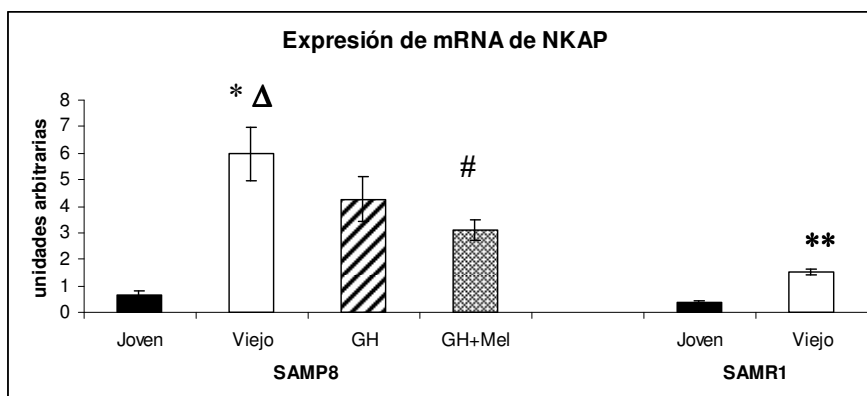
**Figura IX**



\*  $p < 0.001$  vs jóvenes SAMP8  
 #  $p < 0.001$  vs viejos SAMP8  
 Δ  $p < 0.01$  vs viejos SAMR1

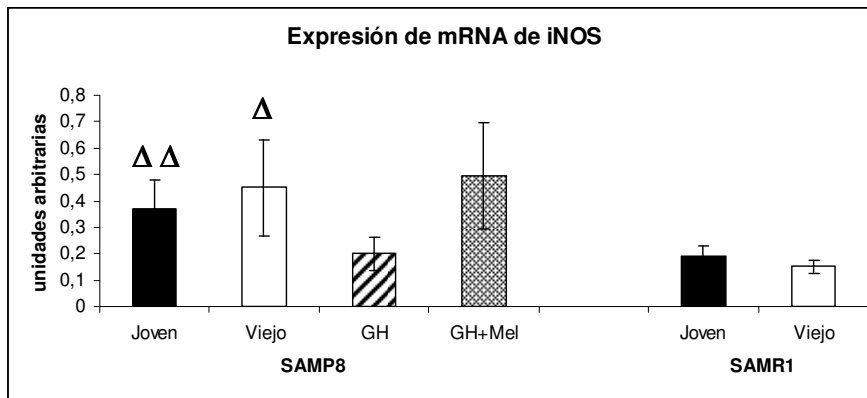


\*  $p < 0.001$  vs jóvenes SAMP8  
 Δ  $p < 0.001$  vs viejos SAMR1  
 #  $p < 0.05$  vs viejos SAMP8



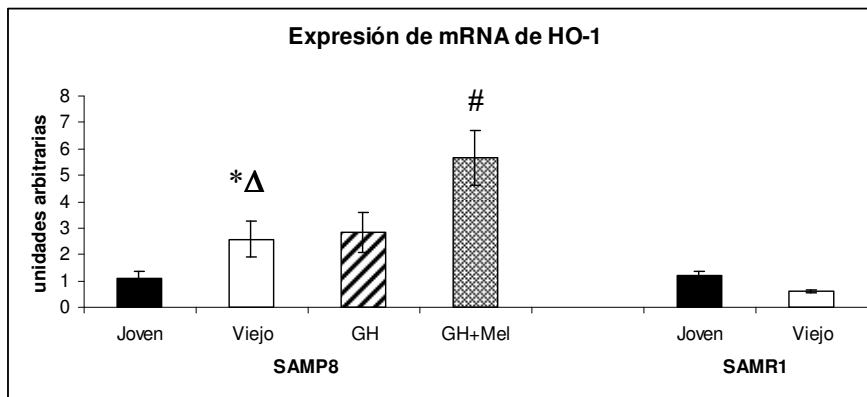
\*  $p < 0.001$  vs jóvenes SAMP8  
 Δ  $p < 0.001$  vs viejos SAMR1  
 #  $p < 0.05$  vs viejos SAMP8  
 \*\*  $p < 0.001$  vs jóvenes SAMR1

**Figura X**



Δ p<0.05 vs viejos SAMR1

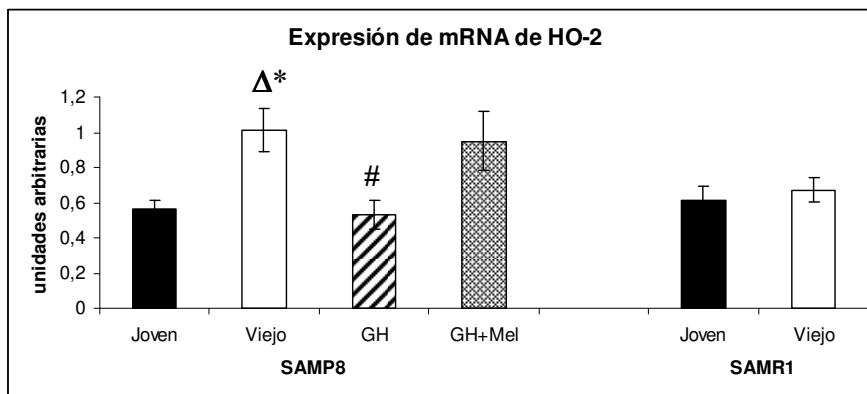
ΔΔ p<0.05 vs jóvenes SAMR1



\* p<0.001 vs jóvenes SAMP8

# p<0.05 vs viejos SAMP8

Δ p<0.01 vs viejos SAMR1



\* p<0.05 vs jóvenes SAMP8

Δ p<0.001 vs viejos SAMR1

# p<0.05 vs viejos SAMP8

---

# *Páncreas*

---

Hemos investigado en primer lugar el efecto del envejecimiento sobre diferentes parámetros relacionados con la homeostasis de la glucosa y los fenómenos de proliferación y diferenciación en las células pancreáticas.

Estudiamos el contenido pancreático de insulina, además de los niveles de glucosa e insulina plasmáticos. Observamos que, mientras que la concentración de glucosa no varía con la edad en ninguna de las dos cepas de animales, si que se produce un aumento de los niveles plasmáticos de insulina en los ratones SAMP8 ( $p < 0.0004$ ). Al analizar el contenido pancreático de insulina observamos que disminuye con la edad en los ratones SAMP8 ( $p < 0.001$ ) mientras que en los ratones SAMR1 se observa un aumento con la edad ( $p < 0.001$ ). Aunque no se observaron diferencias en los niveles de glucosa plasmáticos en ninguna de las dos cepas de ratones, el índice HOMA-IR si que aumentó significativamente en los ratones SAMP8 con el envejecimiento ( $p < 0.01$ ). Este índice también es mayor en los SAMP8 viejos al compararlos con los SAMR1 de la misma edad ( $p < 0.01$ ) (**Tabla 2, Artículo II**).

El envejecimiento provocó un aumento significativo de la expresión del mRNA de glucagon ( $p < 0.05$ ) en el páncreas de ratones SAMP8 viejos comparados con los observados en animales jóvenes de la misma cepa ( $p < 0.01$ , **Fig1, Artículo II**). Este efecto de la edad no fue observado en ratones SAMR1, resistentes al envejecimiento. Aunque la expresión de mRNA de insulina ( $p < 0.001$ ) y somatostatina ( $p < 0.0001$ ) es mayor en el páncreas de los animales jóvenes SAMP8 que en los SAMR1 de la misma edad (**Figura 2, Artículo II**), no se observaron diferencias en la expresión del mRNA de estas hormonas entre animales jóvenes y viejos en ninguna de las dos cepas (**Figura 2, Artículo II**).

El GLUT-2 actúa como sensor de glucosa en las células  $\beta$  lo que conduce a la liberación de insulina. Se han encontrado diferencias en la expresión del mRNA de GLUT-2 entre ambas cepas de ratones (SAMR1 y SAMP8)

---

siendo mayores los valores observados en los animales SAMP8 viejos ( $p < 0.05$ ) (**Figura 1B, Artículo II**). La edad indujo un aumento significativo ( $p < 0.01$ ) de la expresión del mRNA de GLUT-2 en el páncreas de los ratones SAMP8. Sin embargo, no se observaron diferencias en la expresión del mRNA entre jóvenes y viejos en los ratones SAMR1 (**Figura 1, Artículo II**).

El tratamiento con GH bloqueó parcialmente los efectos del envejecimiento sobre la expresión de glucagon ( $p < 0.04$ ), GLUT-2 ( $p < 0.01$ ), insulina ( $p < 0.007$ ) y somatostatina ( $p < 0.05$ ) (**Figuras 1 y 2, Artículo II**).

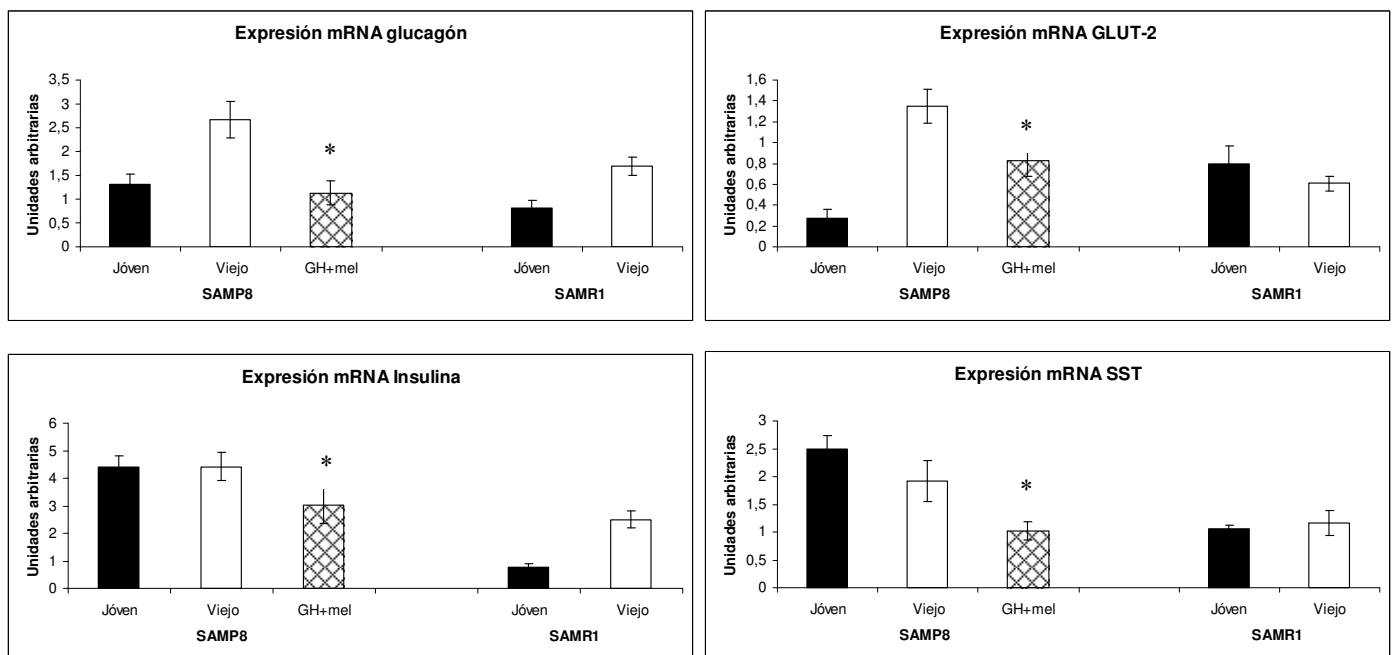
La administración de GH también redujo los niveles plasmáticos de insulina ( $p < 0.0004$ ) (Tabla 2 paper XX) y produjo una disminución del índice HOMA-IR en los ratones SAMP8 viejos ( $p < 0.01$ ) (**Tabla 2, Artículo II**).

Los tratamientos con melatonina a las dos concentraciones (1mg/kg/día y 10mg/kg/día) son capaces de reducir la expresión de glucagon ( $p < 0.05$ ), GLUT-2 ( $p < 0.01$ ), somatostatina ( $p < 0.001$ ) e insulina ( $p < 0.01$ ) en los animales SAMP8 viejos al compararlos con los no tratados (**Figuras 1 y 2, Artículo V**).

Los tratamientos con melatonina son capaces de restaurar los niveles de insulina plasmáticos y el contenido pancreático de manera dosis-dependiente ( $p < 0.05$ ). En los animales SAMR1 el contenido pancreático de insulina disminuye sus valores ( $p < 0.05$ ) con los tratamientos (**Tabla 2, Artículo V**). El tratamiento con melatonina (a las dos dosis) es capaz de disminuir los niveles de glucosa que encontramos en los animales SAMP8 viejos ( $p < 0.05$ ). En la cepa SAMR1 no se han observado diferencias ni con la edad ni con los tratamientos (**Tabla 2, Artículo V**). En cuanto al índice HOMA-IR la administración de melatonina es capaz de reducir este índice

en las dos cepas de ratones de manera dosis-dependiente ( $p < 0.05$ ) (**Tabla 2, Artículo V**).

El tratamiento combinado de GH con melatonina es capaz de reducir la expresión de glucagón ( $p < 0.05$ ), GLUT-2 ( $p < 0.01$ ), somatostatina ( $p < 0.05$ ) e insulina ( $p < 0.05$ ) en los animales SAMP8 viejos al compararlos con los no tratados (**Figura I**).



**Figura I.** Expresión del mRNA de glucagón, GLUT2, Insulina y Somatostatina en animales SAMP8 y SAMR1. Efecto de la administración de GH+Mel en los ratones SAMP8.

El tratamiento combinado de GH con melatonina disminuye los niveles de insulina plasmáticos ( $p < 0.05$ ) y por lo tanto reduce el índice HOMA-IR ( $p < 0.05$ ) (**Tabla I**)

	SAMP8			SAMR1	
	Joven	Viejo	Viejo+GH+Mel	Joven	Viejo
<b>Glucosa (mmol/L)</b>	5.43±0.31	5.80±0.32 <sup>#</sup>	5.69±0.30	4.48±0.69	5.42±0.35
<b>Insulina (mUi/L)</b>	4.72±0.95	14.96±2.57* <sup>#</sup>	10.5±2.20	4.72±0.95	7.47±0.69* <sup>#</sup>
<b>HOMA (I/R)</b>	1±0.17	3.16±0.58* <sup>#</sup>	2.80±0.65	1.25±0.17	1.71±0.13* <sup>#</sup>

**Tabla I.** Niveles de insulina y glucosa plasmáticos.

Hay estudios que relacionan la pérdida de la función pancreática con la disminución del número de células, por lo tanto, al observar que en nuestros ratones se produce una pérdida de la función pancreática, abordamos el estudio de marcadores de proliferación celular como son PCNA y Sei1, pero no se observaron diferencias a este nivel en la expresión de los mRNA. Al estudiar la expresión del mRNA de un marcador de diferenciación celular pancreático (Pdx-1), observamos que la expresión del mRNA de Pdx-1 disminuyó con la edad en ambas cepas ( $p < 0.001$ ) (**Figura 4, Artículo II; Figura 4, Artículo V**). Por lo tanto podemos pensar que el problema que reside en nuestros ratones no es tanto la disminución en el número de células beta sino un fallo en la diferenciación de dichas células.

Al estudiar genes relacionados con la longevidad como son los factores FoxO y sirtuinas observamos que la expresión génica de FoxO 1 ( $p < 0.05$ ) disminuye de manera significativa con la edad en los animales SAMP8. La edad también indujo una disminución de los factores FoxO 3A ( $p < 0.001$ ) e IGF-I ( $p < 0.001$ ) en los ratones SAMP8. Aunque la expresión de mRNA de sirtuina muestra una tendencia a disminuir en el páncreas de ratones SAMP8 viejos comparados con animales jóvenes, la diferencia no llegó a

---

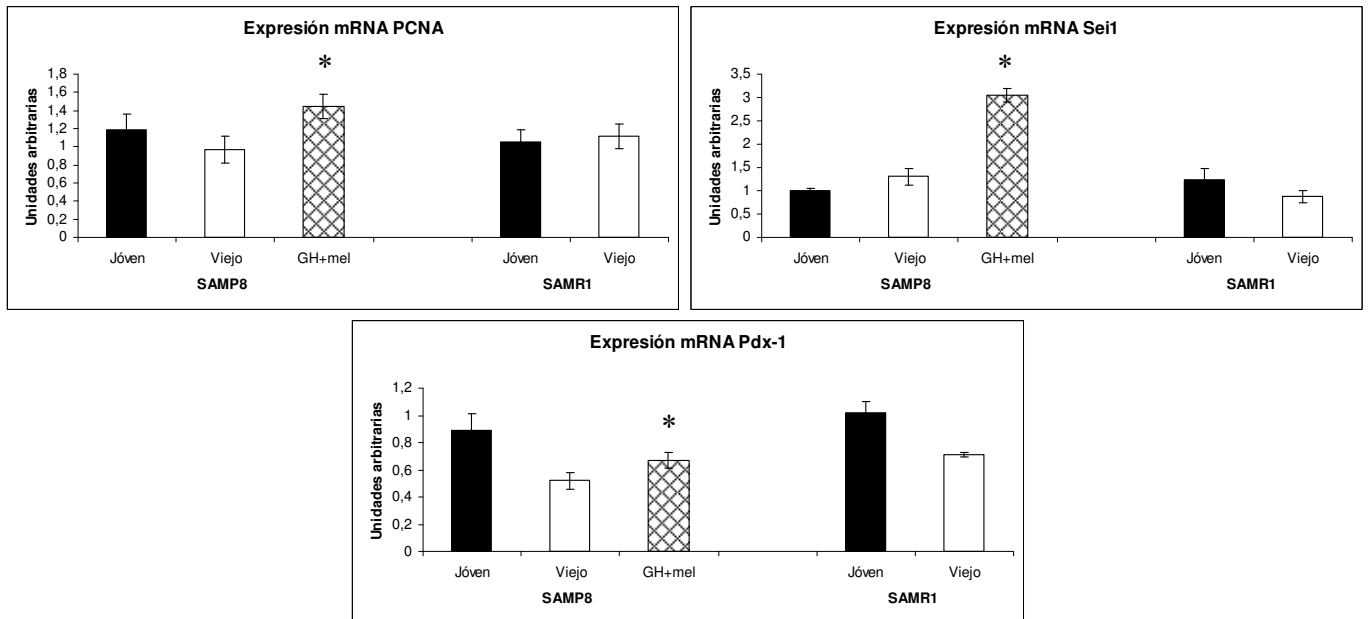
ser estadísticamente significativa (**Figura 3, Artículo II; Figura 3, Artículo V**). No se observaron diferencias en la expresión de estos parámetros entre animales jóvenes y viejos en ratones SAMR1. El análisis comparativo de las dos cepas de ratones muestra que los ratones SAMP8 viejos presentan una mayor expresión de FoxO1 ( $p < 0.05$ ) que los SAMR1 de la misma edad (**Figura 3, Artículo II; Figura 3, Artículo V**). El factor de transcripción forkhead box O1 (FoxO1) desempeña un papel crucial en el mecanismo de señalización de la insulina. De hecho, se ha sugerido una posible vinculación de FoxO1 en la desregulación de la homeostasis de la glucosa y la generación de resistencia a la insulina.

El tratamiento con GH no fue capaz de modificar los marcadores de proliferación celular estudiados pero si que observamos que el tratamiento con GH aumentó la expresión del mRNA de Pdx-1 en los animales SAMP8 ( $p < 0.001$ ) (**Figura 4, Artículo II**). Al igual que aumentó de manera significativa la expresión de FoxO 3A ( $p < 0.001$ ), sirtuina ( $p < 0.05$ ) e IGF-1 ( $p < 0.001$ ) en los animales tratados. La GH no es capaz de modificar la expresión del mRNA de FoxO1 (**Figura 3, Artículo II**).

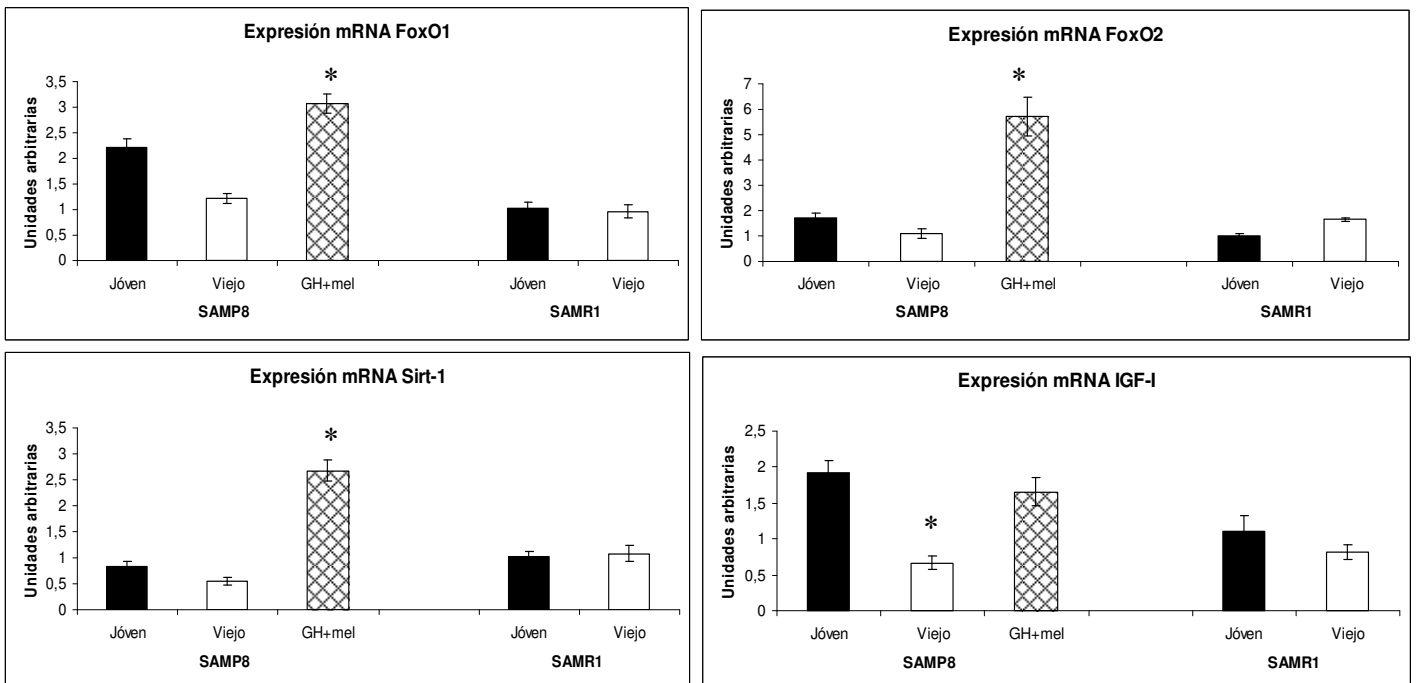
El tratamiento con melatonina aumenta de manera significativa los valores de FoxO 3A ( $p < 0.001$ ), sirtuina ( $p < 0.05$ ) y FoxO1 ( $p < 0.05$ ) en los ratones SAMP8 viejos (**Figura 3, Artículo V**). Se observa un aumento dosis repuesta en la expresión génica de FoxO3A y sirtuina. La administración de melatonina no cambia la expresión de Sei 1 en ninguna de las dos cepas. En cambio, sólo la la melatonina a 10 mg/kg/día es capaz de aumentar la expresión de Pdx-1 ( $p < 0.001$ ) (**Figura 4, Artículo V**).

El tratamiento combinado aumenta la expresión de los mRNAs de los marcadores de proliferación celular estudiados, PCNA y Sei1, además de aumentar la expresión del mRNA de Pdx-1 en los animales SAMP8 ( $p < 0.05$ ) (**Figura II**). Al igual que aumentó de manera significativa la

expresión de FoxO 1 ( $p < 0.05$ ), FoxO 3A ( $p < 0.05$ ), sirtuina ( $p < 0.05$ ) e IGF-1 ( $p < 0.05$ ) en los animales tratados (**Figura III**).



**Figura II.** Expresión del mRNA de genes relacionados con la proliferación (PCNA y Sei1) y con la diferenciación (Pdx-1) en el páncreas de ratones. Efecto del tratamiento combinado de GH con melatonina.



**Figura III.** Expresión del mRNA de genes relacionados con la longevidad en el páncreas de ratones. Efecto del tratamiento combinado de GH con melatonina.

---

Se acepta generalmente que con la edad se produce un desbalance entre factores anti- y pro-inflamatorios a favor de estos últimos, dando lugar a un estado pro-inflamatorio persistente que produciría daño tisular. Este daño podría ser debido a un aumento de las citoquinas proinflamatorias y/o quimioquinas además del estrés oxidativo. Este aumento parece estar mediado, al menos en parte, a través de la activación del factor de transcripción NFκB el cual parece jugar un papel central en la inflamación.

Para investigar el posible papel de estos mediadores pro-inflamatorios en los efectos deletéreos del envejecimiento pancreático, hemos estudiado en primer lugar, la expresión de citoquinas (mRNA y proteína).

El envejecimiento indujo un aumento estadísticamente significativo tanto de la expresión de mRNA como de proteína de las citoquinas proinflamatorias IL-1β (p<0.5) y TNF-α (p<0.01) en ratones SAMP8 viejos al compararlos con animales jóvenes (**Figura 1, Artículo III**). Un efecto similar fue observado cuando se determinaron los niveles de estas citoquinas utilizando un método inmunoenzimático (ELISA) (**Tabla 2, Artículo III**). Por el contrario, el envejecimiento redujo significativamente la expresión de la proteína de la citoquina antiinflamatoria IL-10 (p<0.0003), y de nuevo se observó un resultado similar cuando se determinaron los niveles de mediante ELISA (**Tabla 2, Artículo III**).

El envejecimiento también incrementó los niveles de IL-6 e IL-2 (**Tabla 2, Artículo III**). No se han observado diferencias significativas en los niveles de MCP1 e IL-4 con la edad (**Tabla 2, Artículo III**).

En los ratones SAMR1 no se han observado diferencias significativas entre animales jóvenes y viejos ni en la expresión de la proteína, ni en la del mRNA, ni en los niveles pancreáticos de TNFα, IL-1β, IL-10, IL-2, IL-6, MCP1 e IL-4.

---

Diferentes estudios han sugerido que el factor de transcripción nuclear  $\kappa\text{B}$  (NF- $\kappa\text{B}$ ) podría jugar un papel importante en la respuesta a diferentes señales inflamatorias tales como el TNF $\alpha$  y/o la IL-1 $\beta$ . En el citosol, el NF- $\kappa\text{B}$  es inhibido por I $\kappa\text{B}$ . En respuesta a una señal activadora (p ej, la unión de TNF $\alpha$  a su receptor) el I $\kappa\text{B}$  puede ser fosforilado por IKK (I $\kappa\text{B}$  kinasa). Esto induce la degradación de I $\kappa\text{B}$  a través del sistema ubiquitina-proteasoma y el NF- $\kappa\text{B}$  libre puede entonces traslocarse al núcleo potenciando la respuesta inflamatoria.

La expresión de las subunidades de NF $\kappa\text{B}$  se encuentran aumentadas con el envejecimiento en los ratones SAMP8, en los SAMR1 sólo se observan diferencias en la subunidad NF $\kappa\text{B}$  p52, siendo ésta expresión mayor en los animales viejos (**Figura 8, Artículo IV**)

En los ratones SAMP8, la expresión de I $\kappa\text{B}$  alpha disminuyó con la edad ( $p < 0.05$ ); por el contrario, la expresión de la subunidad beta aumentó en estos animales ( $p < 0.05$ ) (**Figura 9, Artículo IV**).

Estos efectos del envejecimiento no se observaron en los ratones SAMR1 en los que la expresión de las distintas subunidades de NF $\kappa\text{B}$  fueron similares en los animales jóvenes y viejos (**Figuras 8 y 9, Artículo IV**).

Se acepta que durante el envejecimiento aumentan los radicales libres y disminuye la defensa antioxidante de los organismos. Se ha analizado la expresión del mRNA y de las proteínas de marcadores secundarios de estrés oxidativo. No se han observado diferencias significativas en la expresión de eNOS ni HO-2 con la edad mientras que la expresión proteica de HO-1 aumenta con el envejecimiento en los ratones SAMP8 de manera significativa ( $p < 0,01$ ) (**Figura 2, Artículo III**). La expresión génica de iNOS aumenta con la edad, al igual que los niveles de NO en los ratones SAMP8 ( $p < 0,05$ ) (**Figura 3, Artículo III**).

Un mediador molecular que ha sido ampliamente implicado en el mecanismo de acción de las citoquinas es el óxido nítrico (NO), un gas sintetizado a partir de Arginina por acción de las nitrato sintasas. En

---

nuestros resultados observamos que la edad aumentó significativamente los niveles de NO en ratones SAMP8 ( $p < 0,05$ ) al compararlos con los observados en los animales jóvenes de la misma cepa (**Figura 6, Artículo IV**). Este aumento de los niveles de NO fue acompañado de un aumento de la expresión del mRNA de la isoforma inducible de la nitrato sintasa, iNOS, ( $p < 0,05$ ) (**Figura 5, Artículo III**), mientras que la expresión de eNOS no se modificó. Tampoco se observaron diferencias en los niveles de NO, ni en la expresión de iNOS entre animales jóvenes y viejos en los ratones SAMR1.

El envejecimiento también indujo un incremento significativo ( $p < 0,01$ ) de la expresión protéica de HO-1 (isoforma inducible de la hemoxigenasa), en los ratones SAMP8 (**Figura 2, Artículo III**) Como en el caso de las nitrato sintasas, el envejecimiento no modificó la expresión de la isoforma constitutiva de la hemoxigenasa, HO-2, (**Figura 2, Artículo III**). Tampoco se observaron diferencias en la expresión de las hemoxigenasas entre animales jóvenes y viejos en los ratones SAMR1 (**Figura 2 y 3, Artículo III**).

Es aceptado que tanto las citoquinas proinflamatorias, como el óxido nítrico y otros radicales libres pueden inducir muerte celular tanto por necrosis como por apoptosis. Actualmente, se cree que estos mediadores podrían contribuir a la muerte celular por regulación de la expresión de factores de sobra conocidos como implicados en la apoptosis. En este trabajo, hemos examinado el efecto de la edad sobre la expresión de genes pro y anti-apoptóticos en el páncreas de ratones SAMP8 y SAMR1.

El envejecimiento aumentó la expresión del mRNA de las proteínas proapoptóticas BAD y BAX ( $p < 0,05$ ) en el páncreas de ratones SAMP8 (Fig 4, paper xxx). Aunque no se observaron diferencias en la expresión de mRNA de la proteína antiapoptótica Bcl-2, con el envejecimiento disminuyó la expresión del mRNA de XIAP (antiapoptótica) ( $p < 0,05$ ) (**Figura 4, Artículo III; Figura 7a, Artículo IV**). No se observaron

---

diferencias significativas entre animales jóvenes y viejos en los ratones SAMR1.

El análisis comparativo de las dos cepas de ratones muestra que los ratones SAMP8 viejos presentan una mayor expresión de estas proteínas que los SAMR1 de la misma edad ( $p < 0.05$ ) (**Figura 4 y 5, Artículo III; Figura 7, Artículo IV**). Como en todos los parámetros estudiados, no es tan importante el resultado neto como el balance entre marcadores pro y anti-apoptóticos, al analizar este ratio (Bcl-2/BAD+BAX) observamos que disminuye en los animales SAMP8 viejos. En cambio, no se han observado diferencias con la edad en la cepa de los ratones SAMR1.

Los efectos del envejecimiento fueron parcialmente bloqueados por los tratamientos con melatonina y/o GH.

La administración de GH también redujo el efecto del envejecimiento sobre la expresión del mRNA ( $p < 0.05$ ) y de la proteína ( $p < 0.01$ ) TNF  $\alpha$ . En el caso de la IL-1 $\beta$  se observa un descenso en la expresión del mRNA ( $p < 0.05$ ). Aunque no se observaron diferencias con la edad en la expresión de la proteína de IL-10, la GH si que aumenta la expresión de esta citoquina, además es capaz de disminuir los niveles de las citoquinas proinflamatorias IL-6, IL-2 y MCP1 a la vez que aumenta los niveles de IL-4 (**Tabla 2, Artículo III**). Estos resultados sugieren un efecto protector de la GH en el páncreas frente a los procesos inflamatorios implicados en el envejecimiento pancreático.

La administración de GH fue capaz de disminuir la expresión de la proteína NF $\kappa$ B p50 ( $p < 0.05$ ) en los ratones SAMP8 viejos pero no ejerce efectos en su precursor (NF $\kappa$ B p105) (**Figura 7, Artículo III**). En cambio, la expresión de NF $\kappa$ B p52 y de su precursor p100 disminuyen con el tratamiento ( $p < 0.05$ ) (**Figura 8, Artículo III**). No se han encontrado diferencias en las expresiones de NF $\kappa$ B p65 (**Figura 6, Artículo III**), I $\kappa$ B alpha e I $\kappa$ B beta (**Figura 9, Artículo III**) con el tratamiento.

---

La expresión de proteínas de HO-1 disminuye con el tratamiento ( $p < 0.01$ ) pero la GH no es capaz de reducir con significancia estadística la expresión de la proteína de eNOS y HO-2 (**Figura 2, Artículo III**).

La expresión del mRNA de iNOS muestra una disminución estadísticamente significativa con el tratamiento con GH ( $p < 0.05$ ) que obviamente va en correlación con lo observado en los niveles de NO en el páncreas (**Figura 3, Artículo III**).

En los ratones SAMR1 no se observan diferencias significativas entre animales jóvenes y viejos en ninguna de las medidas realizadas de HO-1, HO-2, iNOS y eNOS (**Figura 2 y 3, Artículo III**) por lo que no se trataron con GH ya que no es posible mejorar algo que no está dañado.

En cuanto al proceso de apoptosis, el tratamiento con GH es capaz de disminuir la expresión de los mRNA de BAD y BAX ( $p < 0.05$ ) (**Figura 4, Artículo III**). La expresión de los mRNA de genes antiapoptóticos (Bcl-2 y XIAP) no se modifica con el tratamiento (**Figura 5, Artículo III**). Aunque el resultado final es que el ratio de marcadores anti/pro-apoptóticos (Bcl-2/Bax + BAD) aumenta con el tratamiento (**Figura 5, Artículo III**).

Resumiendo, el tratamiento con GH es capaz de disminuir el estado inflamatorio asociado con el envejecimiento en los ratones SAMP8 ya que disminuye la expresión de las citoquinas inflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-4 y MCP1) a la vez que aumenta la expresión de IL-10 e IL-4. Además se observa una disminución de la expresión proteica de los NFkB p50 y p52.

En cuanto a los marcadores de estrés oxidativo la GH es capaz de disminuir la HO-1, iNOS y los valores observados de NO.

El equilibrio entre marcadores pro y anti-apoptóticos está balanceado hacia la antiapoptosis o supervivencia.

---

El tratamiento con melatonina es capaz de disminuir la expresión del mRNA de IL-1 $\beta$  ( $p < 0.05$ ) de manera dosis-dependiente pero no se han observado cambios en la expresión proteica de IL-1 $\beta$  con los tratamientos de melatonina en los ratones SAMP8 (**Figura 1, Artículo IV**). En los SAMR1 no se observan diferencias entre jóvenes y viejos. Al tratar a los animales con melatonina se observa una tendencia a disminuir la expresión de la proteína pero no es estadísticamente significativa (**Figura 1d, Artículo IV**). El análisis comparativo entre las dos cepas de ratones muestra que hay mayores expresiones en los ratones SAMP8 que en los SAMR1.

El tratamiento con melatonina es capaz de disminuir la expresión de la proteína ( $p < 0.05$ ) y del mRNA ( $p < 0.05$ ) de la citoquina pro-inflamatoria TNF- $\alpha$  en los ratones SAMP8. En la cepa de los SAMR1 no se han observado diferencias ni en cuanto a la edad ni con los tratamientos (**Figura 2, Artículo IV**).

Los tratamientos con melatonina son capaces de aumentar la expresión de la proteína de IL-10 de manera dosis-dependiente ( $p < 0.05$ ) en los ratones SAMP8. En los ratones SAMR1 podemos observar un incremento de la expresión de la proteína y de los niveles de IL-10 con la edad ( $p < 0.05$ ). Además observamos que en la cepa de ratones SAMR1 hay una disminución de los niveles de esta citoquina con melatonina ( $p < 0.05$ ) (**Figura 3, Artículo IV**).

En cuanto a la citoquina pro-inflamatoria IL-6 observamos que la melatonina es capaz de disminuir los niveles de ésta tanto en los SAMP8 ( $p < 0.001$ ) como en los SAMR1 ( $p < 0.05$ ). La melatonina es capaz de disminuir los niveles de esta citoquina tanto en los ratones SAMP8 ( $p < 0.001$ ) como en los SAMR1 ( $p < 0.05$ ) (**Figura 4, Artículo IV**).

Con estos resultados podemos resumir que la melatonina es capaz de disminuir el estado inflamatorio asociado a la edad en los ratones SAMP8 disminuyendo citoquinas pro-inflamatorias (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6) y aumentando IL-10 que es anti-inflamatoria. En los ratones SAMR1 los

---

tratamientos con melatonina no ejercen tanto efecto, pero bien es cierto que en estos ratones los cambios asociados a la edad son menores.

En cuanto a la expresión de la proteína de NFkB p65 no se han observado diferencias con el tratamiento con ninguna de las dos dosis pero tampoco se habían observado diferencias entre animales jóvenes y viejos. La expresión de la proteína es menor en los ratones jóvenes SAMP8 al compararlos con los SAMR1 de la misma edad ( $p < 0.05$ ). Tampoco se han encontrado diferencias significativas en la expresión proteica de NFkB p50 en los ratones SAMP8 tratados con melatonina. Los ratones SAMP8 jóvenes tienen menores niveles de esta proteína que los que observamos en los SAMR1 de la misma edad. La expresión de la proteína de NFkB p52 aumenta en los animales SAMP8 viejos ( $p < 0.05$ ) y solamente el tratamiento con la dosis de 10 mg/kg/día es capaz de reducir esta expresión (**Figura 8, Artículo IV**). En los animales SAMR1 no se observan diferencias con los tratamientos con melatonina a ninguna de las dos dosis. No hay diferencias significativas en las otras subunidades en los ratones SAMR1 (**Figura 8, Artículo IV**).

La expresión de la proteína de Ikb alpha disminuye con la edad en los ratones SAMP8 ( $p < 0.05$ ) y la melatonina a las dos dosis aumenta esta expresión ( $p < 0.05$ ). No se han observado diferencias significativas en los ratones SAMR1. Además se observan mayores valores en los ratones SAMP8 jóvenes al compararlos con los SAMR1 de su misma edad. Al contrario de lo observado con Ikb alpha, la expresión de Ikb beta aumenta con el envejecimiento en los ratones SAMP8 ( $p < 0.05$ ) y solo la dosis más alta de melatonina es capaz de disminuir su expresión (**Figura 9, Artículo IV**). No se han encontrado diferencias significativas en las expresiones de estas subunidades en los ratones SAMR1.

No se han observado diferencias en la expresión de la proteína de HO-1 con la dosis de 1 mg/kg/día de melatonina, pero al tratar a los animales con la dosis más elevada (10 mg/kg/día) se observa que disminuye la

---

expresión de HO-1 ( $p < 0.05$ ). No se observan diferencias significativas en los ratones SAMR1 no con la edad ni con los tratamientos. Podemos observar que los ratones SAMR1 tienen mayor expresión proteica de HO-1 que los SAMP8 ( $p < 0.05$ ) (**Figura 5a, Artículo IV**).

La expresión del mRNA de iNOS muestra una disminución estadísticamente significativa con los tratamientos de melatonina ( $p < 0.01$ ). Los animales SAMP8 viejos tienen menor expresión del mRNA de iNOS que los SAMR1 de la misma edad ( $p < 0.01$ ) (**Figura 5b, Artículo IV**). No se observan diferencias significativas entre animales jóvenes y viejos de la cepa de los SAMR1.

La melatonina a 1mg/kg/día no es capaz de ejercer efectos en los niveles de NO pero el tratamiento más elevado es capaz de disminuir los niveles de NO de manera significativa ( $p < 0.05$ ). No se han encontrado diferencias significativas en los ratones SAMR1 ni con la edad ni con el tratamiento (**Figura 6, Artículo IV**).

El tratamiento con melatonina a 1mg/kg/día disminuye la expresión del mRNA de BAD de manera significativa. No se observan diferencias con la dosis más alta de melatonina. Además se observa que la expresión de BAD es mayor en los animales de la cepa SAMP8 ( $p < 0.05$ ) que en la SAMR1 de la misma edad (**Figura 7a, Artículo IV**). En cambio, no se observan diferencias en la expresión del mRNA de Bcl-2 en los ratones SAMP8 con los tratamientos. La expresión del mRNA de Bcl-2 es menor en los ratones SAMR1 jóvenes y viejos al compararlos con los SAMP8 de las mismas edades (**Figura 7b, Artículo IV**).

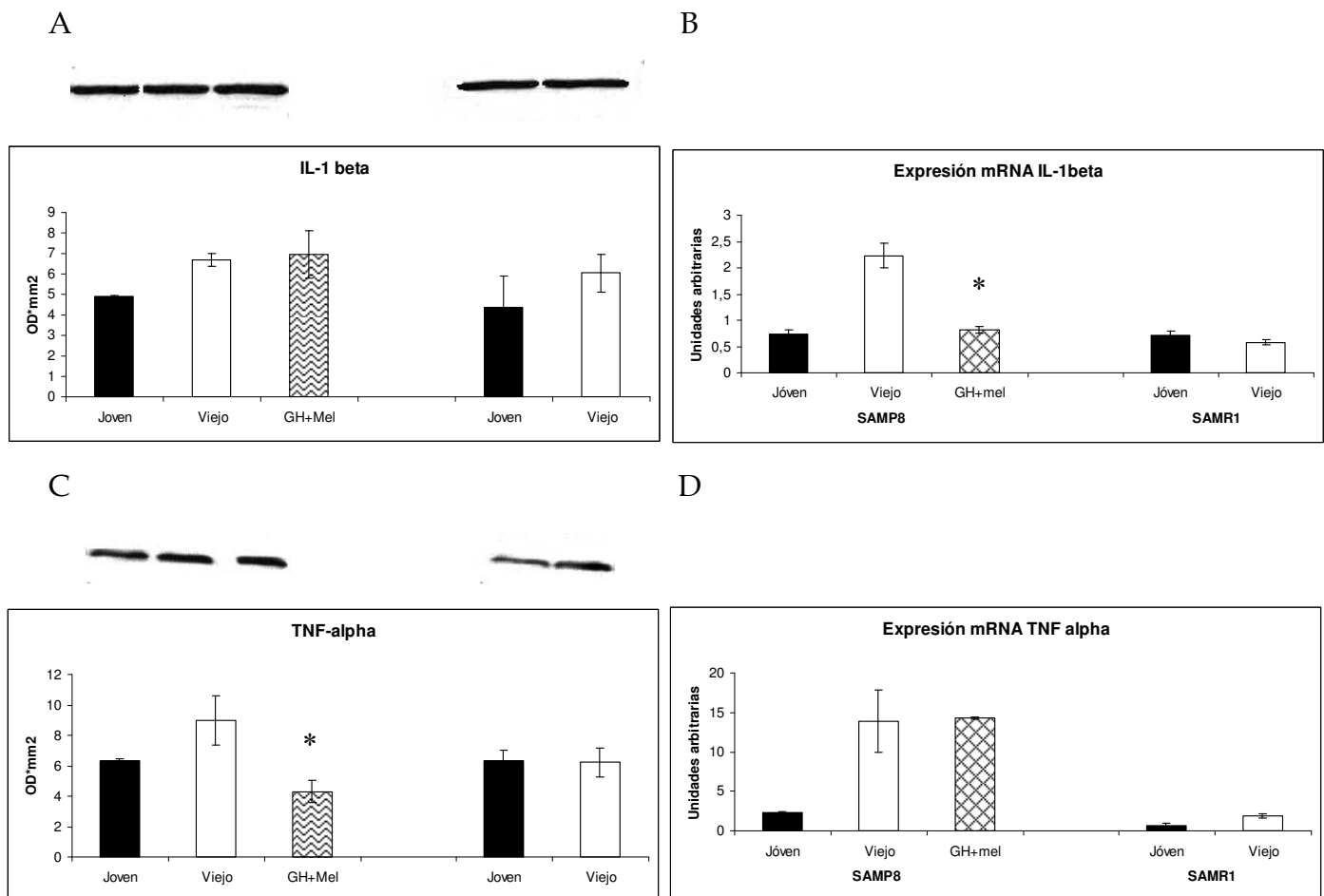
La dosis más elevada de melatonina es capaz de aumentar la expresión del mRNA de XIAP ( $p < 0.05$ ). Además se ha observado que los SAMR1 jóvenes tienen menor expresión de este gen que los SAMP8 de la misma edad ( $p < 0.05$ ) (**Figura 7c, Artículo IV**).

El ratio entre marcadores anti y proapoptóticos (Bcl-2/BAD) aumenta de manera significativa con el tratamiento de 10 mg de melatonina ( $p < 0.05$ ). No se han encontrado diferencias en los ratones SAMR1, si que se observa

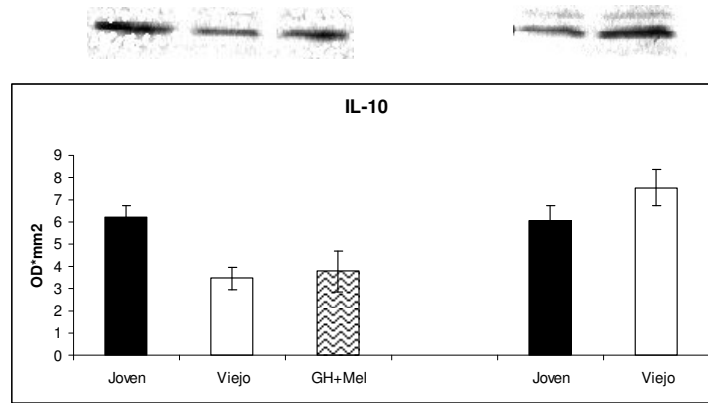
un aumento de la expresión de los ratones SAMP8 jóvenes al compararlos con los SAMR1 de la misma edad (**Figura 7d, Artículo IV**).

Resumiendo podemos decir que la melatonina es capaz de mejorar la función pancreática no sólo mejorando la inflamación asociada a la edad, sino también reduciendo el estrés oxidativo y la apoptosis, a la vez que la actividad de NFkB en los animales SAMP8 viejos.

El tratamiento combinado de GH con melatonina es capaz de disminuir la expresión del mRNA de IL-1 $\beta$  y la expresión de la proteína de TNF- $\alpha$  ( $p < 0.05$ ) en cambio no fue capaz de reducir la expresión de la proteína de IL-1  $\beta$  ni de IL-10. Tampoco fue capaz de ejercer efectos en la expresión del mRNA de TNF-  $\alpha$  (**Figura IV**)

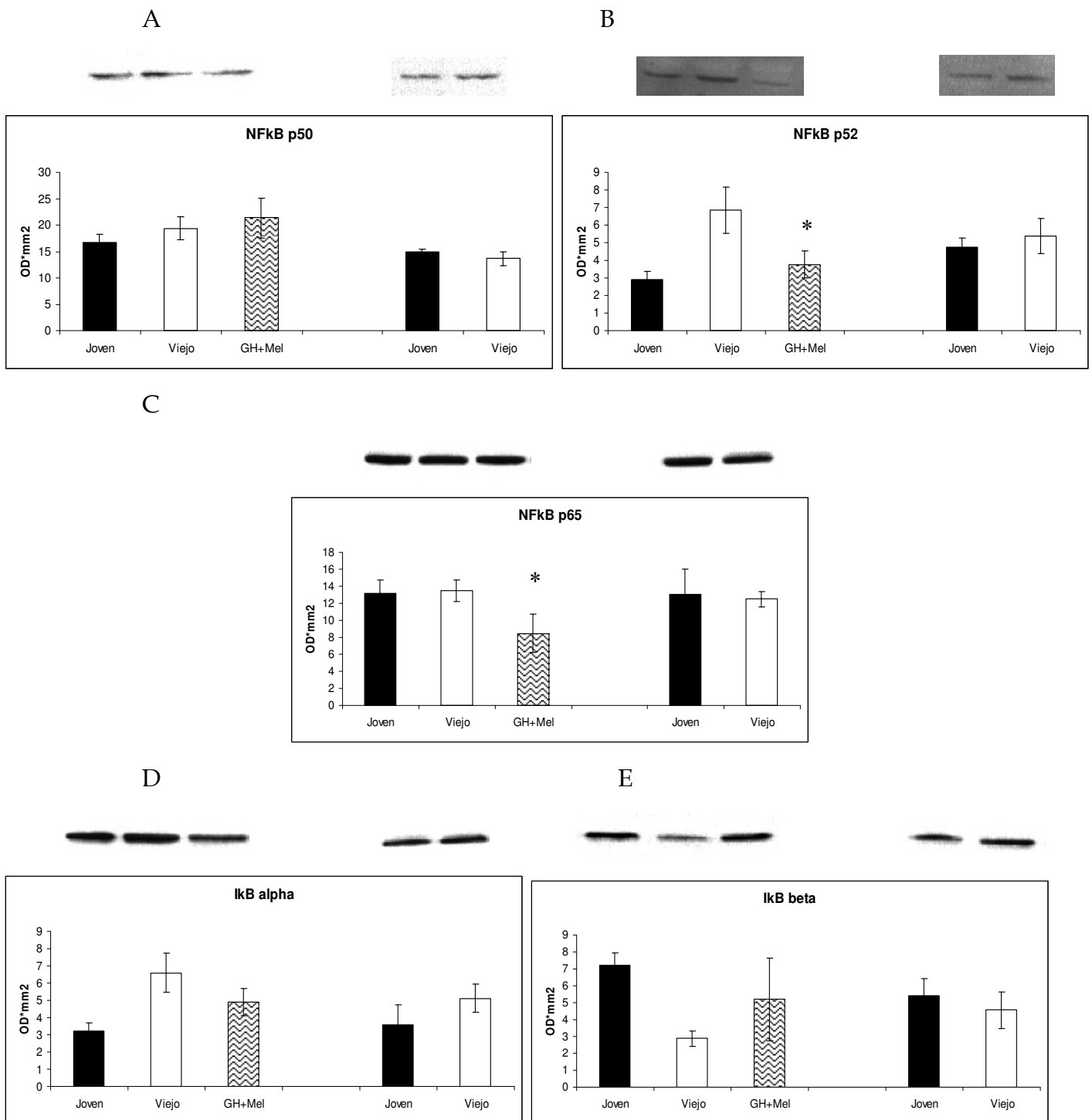


E



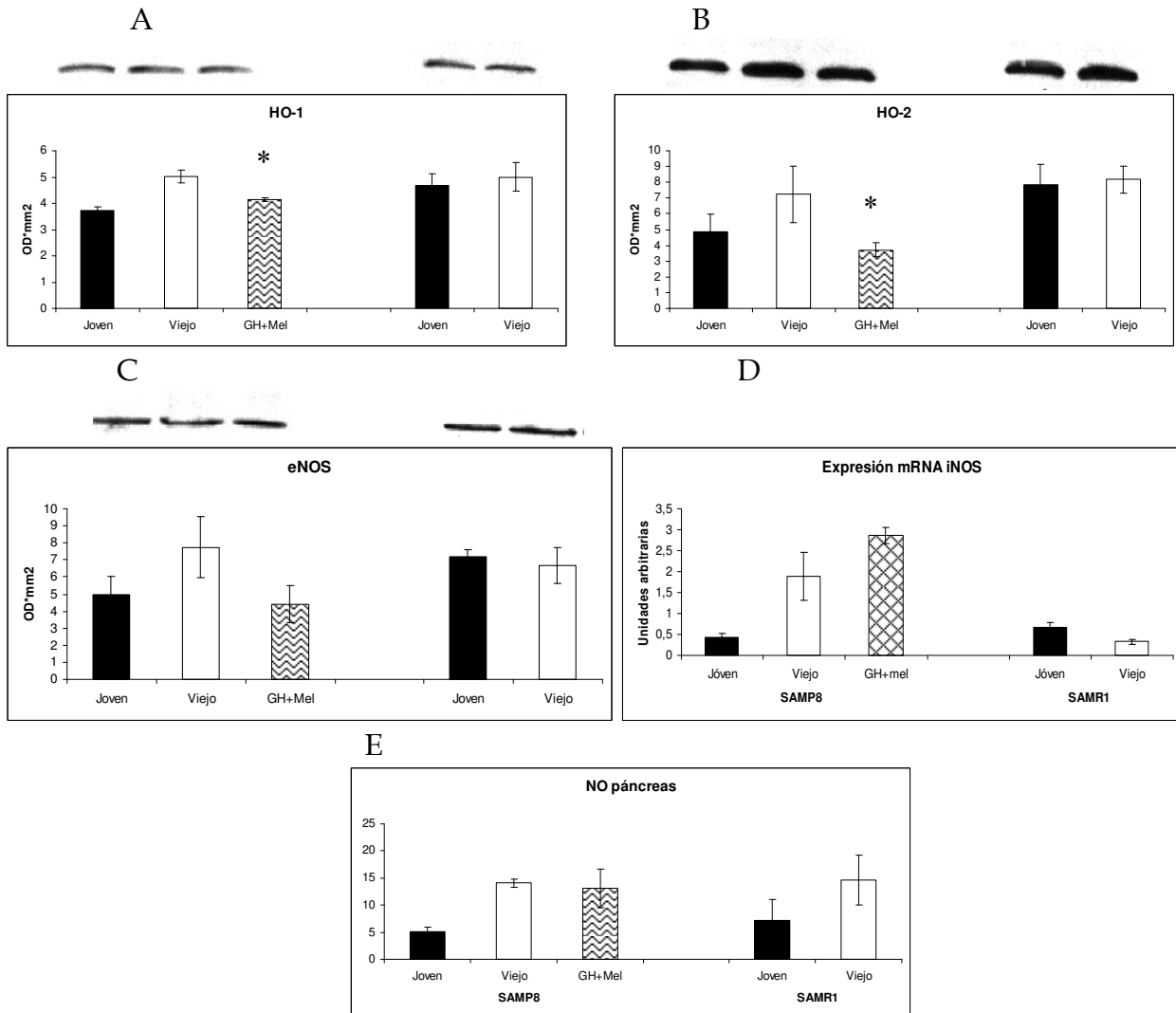
**Figura IV.** Expresión de la proteína y mRNA de IL-1 $\beta$  (A y B) y TNF- $\alpha$  (C y D) como citoquinas inflamatorias. Además estudio de la expresión del mRNA de IL-10 (D) como anti-inflamatoria en el páncreas de dos tipos de ratones. Efecto del tratamiento combinado con GH+melatonina en los ratones SAMP8.

La administración de GH con melatonina no fue capaz de cambiar la expresión de la proteína NFkB p50. En cambio, la expresión de NFkB p52 y NFkB p65 si que disminuyen de manera significativa con el tratamiento ( $p < 0.05$ ). No se han encontrado diferencias significativas en las expresiones de las proteínas de IKB $\alpha$  ni IKB $\beta$  (**Figura V**).



**Figura V.** Expresión de la proteína de las subunidades del factor de transcripción NFκB. NFκB p50 (A), NFκB p52 (B) y NFκB p65 (C). Expresión de las subunidades reguladoras del NFκB: IκBα (D) e IκBβ (E) en el páncreas de dos tipos de ratones y efecto del tratamiento combinado con GH+melatonina en los ratones SAMP8.

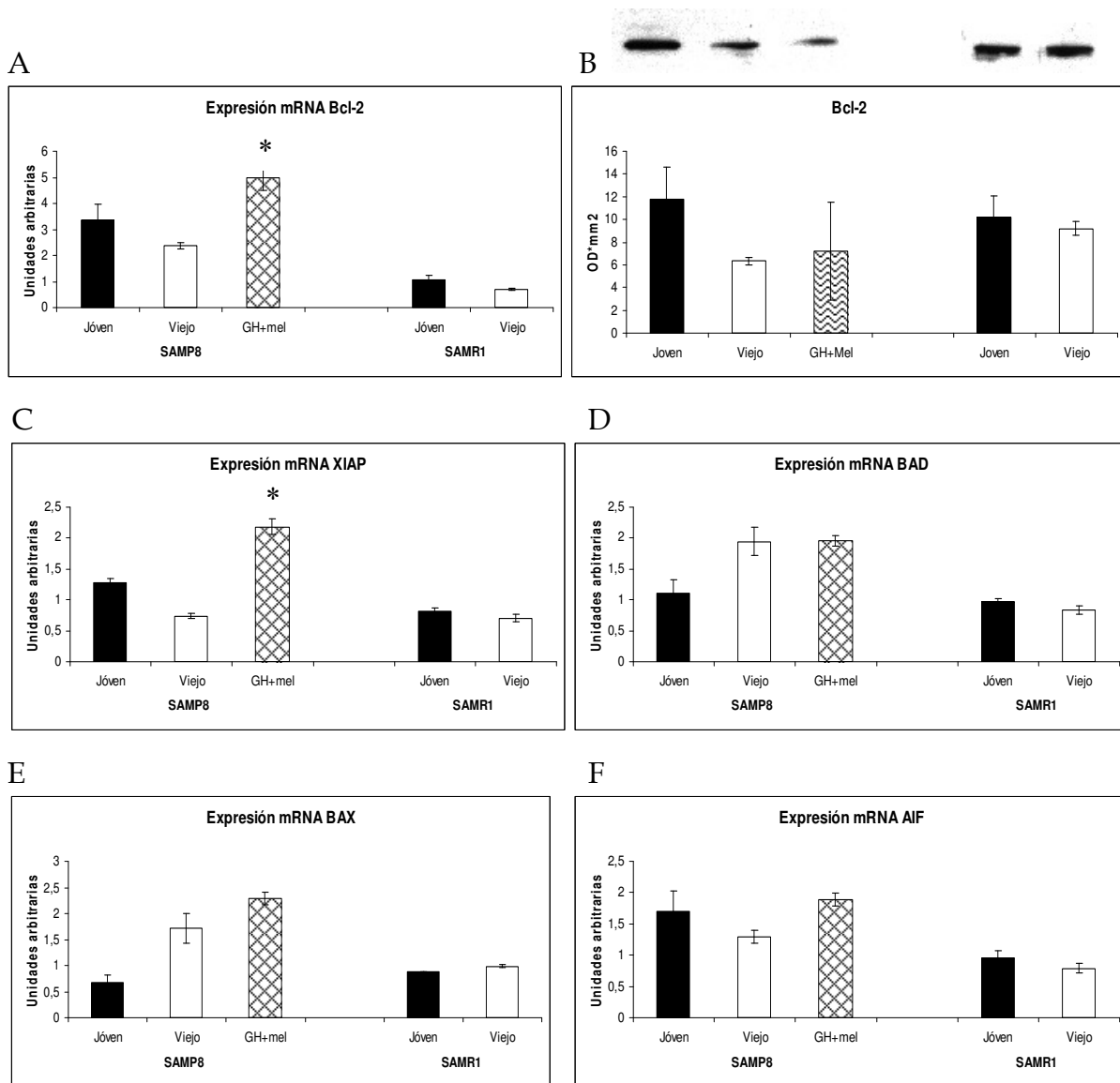
La expresión de proteínas de HO-1 y HO-2 disminuyen con el tratamiento combinado ( $p < 0.05$ ). En cambio el tratamiento no es capaz de ejercer efectos en la expresión de la proteína de eNOS ni en la expresión del mRNA de iNOS. Este tratamiento no ejerce ningún efecto en los niveles de NO observados (**Figura VI**).



**Figura VI.** Expresión de la proteína de HO (A y B) y de eNOS (C). Además estudio de la expresión del mRNA de iNOS (D) y niveles de NO (E) en el páncreas de dos tipos de ratones y efecto del tratamiento combinado con GH+melatonina en los ratones SAMP8.

En cuanto al proceso de apoptosis, el tratamiento combinado de GH con melatonina es capaz de aumentar la expresión del mRNA de Bcl-2

( $p < 0.05$ ) pero no la expresión de su proteína. No se ha visto ningún cambio ni en la expresión del mRNA ni de la proteína en la proteína proapoptótica BAD, ni en la expresión del mRNA de BAX. Por otra parte, este tratamiento es capaz de aumentar las expresiones de los mRNA de XIAP y AIF de manera significativa ( $p < 0.05$ ) (**Figura VII**).



**Figura VII.** Expresión del mRNA y expresión proteica de marcadores antiapoptóticos como Bcl2 y XIAP (A, B y C), proapoptóticos como BAD, BAX y AIF (D, E y F) en el páncreas de dos tipos de ratones y efecto del tratamiento combinado con GH+melatonina en los ratones SAMP8.

Además de lo comentado anteriormente, con el envejecimiento tiene lugar una disminución en los niveles de glutatión peróxidasa ( $p < 0.05$ ) y glutatión reductasa ( $p < 0.05$ ). No se observan cambios en los niveles de glutatión S-transferasa, superóxido dismutasa y porcentaje de glutatión entre los animales jóvenes y viejos SAMP8 (Tabla II).

SAMP8						
	Joven	Viejo	GH	Mel 1	Mel 10	GH+Mel
<b>GPx</b>	51.44±22.47	17.31±4.05	32.60±10.66	52.84±13.45	56.88±5.84	41.76±9.37
<b>GST</b>	297.61±35.10	241.74±19.78	2.18±2.14	356.85±38.81	294.23±49.58	10.53±6.59
<b>GR</b>	294.93±16.03	164.27±33.94	153.83±186.28	236.86±50.29	138.80±12.08	508.87±17.89
<b>%GSH</b>	54.79±3.86	57.39±2.47	58.64±6.41	69.13±2.53	62.83±2.05	90.74±1.31
<b>SOD</b>	5.11±0.34	4.37±0.27	4.68±0.54	4.36±0.44	4.62±0.25	4.97±0.38
<b>NOx</b>	9.38±2.71	12.35±1.85	4.97±0.72	17.20±2.08	9.16±2.09	11.05±2.45

**Tabla II.** Niveles de enzimas antioxidantes en el páncreas de ratones SAMP8 y efecto de los tratamientos con GH, melatonina1, melatonina 10 y GH+melatonina.

SAMR1				
	Joven	Viejo	Mel 1	Mel 10
<b>GPx</b>	79.97±17.85	54.12±27.23	54.50±13.70	64.18±17.16
<b>GST</b>	289.66±19.14	299.86±14.94	354.27±18.36	331.80±20.65
<b>GR</b>	251.63±22.34	210.12±19.75	344.34±33.50	353±17.76
<b>%GSH</b>	57.43±3.01	42.51±1.71	56.86±2.84	60.52±3.46
<b>SOD</b>	4.47±0.16	2.93±0.34	6.72±0.46	7.14±0.11
<b>NOx</b>	7.81±1.73	14.62±1.72	15.66±0.75	11.67±0.934

**Tabla III.** Niveles de enzimas antioxidantes en el páncreas de ratones SAMR1 y efecto de los tratamientos con melatonina1 y melatonina 10.

---

El tratamiento con GH es capaz de aumentar los niveles de glutatión reductasa ( $p < 0.05$ ) de manera significativa, en cambio los niveles de glutatión S-transferasa se encuentran disminuidos con el tratamiento ( $p < 0.05$ ). No se observan más cambios en los animales tratados con GH en los niveles de estas enzimas.

El tratamiento con melatonina aumenta la expresión de glutatión peróxidasa de manera significativa ( $p < 0.05$ ). El tratamiento con melatonina 1 no es capaz de modificar los niveles de glutatión reductasa que encontramos en animales viejos, en cambio con el tratamiento de melatonina 10 disminuye hasta cero los niveles de esta enzima ( $p < 0.001$ ). El porcentaje de glutatión aumenta con el tratamiento con melatonina 1 ( $p < 0.05$ ) pero el tratamiento más elevado no ejerce ningún efecto. No se observan más cambios en los animales tratados con melatonina en los niveles de estas enzimas ni en los niveles de NOx.

El tratamiento combinado de GH con melatonina aumenta la expresión de glutatión peróxidasa ( $p < 0.05$ ), glutatión reductasa ( $p < 0.05$ ) y porcentaje de glutatión ( $p < 0.05$ ). No se observan cambios en los niveles de superóxido dismutasa ni NOx con este tratamiento.



---

# *Discusión*



---

Como se ha comentado en la introducción el envejecimiento es un proceso deletéreo, progresivo, intrínseco y universal que con el tiempo ocurre en todo ser vivo. Podría también definirse como todas las alteraciones que se producen en un organismo con el paso del tiempo y que conducen a pérdidas funcionales y, en última instancia, a la muerte.

Es difícil determinar el momento en que se inicia este proceso, algunos autores consideran que se manifiesta a partir del momento de la máxima vitalidad, alrededor de los 30 años en el hombre (Texidor RJ y Massó GJ, 1997). En la actualidad el período de vida del ser humano se cuantifica con un máximo de 120 años cuando las condiciones son idóneas, de no ser así, la duración cronológica de la vida se reduce proporcionalmente.

La esperanza de vida al nacer es un índice que muestra el número de años que de manera estadística vivirá probablemente un individuo de una población que nace en un momento determinado; dependiendo ésta de las condiciones de bienestar en la sociedad. En efecto los avances socio-sanitarios, en especial los de la medicina preventiva, y también la aparición de los antibióticos junto con los grandes progresos en la nutrición, han logrado que la esperanza de vida al nacer, que era de menos de 40 años a principios de siglo, sea en los países desarrollados de más de 90 años en la actualidad (Texidor RJ y Massó GJ, 1997). Las consecuencias de éstos cambios ya se han hecho sentir en los sistemas de salud en muchos países, debido a que la atención médica del paciente anciano implica cambios estructurales en los mismos para revertir las tendencias hacia la discriminación habitual en éste grupo de pacientes. La solución de estos problemas debe comenzar con la inclusión de personas mayores en los estudios clínicos que evalúen la efectividad de nuevos procedimientos o medicamentos. La sociedad en general debe reconocer que el envejecimiento de una gran proporción de sus miembros la afecta como un todo y no es un fenómeno que concierna solo a los mayores.

---

Las principales causas de morbimortalidad geriátrica son las patologías crónico degenerativas, tales como las enfermedades cardiovasculares, el cáncer, la diabetes mellitus y sus complicaciones. Es importante destacar también las afecciones asociadas a demencia y particularmente la enfermedad de Alzheimer, las afecciones osteoarticulares y el deterioro sensorial, auditivo y visual.

Por todo esto consideramos importante el estudio del envejecimiento ya que es un proceso universal. Los estudios que hemos llevado a cabo en este trabajo son con ratones SAM. Éstos son un modelo bastante bueno para el estudio del envejecimiento ya que, como hemos mencionado en la introducción son animales obtenidos por selección (no genéticamente modificados). Los SAMP8 son animales que muestran un alto grado de estrés oxidativo. Estudios anteriores de nuestro grupo demuestran que estos animales a los 10 meses de edad ya muestran procesos degenerativos relacionados con la edad y se pueden considerar viejos. La cepa control utilizada, han sido los ratones SAMR1 que muestran mucho menor grado de senescencia y por ello son utilizados como controles.

Molecularmente hablando el envejecimiento humano está asociado con un incremento de la producción de radicales libres; de la inflamación, de activación de NFκB, aumento de la apoptosis y disminución de la capacidad inmunitaria. Además de esto, se ha observado una disminución en los niveles plasmáticos de muchas hormonas como la melatonina y la GH.

El progreso que se ha dado en la biología molecular en los últimos años ha hecho posible entender los perfiles de expresión de los distintos genes relacionándolos con la edad. En este trabajo hemos estudiado la influencia de la edad sobre los diferentes parámetros relacionados con el envejecimiento.

---

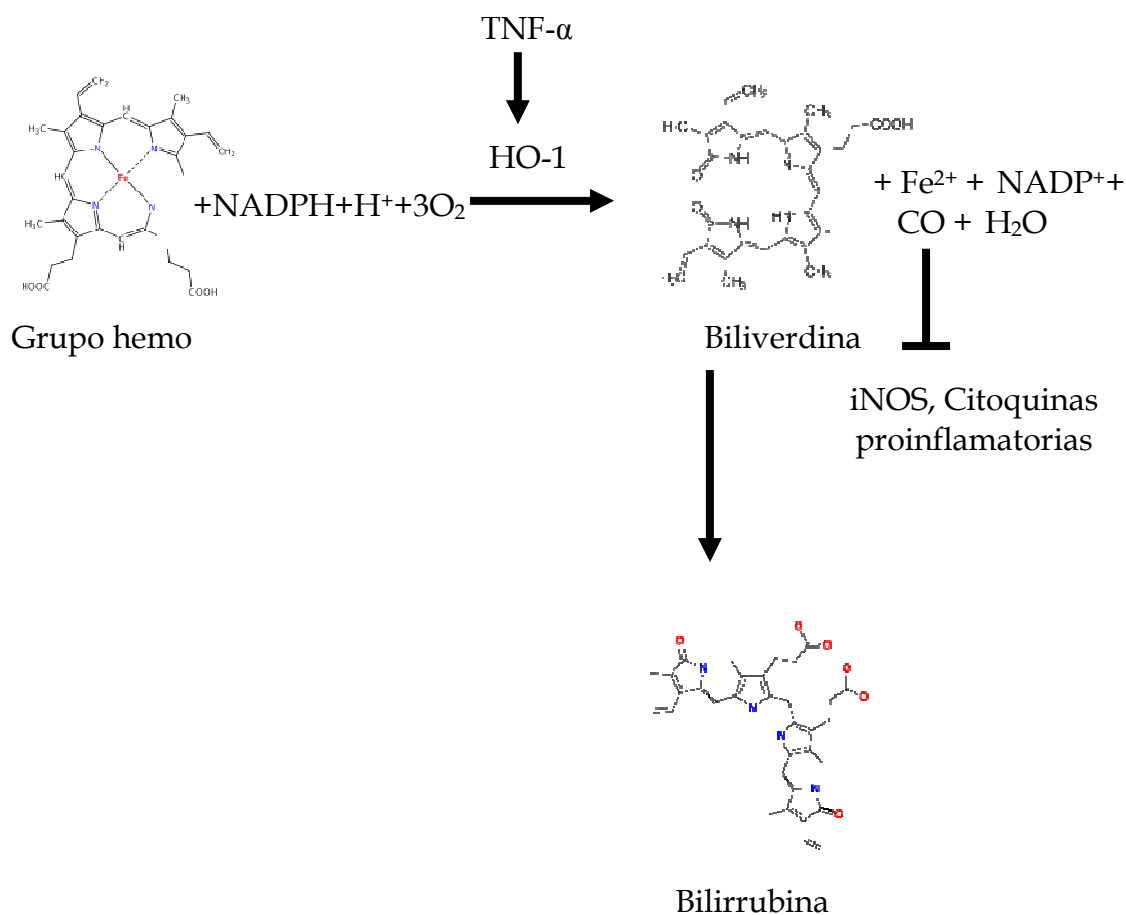
## *HÍGADO*

---

El envejecimiento está asociado con una gran variedad de alteraciones funcionales (Schmucker, 1998). Los mecanismos que tienen lugar en el hígado durante el envejecimiento en los ratones SAMP8 no están del todo claros. Se ha observado un aumento del estrés oxidativo que, junto con el aumento de la inflamación, podría ser una de las causas principales de los cambios que tienen lugar en este órgano con la edad (Gee y cols, 2005).

Con el envejecimiento se produce un aumento en la tasa de producción de radicales libres (Wickens, 2001) a la vez se observa una disminución en la capacidad antioxidante del organismo (Kireev y cols, 2007a) y una activación del sistema de las hemo-oxigenasas (Ito y cols, 2008).

Se ha postulado que la sobreexpresión de citoquinas proinflamatorias, especialmente TNF $\alpha$ , induce la activación de la NADPH oxidasa aumentando así los niveles de estrés oxidativo. La enzima hemo-oxigenasa tiene como función principal oxidar el grupo hemo libre generando biliverdina. El incremento de la actividad de HO, y la consecuente producción de CO, es considerado como uno de los más sensibles indicadores de estrés celular. Esta vía podría constituir un importante mecanismo de defensa contra el estrés oxidativo, ya que es capaz de eliminar el grupo hemo libre, que es citotóxico, y generar biliverdina y CO (Basuroy y cols., 2006). La biliverdina y su metabolito, la bilirrubina, son potentes antioxidantes, y el CO es capaz de inhibir la iNOS y la expresión de citoquinas proinflamatorias. Además la expresión de HO-1, la isoforma inducible, se estimula por el daño oxidativo y citoquinas. Por lo tanto la activación de esta vía parece jugar un papel importante en la neutralización del daño oxidativo e inflamatorio.



Hoy día se acepta que existe una relación entre envejecimiento y estrés oxidativo. La Teoría de los Radicales Libres enunciada por Harman en 1956 propone que los radicales libres derivados de oxígeno son los responsables del daño oxidativo asociado a la edad. Los sistemas antioxidantes no son capaces de hacer frente a todas las especies reactivas de oxígeno que se generan continuamente a lo largo de la vida de la célula, lo que acaba provocando un daño oxidativo en ella, y por extensión sobre los tejidos. Existen muchas pruebas experimentales a favor de esta teoría. Los animales viejos presentan mayores índices de oxidación que los jóvenes y se acumulan proteínas oxidadas, formas oxidadas del DNA y de lípidos (Stadman, 1992; Sohal y cols., 1993). En principio, esto podría atribuirse a una tasa mayor de radicales libres generados por los organismos viejos. En nuestros resultados observamos un aumento significativo de proteínas oxidadas y de MDA en el hígado de los animales

---

SAMP8 viejos. En los ratones SAMR1 no se observó este efecto de la edad y tampoco se han encontrado diferencias significativas entre ambas cepas de ratones. Otras evidencias experimentales que soportan esta teoría como posible causa del proceso de envejecimiento, son el aumento de la vida media obtenida incrementando las defensas antioxidantes y la implicación de las especies de oxígeno reactivas en los procesos degenerativos relacionados con la edad (Harman, 1981).

El hallazgo de un aumento de HO-1 en los ratones SAMP8 viejos en el presente estudio podría significar que este mecanismo de defensa está activado por el aumento de estrés oxidativo asociado a la edad con el fin de compensar esta situación. Patriarca y cols (2007) demostraron que la expresión hepática del mRNA de HO-1 era mayor a 6 meses que a 2,5. En nuestros resultados podemos observar que tanto la expresión de HO-1 como HO-2 están aumentadas con la edad en los animales SAMP8. En nuestro grupo se han encontrado resultados similares en hígado de ratas viejas de 24 meses al compararlas con jóvenes (Kireev y cols, 2008), y también en el corazón (Forman y cols, 2010) y en el páncreas (Cuesta y cols, 2011a, 2011b) de ratones SAMP8.

El óxido nítrico (NO) está relacionado con los productos de la glucosilación avanzada (PGA). Hay estudios que indican que los PGA formados en la matriz vascular pueden interferir químicamente en la acción del NO y por lo tanto ocasionar un defecto en la relajación vascular que puede explicar en parte la hipertensión y el envejecimiento que se observan en el paciente diabético. Está demostrado que bajo condiciones patológicas aumenta la expresión de iNOS y se producen grandes cantidades de NO (Hon y cols, 2002). Al igual que en estudios anteriores, en nuestros resultados podemos observar que la expresión del mRNA de iNOS se encuentra aumentada en los ratones SAMP8 viejos al compararlos con los SAMR1 de la misma edad. En cambio no se encuentran diferencias en la expresión de la proteína de iNOS medida por Western blot en estos ratones. Como hemos mencionado anteriormente la expresión de la vía de

---

HO está aumentada, lo que puede tener como efecto secundario la inhibición de la traducción proteica de iNOS, no a nivel del mRNA sino de la proteína.

Diversos estudios demuestran la existencia de un estatus inflamatorio incrementado en los ratones SAMP8 durante el envejecimiento. Por ejemplo se ha observado un aumento en los niveles de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6 en el hipocampo de ratones SAMP8 de 10 meses de edad al compararlos con SAMR1 de la misma edad (Tha y cols, 2000). Nuestros datos muestran un aumento de las citoquinas pro-inflamatorias IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  en el hígado de los animales SAMP8 viejos al compararlos con los animales jóvenes. Estos resultados se corroboran con estudios de otros grupos en los que se ha podido detectar un aumento de IL-1 $\beta$ , Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ), TNF- $\alpha$  e IL-6 (Hilmer y cols, 2007). Además en estudios previos de nuestro grupo también hemos observado con el envejecimiento un aumento en las citoquinas inflamatorias IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  en el corazón (Forman y cols, 2010) y en el páncreas (Cuesta y cols, 2011 a,b) de estos ratones y en el hígado de ratas Wistar (Kireev y cols, 2008; Kireev y cols, 2010).

Cuando se produce una agresión y el mecanismo de defensa no es suficiente, las células comienzan a segregar quimioquinas que son las responsables de atraer hacia sí células inflamatorias como macrófagos, granulocitos y fagocitos (Nussler y cols, 1999). Nuestros resultados corroboran lo anterior ya que se observa que el envejecimiento aumenta la expresión de MCP1 (factor quimioatrayente de macrófagos) en los ratones SAMP8 viejos, mientras que en los ratones de la cepa SAMR1 no se han encontrado diferencias con la edad. Al hacer el análisis comparativo de las dos cepas se observa que los SAMP8 tienen además mayores niveles de este marcador.

---

No se han observado diferencias significativas con la edad en la expresión de citoquinas pro-inflamatorias en los ratones SAMR1, pero al igual que lo observado en la expresión de MCP1, se encuentran valores mayores de citoquinas pro-inflamatorias en el hígado de los ratones SAMP8 viejos que en el de los SAMR1 de la misma edad. No se observan diferencias con la edad en cuanto a la expresión de la citoquina anti-inflamatoria IL-10. Otros grupos han observado los mismos resultados, produciéndose incrementos en los niveles plasmáticos de citoquinas inflamatorias como TNF- $\alpha$  e INF $\gamma$  a la vez que disminuyen las antiinflamatorias (IL-5 e IL-10) en ratones de ambas cepas de 10 meses de edad (Rodríguez y cols, 2007).

Como se ha mencionado anteriormente, el envejecimiento está asociado con un incremento en la activación del factor de transcripción NF $\kappa$ B. Además existe una relación evidente entre la expresión de citoquinas, la activación de NF $\kappa$ B y el envejecimiento lo que nos permite especular que la inflamación crónica, mediada por NF $\kappa$ B, puede estar relacionada con patologías relacionadas con la edad como son la diabetes, la sarcopenia, etc (Alonso-Fernández y De la Fuente, 2008). Nuestros resultados se correlacionan con los de estos autores ya que observamos que la actividad de NF $\kappa$ B aumenta significativamente con la edad. También observamos que la expresión de los mRNA de NF- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B2 y NKAP aumenta con la edad en los ratones SAMP8, además de que estas expresiones son siempre mayores en los animales SAMP8 que en los SAMR1 en los que solamente se han encontrado diferencias en la expresión de NKAP siendo mayor la expresión en animales viejos que en jóvenes.

Las vías de señalización de NF $\kappa$ B podrían modificar su expresión génica durante el estrés e interferir en la homeostasis celular durante el envejecimiento (Helenius y cols, 2001). Como hemos mencionado en la introducción, NF $\kappa$ B es un factor de transcripción que se compone de varios complejos homo o heterodiméricos formados por diferentes

---

subunidades de la familia Rel y que poseen diversas funciones fisiológicas (Valen y cols 2001). En células no estimuladas los complejos NFκB se encuentran en el citoplasma unidos a proteínas inhibitorias IκBs o a los precursores inactivos (p100 y p105). Cuando se produce un estímulo las proteínas inhibitorias se fosforilan liberando al complejo NFκB que se transloca al núcleo donde activa la transcripción de genes relacionados con citoquinas inflamatorias como la IL-1β (Goto y cols, 1999), IL-6 (Lebermann y Baltimore, 1990) y TNF-α (Yao y cols, 1997), así como enzimas pro-inflamatorias como la ciclo-oxigenasa 2 (COX-2) y la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) (Taylor y cols, 1998) como observamos en nuestros resultados.

El aumento de las especies reactivas de oxígeno y de citoquinas inflamatorias contribuye a la patogénesis de diferentes enfermedades como la hipertensión, la diabetes, la arteriosclerosis, etc (Cai y Harrison, 2000). Por su parte este acúmulo puede causar daño mitocondrial y desencadenar procesos pro-apoptóticos (Gustafsson y Gottlieb, 2003; Kumar y Jugdutt, 2003).

Se ha demostrado que el factor de transcripción NFκB tiene una importancia notable en la apoptosis (Kaltschmidt y cols 2000) pero el papel que desempeña no está claro. Se dice que el papel que pueda jugar en el proceso depende del tipo de estímulo. La función pro-apoptótica de NFκB podría ayudar al organismo a eliminar células que estén infectadas por virus antes de que se llegue a desencadenar la respuesta inmunitaria, por otra parte, la función anti-apoptótica de NFκB podría evitar la muerte celular innecesaria en respuesta a un estímulo como TNFα. Se tiene que investigar más el papel dual que tiene este compuesto en el proceso de apoptosis ya que en nuestros resultados observamos que aunque se produce un aumento de la expresión de NFκB en los ratones SAMP8 viejos, el proceso de apoptosis no se encuentra modificado.

---

## **Efecto de los tratamientos**

Como hemos mencionado anteriormente, y en la introducción, durante el envejecimiento se observa una disminución en la secreción y producción de diversas hormonas como la melatonina y la hormona de crecimiento (Reiter y cols, 1980; Sack y cols, 1986; Castillo y cols, 2005a). Por esta razón en nuestro grupo son muchos los trabajos que se han hecho con el fin de investigar el posible efecto protector de terapias sustitutivas con estas hormonas (siempre a dosis fisiológicas) sobre parámetros relacionados con el envejecimiento en hepatocitos, en la función vascular, en el hipocampo, en el corazón y en el páncreas (Castillo y cols, 2004, 2005a, 2005b; Azcoitia y cols, 2005; Kireev y cols, 2007a, Forman y cols, 2010; Cuesta y cols, 2011a, 2011b). Según los datos obtenidos, la administración de ambas hormonas por separado determina una mejora importante en la mayoría de parámetros estudiados.

En los trabajos que forman parte de esta Tesis Doctoral se estudian los efectos de los tratamientos crónicos con melatonina (Mel), hormona de crecimiento (GH) y la combinación de ambas (GH+Mel) sobre los marcadores inflamatorios, oxidativos y apoptóticos en el hígado de los ratones SAMP8.

### Melatonina

La melatonina es una hormona secretada por la glándula pineal. Está demostrado que es un captador (“scavenger”) de radicales libres (Tan y cols., 2000; Reiter, 2001; Allegra y cols., 2003). Además se sabe que esta hormona es un agente neuromodulador e inhibe la translocación del factor de transcripción NFκB al interior del núcleo (Chuang y cols., 1996) y por lo tanto la consiguiente expresión de sus genes diana. Así, está considerada

---

también como un potente agente anti-inflamatorio y anti-apoptótico. Además, la producción de melatonina disminuye con la edad de los individuos.

Son muchos los trabajos en los que se ha demostrado que la melatonina es capaz de proteger al hígado del estrés oxidativo. El primer estudio en el que se consideró a la melatonina como un “captador” de radicales libres fue de Ianas y cols en 1991 en el que observaban una clara implicación de la melatonina en la capacidad detoxificadora de radicales libres de oxígeno. A partir de ese momento existen cientos de trabajos en los que se demuestra su capacidad antioxidante tanto in vivo como in vitro (Reiter, 2000). En estudios previos de nuestro grupo se ha demostrado que la melatonina reduce las expresiones de las proteínas de iNOS y HO-1 en el hígado de ratas viejas (Kireev y cols, 2008). De igual forma en nuestros resultados actuales observamos que disminuye la expresión de los mRNA de iNOS, HO-1 y HO-2 aunque no es capaz de disminuir la expresión de las proteínas correspondientes. También hemos observado que disminuye la expresión de proteínas oxidadas y de MDA en los ratones SAMP8.

Además de los efectos antioxidantes de la melatonina son muchos los estudios que se han llevado a cabo para estudiar los efectos anti-inflamatorios de ésta pero el mecanismo molecular no está del todo claro. Hay autores que señalan que la melatonina podría actuar a través de la inhibición del factor de transcripción NFkB (Alonso y cols, 2006; Mazzon y cols, 2006) modulando la transcripción de citoquinas pro-inflamatorias y otros mediadores. En nuestros resultados observamos que el tratamiento con melatonina es capaz de disminuir la expresión de los mRNA y de las proteínas de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  y MCP1, además de aumentar la expresión de la proteína de IL-10 antiinflamatoria. También observamos que disminuye la expresión de todas las subunidades de los mRNA de NFkB. Estos

---

resultados se correlacionan con resultados previos obtenidos por nuestro grupo tanto en el corazón (Forman y cols, 2010) como en el páncreas de ratones SAMP8 (Cuesta y cols, 2010).

Nuestros resultados apoyan la teoría antes mencionada de que la melatonina es capaz de mejorar el estado inflamatorio asociado al envejecimiento e inhibir tanto la expresión de citoquinas inflamatorias como la activación de las subunidades de NFkB.

No se han observado diferencias con el tratamiento en el proceso de apoptosis en estos ratones. Bien es cierto que tampoco encontramos diferencias entre jóvenes y viejos en este proceso, por lo que la melatonina probablemente no puede mejorar una función que no está dañada. Hacen falta mas estudios para averiguar cómo afecta la melatonina globalmente al proceso de apoptosis pero una primera aproximación puede ser el hecho de que podría afectar al potencial de membrana de la mitocondria. Estudios tanto in vivo como in vitro demuestran que la melatonina afecta a la homeostasis de la mitocondria, estabilizando su potencial de membrana mejorando la fosforilación oxidativa y estimulando la síntesis de ATP a la vez que la protege del daño oxidativo (León y cols, 2005; Carretero y cols, 2009). Teniendo en cuenta estos resultados, la melatonina podría disminuir el proceso de apoptosis en los ratones aunque en nuestros resultados no observemos diferencias significativas ni con la edad ni con el tratamiento.

### Hormona de crecimiento

La GH es otra de las hormonas que disminuyen su síntesis y liberación con la edad ya que la actividad del eje somatotropo desciende durante el

---

envejecimiento. Los niveles de GH circulantes son menores en hombres y mujeres mayores de 60 años al compararlos con adultos y jóvenes con una reducción de entre un 15 y un 70% (Nass y cols, 2009). Consideramos que esta disminución podría ser una de las causas de los procesos asociados a la edad como la inflamación y el estrés oxidativo. En resultados previos de nuestro grupo hemos observado que el tratamiento con GH es capaz de modular estos efectos (Kireev y cols, 2008; Forman y cols, 2010; Cuesta y cols, 2011). Como hemos mencionado en la introducción la GH no tiene un órgano diana único sino que ejerce sus acciones sobre prácticamente todo el organismo.

Estudios previos de nuestro grupo han demostrado que la GH es capaz de mejorar muchos de los parámetros relacionados con el estrés oxidativo como los niveles de NO y LPO en hepatocitos aislados de ratas Wistar (Castillo y cols, 2004) o en el hígado de dichas ratas (Kireev y cols., 2008). Experimentos llevados a cabo en el corazón (Forman y cols, 2010) y en el páncreas (Cuesta y cols, 2011) de ratones SAMP8 también muestran que la hormona de crecimiento es capaz de mejorar el estrés oxidativo asociado a la edad. Además otros grupos también han demostrado que la administración de GH ejerce efectos beneficiosos, aumentando la defensa antioxidante y reduciendo el estrés oxidativo (Seiva y cols, 2008).

Nuestros resultados se correlacionan con los datos expuestos previamente. La GH es capaz de disminuir de manera significativa la expresión génica de iNOS y de HO-2 pero no es capaz de ejercer efectos en la expresión del mRNA de HO-1. Además hemos demostrado que se produce una reducción en la expresión de proteínas oxidadas y de MDA.

Los organismos envejecidos se encuentran sometidos a un estado inflamatorio crónico debido a la activación de genes pro-inflamatorios. En esto juega un papel muy importante el NFkB que como hemos mencionado ya sería responsable de la transcripción de genes asociados a

---

la inflamación como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2 e IL-6. Aunque observamos que la GH no es capaz de alterar la expresión del mRNA de las subunidades del NF $\kappa$ B, si que es capaz de modular la respuesta de las citoquinas. Observamos como la GH ejerce un efecto protector en el hígado de los ratones SAMP8 ya que es capaz de disminuir la expresión de los mRNA de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  y MCP1 y aunque el tratamiento no es capaz de modificar la expresión de IL-10, si que disminuye el estado inflamatorio en conjunto. Otros autores también han demostrado que la GH ejerce efectos positivos sobre marcadores inflamatorios, así se ha visto que los niveles de TNF- $\alpha$  en niños deficientes en GH son mayores que en niños normales, y la terapia sustitutiva con hormona de crecimiento es capaz de reducir estos niveles (Andiran y Yordam, 2007 ). También se han llevado a cabo estudios *in vitro* en los que se ha demostrado que la GH modula la respuesta de fase aguda, aumentando la síntesis de proteínas constitutivas hepáticas, disminuyendo la síntesis de proteínas de fase aguda, modulando la expresión de citoquinas, aumentando la concentración de IGF-I y jugando un papel importante en la regeneración hepática después del daño (Jeschke y cols, 2000).

En cuanto al proceso de apoptosis la GH no ejerce ningún efecto en el hígado de los ratones SAMP8 viejos. Esto, al igual que ocurre con el tratamiento con melatonina, puede explicarse debido al hecho de que no se han encontrado tampoco diferencias con la edad en estos animales.

### GH+Melatonina

Teniendo en cuenta que los tratamientos por separado con melatonina y GH en el hígado de estos ratones tuvieron resultados satisfactorios, nos

---

planteamos estudiar ambos tratamientos juntos para investigar si existía un efecto aditivo.

Al analizar el estrés oxidativo en animales con el tratamiento combinado de GH con melatonina observamos que no se observan cambios en la expresión de los mRNA de iNOS, eNOS ni HO-2 entre los animales viejos y los tratados. El tratamiento combinado manifiesta solamente un efecto potenciador en la expresión de HO-1. Tampoco se observan cambios en cuanto a proteínas oxidadas y MDA mientras que los tratamientos por separado si que disminuían dichos marcadores.

Por otra parte, en lo que se refiere al proceso inflamatorio observamos que disminuye la expresión del mRNA de TNF- $\alpha$  pero no ejerce ningún efecto en la expresión de IL-1 $\beta$ , IL-10 ni de MCP1. Por lo tanto podríamos decir que es capaz de reducir el estado inflamatorio ya que disminuye la expresión de las citoquinas inflamatorias. No se potencia el efecto de los tratamientos por separado, de hecho, en algunos casos llega a atenuarse como sucede con la expresión de IL-1 $\beta$ .

En el proceso de apoptosis el tratamiento combinado tampoco es capaz de cambiar la expresión de los distintos marcadores, pero los tratamientos por separado tampoco modifican la expresión de los marcadores analizados.

Por lo tanto, en lo que se refiere al estrés oxidativo y al proceso de apoptosis podemos decir que el tratamiento combinado no supone ninguna ventaja, en cambio, si que es capaz de disminuir las expresiones de NFkB1, NFkB2 y NKAP de manera significativa.

---

## *PÁNCREAS*

---

El envejecimiento produce cambios en numerosos órganos y sistemas, entre ellos el páncreas. Además parece que la propia función del páncreas endocrino se altera con la edad, observándose una reducción de la síntesis de insulina, favoreciendo la aparición de diabetes en los ancianos.

La prevalencia de la obesidad, la resistencia a insulina y la diabetes tipo 2 están empezando a considerarse como epidemias en el mundo desarrollado. La diabetes mellitus tipo 2 (DM2) se ha convertido en uno de los problemas sanitarios más graves de nuestro tiempo. Las estimaciones indican que para el año 2030 su prevalencia alcanzará proporciones epidémicas y afectará a 366 millones de personas en todo el mundo (Wild y cols, 2004; Valdés y cols, 2007). Bien sea por la mala alimentación, el sobrepeso o la vida sedentaria el hecho es que el 14% de los españoles padecen esta enfermedad crónica y la mayoría de ellos desarrolla diabetes tipo 2. El porcentaje de casos de afectados en España en los últimos años ha pasado de un 8 a un 12 por ciento. Varios factores, como el cambio de los criterios diagnósticos de Diabetes Mellitus, el envejecimiento de la población, una menor mortalidad de los diabéticos o un verdadero aumento de la incidencia, han podido influir en este fenómeno. Sería importante la realización de un estudio poblacional con una cohorte representativa de toda la población española para dar respuesta a muchas preguntas aún sin resolver.

La diabetes representa entre el 15 y el 20% del gasto sanitario en nuestro país, esto es, entre 10.000 y 15.000 millones de euros al año, según datos del Sistema Nacional de Salud. Es necesario el diagnóstico precoz, la modificación del estilo de vida y el correcto seguimiento y autocontrol de las personas con diabetes para que estas cifras disminuyan.

Años atrás se demostró que las variables en relación más firme con la presencia de DM2 son la edad, la historia familiar de diabetes y la obesidad (Franch y cols, 1992).

---

El proceso de envejecimiento implica una acumulación progresiva de daño y defectos en los componentes celulares que causan un descenso en las funciones fisiológicas de los tejidos y en la eficacia de las funciones del organismo. La edad se caracteriza por una deficiencia en el mantenimiento de la homeostasis y por un incremento en la aparición de enfermedades. Los cambios debidos al envejecimiento se suman a los de la carga genética y a los ambientales de los individuos, lo cual explica la gran prevalencia de diabetes en los ancianos (Graidon y Tesier, 2000). Hábitos como el mayor consumo de dulces, la inactividad, el aumento de grasa etc. también favorecen el desarrollo de diabetes (Vaag y cols, 1995; Feskens y cols, 1991; Salmeron y cols, 1997).

El deterioro en la tolerancia a la glucosa se atribuye a varios factores que incluyen:

- disminución de la secreción de insulina por las células beta del páncreas
- aumento de la resistencia periférica a la insulina
- dieta rica en carbohidratos
- aumento en la masa grasa y la inactividad física.

La diabetes tipo 2 aparece normalmente después de los 40 años en humanos. Como se ha mencionado en la introducción el defecto principal que tiene lugar en este tipo de diabetes es la resistencia de los tejidos periféricos a la acción de la insulina. Lo que conduce secundariamente al incremento compensador de la secreción de insulina por los islotes de Langerhans, hasta que el páncreas se agota, la insulina ya no puede seguir compensando y aparece la diabetes clínica.

La elevación crónica de los valores de glucosa en la sangre, incluso en ausencia de síntomas, conlleva lesiones en múltiples tejidos, de los que son especialmente sensibles los pequeños vasos de la retina, los riñones y los nervios periféricos, donde las complicaciones de la diabetes son más

---

marcadas. De hecho, en prácticamente todas las sociedades desarrolladas, la diabetes se ha convertido en una de las principales causas de ceguera, amputaciones y enfermedad renal terminal (Diabetes Atlas, 2003). Además, la diabetes conlleva un importante riesgo de enfermedad cardiovascular (ECV) tanto por sí sola como combinada con otros factores de riesgo como la hipertensión arterial y la dislipidemia. El resultado final es que las personas con DM2 tienen entre 2 y 4 veces más riesgo de ECV que la población general y entre un 50 y un 80% de las personas con diabetes muere por ECV (Diabetes Atlas, 2003). Estas complicaciones cardiovasculares, que ocurren ya incluso con valores de glucemia por debajo de los actuales valores diagnósticos de diabetes (The DECODE Study Group, 2003), suponen el mayor volumen de discapacidad, disminución de esperanza de vida y costes económicos relacionados con la diabetes (Diabetes Atlas, 2003).

Uno de los objetivos de esta Tesis Doctoral fue observar cómo la diabetes puede estar causada por las consecuencias normales del envejecimiento. Al analizar los niveles de glucosa observamos que no se alteran con la edad. La expresión del mRNA de la insulina en el páncreas no cambia entre animales SAMP8 viejos y jóvenes pero los niveles de insulina en plasma (mUi/L) aumentan con la edad y el contenido pancreático de esta hormona expresado en ng/mg tejido disminuye. Esto nos lleva a pensar que el páncreas de estos animales está ya deteriorado debido al envejecimiento y no es capaz de incrementar suficientemente la secreción de insulina necesaria para compensar la situación de resistencia periférica aumentada. Por otra parte se puede observar que los niveles plasmáticos de esta hormona son más altos que los que se encuentran en animales jóvenes. Esta paradoja podría deberse a que los tejidos periféricos han aumentado su resistencia a la acción de la insulina y esto fuerza al páncreas a secretar más hormona debido a que los tejidos no captan la insulina. Aunque los niveles de glucosa no se ven todavía afectados en los animales viejos al compararlos con los jóvenes si se observan diferencias

---

en el índice HOMA-IR que aumenta en los viejos. Pensamos que los animales utilizados en este estudio se encuentran ya en un estado de resistencia a la insulina y aunque el incremento de su secreción observado manteniendo los niveles plasmáticos elevados es todavía capaz de compensar la situación, si este estado persistiera, una vez agotado el páncreas, los niveles de glucosa empezarían a aumentar con lo que se considerarían animales con diabetes. Está demostrado que las personas que padecen esta enfermedad normalmente presentan un estado de hiperinsulinemia, asociada a niveles normales de glucemia, durante años antes de que las características clínicas de la diabetes aparezcan (Basu y cols, 2003; Moller y cols, 2003).

En los ratones SAMR1 se observa un aumento de la insulina plasmática y pancreática. Esto nos lleva a pensar que el páncreas de estos animales no se encuentra tan deteriorado debido al envejecimiento y por lo tanto es capaz de seguir manteniendo el contenido pancreático elevado de insulina y así conseguir que los niveles de glucosa no se modifiquen ni vayan a hacerlo en un futuro inmediato. En cambio el índice HOMA-IR si que aumenta con la edad debido a que la insulina plasmática si que se encuentra aumentada.

Aquí podemos observar la existencia de dos estrategias a la hora de solventar el problema de la resistencia a insulina.

- ❖ En los ratones SAMR1 cuando los tejidos empiezan a volverse más resistentes y menos sensibles a la insulina, el páncreas aumenta sin problemas el contenido de ésta, y por lo tanto sus niveles plasmáticos para mantener los niveles de glucosa normales. Como el páncreas sigue siendo funcionalmente activo, y no presenta

---

cambios relacionados con el estrés oxidativo ni la inflamación, los niveles de insulina no disminuyen en éste.

- ❖ En los ratones SAMP8 el contenido de insulina pancreático disminuye con el envejecimiento debido al hecho de que el páncreas de estos animales se encuentra más dañado por el estrés oxidativo y la inflamación asociadas al envejecimiento. Sin embargo a los 10 meses de edad se mantienen todavía los niveles plasmáticos elevados de esta hormona para neutralizar el aumento de la resistencia a insulina. Aún con todas estas complicaciones son capaces de mantener los niveles de glucosa dentro de la normalidad. Sin embargo, si la resistencia a insulina persiste, el páncreas llega a agotarse con lo que los niveles de insulina plasmáticos disminuyen y la glucemia aumenta dando lugar a uno de los principales síntomas de la diabetes tipo 2.

Al igual que en nuestros resultados, está demostrado que las personas que padecen diabetes presentan normalmente un estado de normoglicemia e hiperinsulinemia antes de que las características clínicas de la diabetes aparezcan (Basu y cols, 2003; Moller y cols, 2003).

No podemos ignorar que los islotes de Langerhans son agregados de células heterogéneas que contienen distintos tipos celulares ( $\beta$ -,  $\alpha$ -,  $\delta$ - y PP) las cuales secretan insulina, glucagon, somatostatina (SST) y polipéptido pancreático respectivamente. Los diferentes tipos celulares están bajo la influencia de los cambios en las concentraciones de glucosa extracelular. Así, el aumento en la glucosa circulante estimula la secreción de insulina por las células  $\beta$  a la vez que se estimula la de somatostatina por las células  $\alpha$  (Di Giulio y cols, 2009).

---

En este estudio se muestra que no hay diferencias en ninguna de las cepas de ratones en lo que se refiere a las expresiones de los genes que codifican para insulina y somatostatina entre animales jóvenes y viejos. Estos resultados tienen una relación directa con unos niveles de glucosa que tampoco se alteran. Por otra parte, en los ratones SAMP8 la expresión de glucagon sí que aumenta con la edad. Otros autores han observado que la diabetes tipo 2 es una enfermedad que se caracteriza no sólo porque existan problemas en la función y en la masa de células  $\beta$ , sino que se observa también un incremento de células  $\alpha$  dando lugar a una hiperglucagonemia debido a disfunciones en las células  $\alpha$  (Weinberg y cols, 2009; Vieira y cols, 2007; Deng y cols, 2004). Sin embargo no se han observado cambios en la expresión de glucagon en los animales viejos SAMR1.

La somatostatina es una hormona que ejerce sus acciones biológicas en diferentes tejidos diana. De forma preferente actúa como un factor inhibidor. En la hipófisis el efecto principal es la inhibición de la hormona de crecimiento. En el páncreas media la inhibición de la liberación de glucagon, regula de manera negativa la secreción de insulina y además inhibe la secreción exocrina pancreática (Tresguerres, 2010). En este estudio hemos observado que la expresión del mRNA de somatostatina no cambia en los animales viejos al compararlos con los jóvenes en ninguna de las cepas de ratones.

Se ha observado que los animales viejos tienen mayor expresión de genes de GLUT-2 que es un transportador de glucosa en los islotes pancreáticos, pero también actúa como un sensor de glucosa y aumenta la sensibilidad a ésta. En nuestro estudio hemos demostrado que el mRNA de GLUT-2 está sobreexpresado en el páncreas de los animales SAMP8 viejos. A pesar de esto los niveles de insulina pancreática están disminuidos aunque todavía se mantiene la hiperinsulinemia por lo que en estos animales no se

---

observa todavía un aumento en los niveles plasmáticos de glucosa, y no se hacen patentes las características clínicas de la diabetes.

Como hemos mencionado anteriormente, la diabetes tipo 2 es característica de las personas mayores, por lo que procedimos a investigar si los genes de longevidad relacionados con el metabolismo como son los factores FoxO y sirtuinas podían estar jugando un papel importante en este área.

Los factores de transcripción FoxO (Forkhead box O) juegan un papel importante en la modulación de las funciones metabólicas (Barthel y cols, 2005). Tienen una función clara en el metabolismo de la glucosa ya que cuando los nutrientes y los niveles de insulina disminuyen, los factores FoxO promueven la expresión de enzimas gluconeogénicas. Bajo condiciones patológicas, incluyendo estados de resistencia a insulina, la señalización de los factores FoxO se ve comprometida y disminuyen (Daitoku y cols, 2004).

Por otra parte, las sirtuinas son una familia de deacetilasas dependientes de NAD<sup>+</sup> directamente relacionadas con muchos factores de transcripción como p53, factores FoxO, y PGC-1, además participan en el mantenimiento de la estabilidad de la doble hélice del DNA. Se ha demostrado que también participan en la gluconeogénesis, movilización lipídica y que ejercen un papel muy importante en la homeostasis de la glucosa y por tanto en el metabolismo y la longevidad (Iozzo y cols, 1999). Son una familia de siete miembros pero en este trabajo se ha medido solamente sirtuina 1 ya que es el miembro de la familia que tiene un papel más importante en la homeostasis de la glucosa. Sirtuina 1 protege a las células  $\beta$  del estrés inflamatorio mediante la deacetilación de los factores FoxO. FoxO1 podría tener un papel importante en la preservación de las células  $\beta$  controlando la masa estas células. En este trabajo se han medido

---

la expresión génica de sirtuina 1 y dos de los factores FoxO (FoxO1 y FoxO3A). En nuestros resultados observamos que los animales SAMP8 viejos tienen disminuida la expresión de sirtuina 1 y de los factores FoxO, por lo que con la edad se ven comprometidos procesos tales como la gluconeogénesis, la movilización lipídica, la homeostasis de la glucosa y por tanto el metabolismo y la longevidad. En los animales de la cepa SAMR1 no se ven comprometidos estos factores en los animales viejos.

Se podría pensar que con el envejecimiento la expresión de genes relacionados con la proliferación celular disminuyen y así se explicaría el hecho de que los animales viejos desarrollaran diabetes, ya que al existir más muerte celular y proliferar menor cantidad de estas células, la insulina secretada no sería suficiente para la demanda que genera el organismo, especialmente cuando hay resistencia a la misma. Por ello se midieron genes relacionados con proliferación celular como PCNA y Sei1. Observamos que no hay diferencia en estos genes entre animales jóvenes y viejos por lo que, en principio descartamos la idea de que el problema de estos animales fuera la presencia de una menor cantidad de células  $\beta$ .

En la aparición y progresión de la diabetes se considera muy importante la regeneración celular que tiene lugar en los islotes pancreáticos. Otros autores han demostrado que hay una relación directa entre la disminución de proteínas asociadas con la regeneración celular, como son Pdx-1 y ciclina-D3, y la edad de los individuos (Cnop y cols, 2011). En nuestros resultados hemos observado que la expresión del factor de diferenciación pancreática (Pdx-1) es significativamente menor en los animales SAMP8 viejos. Podemos pensar que estos animales desarrollarán la enfermedad no por un menor número de células beta, sino por una menor regeneración y diferenciación en los distintos tipos celulares de los islotes pancreáticos.

---

## **Efecto de los tratamientos**

Como se ha mencionado anteriormente el envejecimiento humano está asociado con pérdidas evidentes en la capacidad de ajuste de la homeostasis del organismo y este hecho también afecta a la homeostasis de la glucosa. Además se ha observado que durante el mismo hay una disminución en la secreción de varias hormonas como son la melatonina y la GH que pueden ser precisamente las responsables de los cambios que se producen con la edad en la composición corporal, función y metabolismo. Por esto, el hecho de poder entender la manera de cómo los factores de crecimiento y las hormonas intervienen en la regulación de la homeostasis de la glucosa nos podría permitir desarrollar mejores terapias contra el desarrollo de esta enfermedad.

### Melatonina

La melatonina es una molécula filogenéticamente muy conservada y ejerce muchas funciones de regulación modulando el metabolismo celular a través de su unión a receptores de membrana específicos (Hae y cols, 2006; Prunet-Marcassus y cols, 2003). Datos llevados a cabo tanto *in vivo* como *in vitro* sugieren que la melatonina podría jugar un papel en la regulación de la homeostasis de la glucosa (Hae y cols, 2006; Prunet-Marcassus y cols, 2003; Hussein y cols, 2007). Se ha demostrado que en ratas la pinealectomía induce resistencia a la insulina e intolerancia a la glucosa (Hae y cols, 2006; Prunet-Marcassus y cols, 2003). Por otro lado, en ratas obesas diabéticas, la administración de melatonina es capaz de disminuir el peso corporal y los niveles plasmáticos de glucosa (Hoyos y cols, 2000) e insulina (Mori y cols, 1989) aunque los mecanismos moleculares no están claros.

---

Son muchos los estudios que relacionan la administración de melatonina con una disminución en la secreción de insulina tanto *in vivo* como *in vitro* (Prunet-Marcassus y cols, 2003; Hussein y cols, 2007).

Ratas Goto-Kakizaki (GK) diabéticas muestran niveles plasmáticos de melatonina reducidos a la vez que se observan ligeros aumentos en los niveles de insulina. Además se ha comprobado que menores niveles de melatonina en plasma se correlacionan directamente con los niveles en la síntesis pineal de esta hormona (Rodríguez y cols, 1989; Mellado y cols, 1989; Lynch y cols, 1973; Zong-Chao, 1998; Treskes y cols, 1996; Mühlbauer y cols, 2004)

Otros autores también han descrito que la administración de melatonina mejora las complicaciones metabólicas que tienen lugar con la diabetes, mientras que la pinealectomía los agrava (Cardinali y cols, 2011). Además la melatonina reduce los niveles de colesterol en distintas especies de mamíferos (Hoyos y cols, 2000; Morin y cols, 1989; Aoyama y cols, 1988; Montilla y cols, 1998) y disminuye el estrés oxidativo en sujetos diabéticos (Montilla y cols, 1998; Nishida y cols, 2002) a la vez que reduce también la hiperglicemia, hiperinsulinemia e hiperleptinemia.

Todas las características que hemos mencionado anteriormente, como la disminución en la producción de melatonina, el aumento en la secreción de insulina, el aumento en la resistencia a ésta en los tejidos periféricos y en los islotes pancreáticos son características típicas del envejecimiento (Barbieri y cols, 2002; Bellino y Wise, 2003; Ferrari y cols, 1995; Ferrari y cols, 1996; Touitou y Haus, 2000).

Administramos melatonina a nuestros ratones SAMP8 viejos y observamos una disminución de la insulina plasmática a la vez que un aumento de la insulina pancreática, ésta última presentando un incremento dosis-dependiente. Además se observa que la glucosa sufre

---

también una disminución en los animales tratados con melatonina. Como es de esperar, el índice HOMA-IR disminuye también en estos animales. Esto significa que el páncreas de estos animales es capaz de aumentar la síntesis de insulina mientras que la disminución observada de la resistencia periférica permite disminuir sus niveles plasmáticos, lo cual contribuye también a la recuperación del contenido pancreático.

En los animales SAMR1 no se observan cambios en los niveles de glucosa con el tratamiento, pero si que disminuyen de manera dosis dependiente tanto el contenido pancreático como los niveles plasmáticos de insulina por lo que el índice HOMA-IR también disminuye de manera dosis dependiente.

Los tratamientos con melatonina son capaces de disminuir la expresión de insulina, glucagon y somatostatina que se encontraban aumentados en los animales SAMP8 viejos.

En cuanto a la expresión de genes de longevidad, los tratamientos con melatonina son capaces de aumentar la expresión de los factores FoxO y de Sirtuina 1, observándose un efecto dosis-dependiente. Así que en estos animales se producirá una mejora en la movilización lipídica, el metabolismo, la gluconeogénesis y todo el metabolismo de la glucosa.

En cuanto a los marcadores de proliferación celular observamos que la dosis más baja de melatonina disminuye de manera significativa la expresión de PCNA pero no se observan diferencias en la expresión de Sei1. La expresión de Pdx-1 no se ve modificada con esta dosis de melatonina. En cambio, la dosis más alta aumenta la expresión de PCNA, tampoco cambia la expresión de Sei1 y aumenta la expresión de Pdx-1. Por lo tanto, la melatonina es capaz de aumentar la diferenciación y la proliferación pancreática en estos animales pero sólo con la dosis más alta.

---

### Hormona de crecimiento (GH)

La disminución que se produce en la actividad del eje GH/IGF-I determina alteraciones en el control hipotalámico de la función somatotropa que a su vez también afecta a cambios en las hormonas periféricas y metabolismo.

En 1992 se acuña el término “somatopausia” que indica la relación que existe entre los cambios relacionados con la edad y la disminución de los niveles de GH e IGF-I, además de los cambios observados en la composición corporal, funciones estructurales y metabolismo que caracterizan el proceso de envejecimiento (Merchav y cols, 1992) y que también están relacionados con el desarrollo de la diabetes tipo 2.

La GH es una hormona que no tiene un órgano diana único, sino que ejerce sus acciones en casi todos los tejidos del organismo y de hecho, los efectos biológicos más importantes de esta hormona se producen sobre el tejido hepático, muscular y graso en los que actúa afectando al metabolismo, por medio de sus acciones anabolizantes y lipolíticas a las que se une la hiperglucemiante a dosis altas. Davidson en 1987 ya mencionó que la hormona de crecimiento juega un papel importante en el metabolismo de la glucosa, de los lípidos y de las proteínas (Davidson, 1987). Esta hormona es capaz de disminuir la oxidación de la glucosa, y aumentar la captación de ésta por los músculos a la vez de aumentar la gluconeogénesis. Además estimula la lipólisis, la oxidación lipídica y la síntesis de proteínas, disminuyendo la degradación de proteínas, la oxidación de aminoácidos y la formación hepática de urea (Davidson, 1987). El patrón de secreción de la hormona se modifica durante el ayuno, la ingesta de alimentos, el estrés y algunos fármacos.

Tanto el exceso como el déficit en la concentración normal de GH están relacionados con desórdenes en el metabolismo de los carbohidratos

---

(Press, 1998; Moller y cols, 1989) El primer estudio que se hizo sobre la terapia sustitutiva con GH estaba relacionado con la sensibilidad a la insulina (Adamson, 1981; Adamson y Efendic, 1979; Adamson y Cerasi, 1975). Este estudio se llevó a cabo en una muestra normal de población sueca. Se demostró que una dosis fisiológica de GH durante un periodo de un año era capaz de aumentar la sensibilidad a la insulina. En nuestro estudio los animales SAMP8 tratados con GH (2mg/kg/día) presentan una disminución en los niveles de insulina plasmáticos al compararlos con los animales no tratados de su misma edad. Por otra parte la expresión del mRNA de insulina también disminuye en el páncreas de los animales tratados con hormona de crecimiento. Los niveles de glucemia no se ven modificados aunque el índice HOMA-IR si que disminuye debido a la disminución plasmática de insulina.

Podemos pensar que la GH podría estar aumentando la sensibilidad a insulina de los tejidos periféricos por lo que disminuye los niveles plasmáticos y la expresión del mRNA de insulina en el páncreas.

Es muy probable que la insulina y el IGF-I sean hormonas que no sólo presenten una gran homología estructural y evolutiva, sino también productos fisiológicamente relacionados para actuar de forma concreta en el organismo: la insulina sería responsable de la regulación aguda de la homeostasis metabólica y de los depósitos energéticos, mientras que IGF-I se encargaría principalmente de la diferenciación celular y de los lentos procesos de crecimiento. Estas hormonas serían, entonces, los dos principales compuestos anabolizantes, que permitirían que la regulación metabólica, el crecimiento y la diferenciación celular ocurriesen de manera concertada.

IGF-I es el principal mediador de los efectos que ejerce la GH. Desempeña un papel principal en el crecimiento de las células de los islotes, en la secreción de insulina y en el mantenimiento de la sensibilidad a ésta. Otros grupos han podido demostrar que los ratones knockout para GH (GH<sup>-/-</sup>)

---

tienen menor número de células beta y además éstas ven reducida su función (Fernández y cols, 2001; Lu y cols, 2004; Yakar y cols, 2001). En este estudio hemos podido observar que la expresión del mRNA de IGF-I en los animales viejos es menor que la observada en animales jóvenes, probablemente debido a la disminución en los niveles de GH. El tratamiento con GH es capaz de reestablecer estos valores, llegando a ser similares a los encontrados en animales jóvenes. Además observamos también que este tratamiento disminuye de manera significativa la expresión de los mRNA de insulina, somatostatina, glucagon y GLUT-2. Estos cambios que se observan a nivel genético en el páncreas de estos animales dan lugar a que los ratones presenten cambios favorables en el metabolismo de la glucosa e incluso cambios en la progresión de la diabetes. Los animales SAMR1 no mostraron diferencias con la edad en los parámetros analizados y por lo tanto no se les administró el tratamiento.

Ya hemos reflejado anteriormente que la diabetes tipo 2 es una enfermedad que afecta a las células  $\beta$  pancreáticas reduciendo su masa y su función pero también produce un incremento de células  $\alpha$  dando lugar a una hiperglucagonemia. Se ha observado que el tratamiento con GH es capaz de disminuir la expresión de glucagon disminuyendo así la hiperglucagonemia a la que se ven sometidos los animales SAMP8. En los ratones SAMR1 no se observaron diferencias entre los animales jóvenes y viejos. Como hemos mencionado anteriormente GLUT-2 es, además de un transportador de glucosa, un elemento capaz de aumentar la sensibilidad a ésta. Al analizar la expresión de este marcador observamos que con el tratamiento con GH la expresión disminuye. Esto podría ser porque no es necesario aumentar la expresión de este transportador debido al hecho de que los niveles de insulina también decrecen, la resistencia a insulina está disminuida y se podría captar glucosa sin necesidad de aumentar la expresión de los transportadores.

---

En cuanto al estudio de los factores FoxO y Sirtuina observamos que la hormona de crecimiento sólo es capaz de restablecer la expresión de FoxO3A, no ejerce ningún efecto sobre las expresiones de FoxO1 ni de Sirtuina 1. Esto podría ser debido a que los animales tratados con GH no tienen alterados los procesos relacionados con la homeostasis de la glucosa, y al no tenerlos alterados, la hormona de crecimiento no mejora estos parámetros.

La masa de células beta pancreáticas tiene que estar muy controlada, por lo que tiene que existir un balance entre crecimiento y muerte celular para controlar la homeostasis de la glucosa. Una alteración en ese balance ya sea por problemas autoinmunes o por fallos en la capacidad compensatoria de las células beta puede dar lugar al desarrollo de diabetes tipo 1 o tipo 2 respectivamente.

En nuestros resultados la GH no aumenta la expresión de los genes estudiados de proliferación celular. Al hacer el estudio de marcadores de diferenciación celular observamos que aumenta la expresión de Pdx-1 de manera significativa, esto puede ser debido a que la GH aumenta la síntesis y secreción de IGF-I el cual actuaría como un débil mitógeno y un potente factor de diferenciación que mantendría a las células en un estado altamente diferenciado.

#### GH+Melatonina

Nuestro grupo ha podido observar que los tratamientos con GH y con melatonina efectuados por separado han sido capaces de mejorar de forma ostensible las alteraciones debidas a la edad. Por ello se ha planteado

---

también el estudio de los efectos que podría tener el tratamiento combinado por si se generase efectos aditivos.

Observamos que los tratamientos con GH y con melatonina por separado son capaces de mejorar el estado metabólico del páncreas, disminuyendo la resistencia a insulina y mejorando la homeostasis de la glucosa. Observamos que se produce una disminución de la insulina plasmática y en todos los casos disminuye el índice HOMA-IR. En este caso el tratamiento combinado no mejora la situación al compararlo con los tratamientos por separado.

Los tratamientos ya sean con melatonina como con GH, son capaces de disminuir la expresión de insulina, glucagon y somatostatina en los animales SAMP8 viejos. Además la melatonina es capaz de reducir la expresión de insulina, cosa que la GH no, y el tratamiento combinado es capaz también de reducir la expresión de insulina.

Teniendo en cuenta nuestros resultados, los tratamientos serían capaces de prevenir la fatiga a la que están sometidas las células beta pancreáticas por lo que pueden ser unas buenas terapias en la patogénesis de la diabetes tipo 2.

El tratamiento combinado es capaz de incrementar la expresión de los dos factores FoxO que se han medido por lo que podemos elucubrar que a este nivel, el tratamiento combinado hace que se potencie el efecto de los tratamientos.

En cuanto al tratamiento combinado observamos que aumenta la expresión de los marcadores de proliferación celular de manera significativa a la vez que aumenta la expresión de Pdx-1.

Por lo tanto en cuanto a la homeostasis de la glucosa y los marcadores estudiados no podemos afirmar que el tratamiento combinado ejerza efectos aditivos en estos animales.

---

**Cambios inducidos por el envejecimiento sobre parámetros relacionados con el estrés oxidativo, la inflamación y la apoptosis en el páncreas de los ratones SAMP8. Efecto de la administración de GH y/o melatonina.**

El estrés oxidativo es un proceso caracterizado por un desequilibrio bioquímico entre la producción de radicales libres (RL) o especies reactivas con respecto a los antioxidantes a favor de los primeros con implicaciones en la homeostasis del organismo por daño a nivel celular, tisular y sistémico.

Según la teoría de los Radicales Libres mencionada en la introducción de esta Tesis Doctoral, el envejecimiento se debe a la acumulación de dichos radicales procedentes tanto del oxígeno como del nitrógeno. El aumento de estrés oxidativo generado por ese desequilibrio es responsable de la aparición de muchas enfermedades entre las que podemos encontrar también la diabetes. Existen numerosos datos en la literatura que evidencian el papel de las ROS en el proceso de envejecimiento. Se sabe que con la edad se produce un incremento en la tasa de producción de ROS que es responsable del aumento del daño oxidativo a los lípidos, las proteínas y al ADN (Harman D, 1992; Sohal RS y cols, 2002; Troen BR, 2003). Además, el hecho de que se acumulen especies reactivas de oxígeno o nitrógeno en los individuos puede dar lugar a daño mitocondrial que podría desencadenar procesos apoptóticos.

En este trabajo hemos observado un aumento de marcadores secundarios de estrés oxidativo en el páncreas de los ratones SAMP8 viejos como son HO-1 e iNOS. También se han medido los niveles de NO en el páncreas de estos animales y se observa un aumento muy importante con la edad, correlacionándose con el incremento que sufre la expresión de iNOS. No

---

se han observado cambios en las formas constitutivas de estas enzimas (HO-2 y eNOS, respectivamente). El incremento de la expresión de HO, y la consecuente producción de CO, se considera como uno de los indicadores más sensibles de estrés celular. Esta vía podría constituir un importante mecanismo de defensa contra el estrés oxidativo, ya que es capaz de eliminar el grupo hemo libre, que es citotóxico, y generar biliverdina y CO (Basuroy et al., 2006). La biliverdina y su metabolito, la bilirrubina, son potentes antioxidantes. Por otro lado el CO es capaz de inhibir la NOS y la expresión de citoquinas pro-inflamatorias. La activación de esta vía parece jugar un papel importante en la neutralización del daño oxidativo e inflamatorio. El hallazgo de un aumento de HO-1 en el páncreas de los ratones SAMP8 viejos en el presente estudio podría significar que este mecanismo de defensa está activado precisamente por el aumento de estrés oxidativo asociado al envejecimiento con el fin de compensar esta situación. No se han encontrado diferencias entre jóvenes y viejos en los ratones SAMR1.

El estrés oxidativo es una de las principales características del envejecimiento y son muchos los estudios que han intentado clarificar cómo se alteran las enzimas antioxidantes endógenas con la edad (Kasapoglu y Ozben, 2001). En este estudio también hemos analizado los niveles pancreáticos de distintas enzimas antioxidantes.

Está demostrado que enzimas antioxidantes como SOD y GST disminuyen con el envejecimiento en varios órganos como hígado, cerebro, corazón... en ratas tanto machos como hembras (Takeda, 2009; Rebrin y Sohal 2004; Rodríguez y cols. 2007a, 2008), por eso nos decidimos a estudiar los cambios producidos a nivel pancreático.

✧ La superóxido dismutasa (SOD) se encarga de convertir los agentes oxidantes en moléculas menos dañinas para el organismo. La función

---

primaria de este enzima es convertir el radical libre superóxido ( $O_2$ ) en peróxido de hidrógeno, que es un radical libre menos dañino. Se puede observar que los niveles de este enzima se encuentran disminuidas en el páncreas de los animales viejos SAMP8 viejos.

- ✧ La glutatión S transferasa (GST) pertenece a una familia muy importante de enzimas que intervienen en procesos de desintoxicación celular eliminando sustancias nocivas para la célula. Se observa que no existen diferencias significativas entre animales SAMP8 jóvenes y viejos, por lo que el mecanismo de desintoxicación celular en este modelo no sufre ningún cambio.
- ✧ La glutatión peroxidada (GPx) es un enzima implicado en la eliminación de peróxido de hidrógeno y en la conversión de hidroperóxidos de lípidos en sus respectivos alcoholes y por último oxida GSH a GSSG. Los animales viejos de la cepa SAMP8 tienen menores niveles de este enzima que los jóvenes. No se han encontrado diferencias entre los ratones SAMR1 jóvenes y viejos.
- ✧ La glutatión reductasa (GR) es un enzima que cataliza la reducción del glutatión oxidado (GSSG) a glutatión reducido (GSH) que será utilizado por la glutatión peroxidasa para la reducción del peróxido y de los lipoperóxidos, que son tóxicos. Este enzima juega un importante papel en la defensa antioxidante y debido a su presencia en los diferentes tejidos y órganos está involucrada en la fisiopatología de varias enfermedades. Observamos que con la edad disminuye su expresión en los ratones SAMP8, en cambio no se han encontrado diferencias con la edad en los SAMR1.
- ✧ El glutatión es el tiol no proteico más abundante en las células de mamíferos. Constituye el principal antioxidante endógeno de carácter

---

no enzimático. En estado reducido (GSH) desempeña numerosas e importantes funciones metabólicas (Viña, 1990), entre ellas, se encarga de proteger a la célula frente al ataque oxidativo, ya sea por radicales libres, peróxidos u otros agentes nocivos como las generadas por radiaciones. La relación GSSG/GSH no cambia con la edad en los ratones SAMP8. En los ratones SAMR1 se observa que hay una disminución de esta relación en los animales viejos al compararlos con los jóvenes.

**Resumiendo, con la edad la expresión de SOD disminuye en las dos cepas de ratones viejos. Por otra parte la expresión de glutatión S transferasa no cambia con el envejecimiento, al igual que sucede con la glutatión peroxidasa. En cambio al estudiar la expresión de glutatión reductasa si que observamos una disminución en la expresión de esta enzima con la edad en los animales SAMP8 viejos. Por último, al estudiar el ratio glutatión oxidado/reducido observamos que no se producen cambios significativos con la edad en los ratones SAMP8 viejos.**

Se acepta generalmente que el envejecimiento se asocia a una inflamación crónica que conlleva una producción anormal de mediadores pro-inflamatorios incluyendo citoquinas pro-inflamatorias, que a nivel pancreático están implicadas tanto en la disfunción de las células  $\beta$  productoras de insulina, como en la resistencia de los tejidos periféricos a la misma característica de la diabetes tipo 2. Además, el factor de transcripción NFkB está directamente relacionado con genes de tipo inflamatorio.

---

La inflamación se define como una reacción de defensa ante cualquier tipo de estrés, ya sea éste fisiológico o no. Se define como una respuesta inespecífica, inmediata y no elaborada frente a las agresiones del medio y está generada por los agentes inflamatorios. Supone la tétrada clásica de calor, rubor, tumor y dolor generados por el aumento de la vascularización local para el aporte de células inmunitarias. La respuesta inflamatoria se lleva a cabo con la finalidad de aislar y destruir al agente dañino o reparar un tejido u órgano dañado.

El envejecimiento fisiológico y muchas de las enfermedades asociadas a él son debidas a la existencia de un proceso inflamatorio de bajo grado que se caracteriza por un aumento de las citoquinas pro-inflamatorias y quemoquinas que a la larga van a ser responsables del proceso de deterioro paulatino de los tejidos. Como hemos mencionado anteriormente, en estudios previos de nuestro grupo se observa que el envejecimiento produce un aumento de las citoquinas inflamatorias en el hígado (Cuesta y cols, 2010) y el corazón (Forman y cols, 2010) en los ratones SAMP8. Los datos actuales se corresponden con los observados previamente mostrando un aumento en los marcadores inflamatorios como son TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6 y MCP1 además de un descenso en la expresión de IL-10 en el páncreas de los ratones SAMP8 viejos. Sin embargo no se han encontrado diferencias entre jóvenes y viejos en los ratones SAMR1 de lo que se deduce que todavía no presentan ningún deterioro.

El factor de transcripción NF $\kappa$ B está directamente relacionado con genes de tipo inflamatorio. Muchos de los genes implicados en el proceso de envejecimiento son factores de transcripción que activan a sus genes diana al unirse a zonas concretas del DNA. Por ejemplo se ha observado que la afinidad del factor de transcripción NF $\kappa$ B por el material genético aumenta de manera significativa con el envejecimiento en roedores. NF $\kappa$ B es un factor pleiotrópico responsable del control transcripcional de numerosos genes (Lenardo y Baltimore., 1989) como los relacionados con

---

citoquinas proinflamatorias (como TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ ), ciclooxigenasas (COX-2) y óxido nítrico sintetas (iNOS), además es muy importante en la regulación de la respuesta celular en presencia de estrés (Helenius y cols., 2001; Valen et al., 2001). Estos cambios relacionados con la edad son más relevantes en tejidos como el hígado pero se han observado también en otros tejidos. En este trabajo estamos demostrando asimismo que los niveles de expresión de NF $\kappa$ B también se encuentran aumentados en el páncreas envejecido. Esto sugiere que el aumento en la unión de NF $\kappa$ B al material genético está de alguna manera activado constitutivamente por el proceso de envejecimiento. NF $\kappa$ B es un término genérico que hace referencia a una importante familia de factores de transcripción compuesta por diversas subunidades de la familia Rel y que poseen diversas funciones fisiológicas (Valen y cols, 2001) que se han estudiado de manera independiente en el páncreas de las distintas cepas de ratones. El dominio Rel homólogo es el que contiene la secuencia de localización nuclear que permite la unión al DNA. La otra parte es la que permite la unión a las otras subunidades de la familia y la interacción con otras proteínas. Estudios realizados en modelos “knockout” indican la existencia de roles específicos para cada una de las subunidades, así se ha demostrado que NF $\kappa$ B p65 es la única subunidad esencial para la supervivencia de los organismos. De hecho sólo las subunidades p65, Rel B y Rel C son las que poseen dominios de activación transcripcional y por lo tanto pueden promover la transcripción génica (Hayden y Ghosh 2004). Diversos estudios han demostrado que con el envejecimiento se observa un aumento en la expresión de las subunidades p52 y p65, mientras que no se detectan cambios en la expresión de NF $\kappa$ B p50 al comparar roedores jóvenes con viejos (Helenius y cols, 2001). Además en estos trabajos no se encontraron cambios en las expresiones de las I $\kappa$ Bs con el envejecimiento. Nuestros resultados corroboran lo observado por Helenius y cols (2001) ya que el envejecimiento aumenta la expresión proteica de todas las subunidades del complejo NF $\kappa$ B (pero la subunidad p50 no aumenta de

---

manera estadísticamente significativa, sólo se observa una tendencia) en el páncreas de los ratones SAMP8. Este aumento en la expresión de las subunidades de NFkB puede estar íntimamente relacionada con el incremento que hemos observado en las citoquinas inflamatorias y con el aumento observado en el estrés oxidativo. Probablemente NFkB se encuentre también activado por citoquinas inflamatorias y otras enzimas. En cuanto a las subunidades reguladoras (IkB $\alpha$  e IkB $\beta$ ) la expresión de IkB $\alpha$  disminuye con la edad mientras que la expresión de IkB $\beta$  aumenta. Hay autores que opinan que IkB $\alpha$  podría actuar como un mecanismo de control y que puede inducir la re-exportación de NFkB al citoplasma. En nuestros animales la expresión de IkB $\alpha$  se encuentra disminuída con la edad por lo que no es capaz de captar el NFkB que se encuentra unido al ADN activando genes relacionados con la inflamación, el estrés oxidativo y la apoptosis. IkB $\beta$  empezaría a funcionar cuando existiera algún problema con la subunidad alpha.

**El proceso de envejecimiento hace que aumente la expresión de NFkB y disminuya la expresión de IkBs, además de aumentar de manera significativa la expresión de citoquinas pro-inflamatorias y disminuir las anti-inflamatorias.**

Tanto el aumento de estrés oxidativo como la inflamación crónica contribuyen a la generación de procesos apoptóticos. La apoptosis o muerte celular programada es un proceso ordenado por el que la célula muere ante estímulos intra o extra celulares. Es un proceso fundamental en el desarrollo de órganos y sistemas para el mantenimiento de la homeostasis del número de células y en la defensa frente a patógenos.

---

Asimismo es el mecanismo de eliminación de las células con alteraciones en el DNA. Sin embargo con la edad se produce un aumento significativo de estos procesos que puede llegar a conducir a alteraciones importantes en el funcionalismo de órganos y tejidos.

La supervivencia de las células beta es el factor más importante a tener en cuenta para el mantenimiento del metabolismo de la glucosa. La diabetes tipo 2 aparece cuando el páncreas no es capaz de secretar la concentración de insulina suficiente para la demanda del organismo (Lingohr y cols, 2002; Donath y Halban, 2004) ya sea debido a una disfunción en la secreción y/o a una disminución de las células beta productoras de insulina. La apoptosis de este tipo celular es muy importante en el desarrollo de la diabetes tipo 1, pero el crecimiento celular y la supervivencia también son importantes en la diabetes tipo 2 (Harding y Ron, 2002). La sensibilidad que muestran las células beta a la apoptosis depende principalmente del balance que exista en las proteínas de la familia Bcl-2. Las proteínas de la familia Bcl-2 se encuentran normalmente en el citosol como sensores de daño celular o de condiciones de estrés. En condiciones de estrés se colocan en la superficie de la mitocondria.

La mitocondria contiene miembros pro-apoptóticos como AIF, Smac/DIABLO y el citocromo C, los cuales salen de ésta a través de poros de transición generados en la membrana mitocondrial dando lugar a la formación de apoptosomas y activando la cascada de caspasas (Robertson y cols, 2004; Woo y cols, 2003). Los estímulos que provocan este proceso son de dos tipos, estímulos extracelulares como las radiaciones que ejercen su función a través de citoquinas como el TNF- $\alpha$ , o bien la falta de señales hormonales o de factores tróficos y estímulos intracelulares que pueden ser mitosis incompletas, daños irreparables en el material genético, aumento de las especies reactivas de oxígeno etc.

La apoptosis es un proceso muy finamente regulado. Si ocurre un exceso o un defecto de apoptosis, se producen diversas patologías como malformaciones, defectos en el desarrollo, enfermedades autoinmunes,

---

enfermedades neurodegenerativas o aparición de tumores. Es un componente normal en el desarrollo de los organismos multicelulares y sigue siendo importante durante la vida adulta, eliminando los tejidos y las células dañadas. En los organismos saludables existe un equilibrio entre apoptosis y proliferación (Heimberg y cols, 2001), en cambio, bajo diversas circunstancias como el envejecimiento predominan los procesos apoptóticos y pueden llegar a alterar las funciones fisiológicas. Se sabe que miembros de la familia Bcl-2 están implicados en la señalización de citoquinas y en la supervivencia celular (Rehman y cols, 2003; Le Roith y cols, 2001) por lo que en este trabajo se han estudiado algunos marcadores del proceso de apoptosis que tiene relación con estímulos intracelulares, fundamentalmente el sistema de proteínas pro-apoptóticas y anti-apoptóticas de la familia Bcl-2. Como se ha mencionado en la introducción la familia Bcl-2 está compuesta por miembros pro-apoptóticos como BAD y Bax y miembros anti-apoptóticos como Bcl-2. En este trabajo se ha observado que los miembros pro-apoptóticos aumentan significativamente con la edad mientras que Bcl-2 disminuye, por lo tanto el equilibrio se encuentra desplazado hacia la muerte celular. Cuando no se detectan factores de supervivencia, BAD se defosforila desplazando el equilibrio hacia la apoptosis, haciendo que salgan de la mitocondria el citocromo C, SMAC y AIF y posteriormente generar apoptosis.

Las proteínas inhibidoras de apoptosis (IAPs) bloquean la actividad de las caspasas. XIAP (del inglés *X-chromosome linked inhibitor of apoptosis protein*) es el miembro más potente de la familia de las IAPs. XIAP inhibe la activación de las caspasas y por lo tanto la iniciación de la apoptosis. Precisamente en este trabajo se ha observado que la expresión de XIAP está disminuida en los animales SAMP8 viejos, pero no se han encontrado diferencias entre jóvenes y viejos en los ratones SAMR1. Al medir la expresión de AIF no se han encontrado cambios significativos con el envejecimiento en ninguna de las dos cepas de ratones.

---

## **Efecto de los tratamientos**

Ya hemos mencionado anteriormente que durante el envejecimiento se da una disminución en la secreción y producción de diversas hormonas, entre ellas la melatonina y la GH (Reiter y cols, 1980; Sack y cols, 1986; Castillo y cols, 2005a). Nuestro grupo lleva más de 30 años investigando el efecto protector que puede tener la terapia hormonal sustitutiva sobre diferentes tejidos siempre administrándolo a dosis fisiológicas (Castillo y cols, 2004, 2005a, 2005b; Azcoitia y cols, 2005; Kireev y cols, 2007a, 2007b, Forman y cols, 2010; Cuesta y cols, 2010, 2011). Según los resultados obtenidos de estas investigaciones se puede concluir que la administración de ambas hormonas por separado determina una mejora importante en la mayoría de parámetros estudiados.

En este apartado vamos a analizar el efecto de los tratamientos crónicos con melatonina (Mel) a dos dosis, hormona de crecimiento (GH) y la combinación de ambas (GH+Mel) con la dosis de melatonina más baja, sobre los marcadores inflamatorios, oxidativos y apoptóticos en el páncreas de los ratones SAMP8.

### Hormona de crecimiento (GH)

Como hemos mencionado anteriormente, durante el envejecimiento se dan alteraciones en el eje GH/IGF-I, dando lugar a un descenso en la secreción de GH y, por consiguiente, en los niveles plasmáticos de IGF-I.

---

El estrés oxidativo, una de las características típicas del envejecimiento, se define como la alteración del equilibrio entre la producción de especies prooxidantes y las antioxidantes, a favor de las primeras (Sies y Mehlhorn, 1986). Está demostrado que tanto la GH como el IGF-I son capaces de modular el estrés oxidativo (Kenyon, 2005; Warner, 2005; Goto y cols, 1999; Lebermann y Baltimore, 1990). En esta Tesis Doctoral observamos que la GH fue capaz de disminuir la expresión de HO-1, iNOS y NO<sub>x</sub> y por lo tanto reducir el estrés oxidativo en el páncreas. Estos resultados se corresponden con trabajos previos de nuestro grupo donde observamos que la administración de GH reduce la peroxidación lipídica, mantiene los niveles de GSH, aumenta la actividad de enzimas antioxidantes, mejora la función mitocondrial, aumenta la producción de ATP y preserva la función hepática (Castillo y cols, 2004). En cuanto a las enzimas antioxidantes hemos observado que la GH en páncreas solo es capaz de aumentar la expresión de la glutatión reductasa, pero bien es cierto que no hay grandes cambios con la edad en estas enzimas.

La ruta insulina/IGF-I ha sido definida como una pieza clave en la longevidad de muchas especies y en la modulación de la activación de citoquinas (IL-1 $\beta$ , IL-6 (Lebermann y Baltimore, 1990) y TNF- $\alpha$  (Yao y cols, 1997) y enzimas inflamatorias mediadas por NF $\kappa$ B (COX-2 e iNOS (Taylor y cols, 1998). El tratamiento con GH es capaz de disminuir la expresión de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6 y MCP1, a la vez que aumenta los niveles de IL-4 (antiinflamatorio), pero sin que se observen diferencias en la expresión de IL-10. También es capaz de reducir la expresión de NF $\kappa$ B p50 y NF $\kappa$ B p52 pero no ejerce efectos en la subunidad NF $\kappa$ B p65 ni en las subunidades de las I $\kappa$ Bs.

---

El envejecimiento se relaciona también con la llamada “muerte celular programada” o apoptosis. La apoptosis se encuentra íntimamente relacionada con el incremento y la producción de ROS, también NFκB tiene efectos sobre el proceso de apoptosis aunque, como se ha mencionado anteriormente, depende del estímulo que el equilibrio se desplace hacia la apoptosis o hacia la supervivencia. El balance entre proteínas inductoras (Bax) y represoras (Bcl2) constituye uno de los mecanismos de control más importantes en la regulación de los mecanismos de muerte celular por apoptosis. Algunas hormonas desempeñan acciones muy evidentes a nivel molecular sobre estos procesos.

La GH es esencial para el crecimiento somático y el desarrollo de los organismos, además tiene un papel fundamental en la homeostasis del metabolismo (Castillo y cols, 2004; Tresguerres y cols, 2008). Diversos estudios demuestran que la GH estimula el crecimiento de los islotes pancreáticos y la secreción de insulina (Galsgaard y cols, 1996). En esta Tesis Doctoral se ha demostrado que los animales SAMP8 tratados con GH aumentan la expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2 a la vez que disminuyen los componentes pro-apoptóticos. Además el tratamiento con GH es capaz de aumentar la expresión del mRNA de XIAP de manera significativa. En resultados previos de nuestro grupo se ha demostrado que el tratamiento con GH también es capaz de disminuir el proceso inflamatorio en el hígado (datos no publicados) y corazón (Forman y cols, 2010) de animales viejos SAMP8.

### Melatonina

En humanos los niveles de melatonina comienzan a descender a partir de los 25-35 años y a la edad de 40-60 años los niveles son un 35-50% de los que encontramos en individuos jóvenes (Acuña-Castroviejo D y cols,

---

2003). Paralelamente a esta disminución de la secreción de melatonina se da un incremento en la tasa de producción de radicales libres y una disminución de la actividad de enzimas antioxidantes a la vez que se produce un aumento de la inflamación y de la apoptosis, características típicas de envejecimiento.

Se ha comprobado que la melatonina actúa como un “captador” de radicales libres (Tan et al.,1994; Tan et al., 1998) y como antioxidante tanto directo como indirecto (Reiter, 1995; Reiter, 1998; Reiter y cols.,1981). El tratamiento con melatonina también demostró ser capaz de disminuir la expresión génica de marcadores de estrés oxidativo como iNOS a las dos concentraciones estudiadas pero HO-1 solo disminuyó con la dosis más alta. Por otro lado los valores altos de NOx observados en animales SAMP8 viejos disminuyen solo con el tratamiento a la mayor dosis. En los ratones SAMR1 no se observan diferencias entre jóvenes y viejos, los tratamientos tampoco ejercen ningún cambio.

Teniendo en cuenta que la producción de melatonina disminuye con la edad de los individuos (Reiter, 1998 and Reiter et al., 1981), se podría especular que debido a la pérdida de esta capacidad antioxidante, los radicales libres podrían causar mas daños en las últimas etapas de la vida (Reiter, 1998 and Reiter et al., 1981), (Reiter, 1997 y Reiter, 1998). En cuanto a las enzimas antioxidantes:

La SOD que encontrábamos disminuida en el páncreas de los animales viejos SAMP8 no se encuentra modificada con el tratamiento con melatonina a ninguna de las dos dosis. En los animales SAMR1 si que es capaz de aumentar la expresión de este enzima.

La GST no se encontraba modificada en los animales SAMP8 viejos y por lo tanto los tratamientos con melatonina no ejercieron ningún efecto. No se encontraron diferencias en los niveles de GST entre los ratones de la cepa de los SAMR1 con la edad. Estos animales se sometieron a tratamiento con

---

melatonina a las dos dosis pero tampoco se observaron efectos evidentes ya que si no hay alteraciones difícilmente se pueden observar mejorías.

La GPx se encontraba disminuida en los animales viejos SAMP8 pero la melatonina no fue capaz de modificar la expresión de este enzima con ninguna de las dos dosis. Tampoco se encontraron diferencias ni con la edad ni con el tratamiento en los animales de la cepa de los SAMR1.

La GR disminuye con el envejecimiento en los ratones SAMP8, no se encontraron diferencias en la cepa de los SAMR1 ni con la edad ni con los tratamientos con melatonina. En cambio, en los SAMP8 con la dosis más baja de melatonina no se modifica la expresión de este enzima pero la dosis más alta, paradójicamente, disminuye la expresión de este enzima por debajo del nivel de detección. Esto podría ser debido a que en los animales tratados con melatonina a dosis altas casi no tienen niveles de peróxido y de lipoperóxidos y no es necesaria la presencia del enzima para detoxificarlos.

La relación GSH/GSSG no varía con la edad en los animales SAMP8. Al tratar a los animales con melatonina observamos que este porcentaje aumenta con el tratamiento a la dosis más baja pero a la más alta no ejerce ningún efecto. Esto podría ser debido a que la melatonina a la dosis más elevada y de forma directa hace que en el organismo se produzcan menos radicales libres y por lo tanto no sería necesario neutralizarlos. En los ratones SAMR1 se observa que hay una disminución de esto en los animales viejos al compararlos con los jóvenes. El tratamiento con melatonina es capaz de aumentar este porcentaje con las dos dosis.

Diversos estudios demuestran que la melatonina tiene funciones antioxidantes y anti-inflamatorias. Por ejemplo, la melatonina modula el proceso inflamatorio asociado con la pancreatitis y reduce la peroxidación lipídica (Barlas y cols, 2004; Qi y cols, 1999). En nuestros resultados observamos que el tratamiento con melatonina disminuye la expresión de citoquinas pro-inflamatorias como TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  (ésta última de

---

manera dosis dependiente) y aumenta la expresión de IL-10 también siguiendo un patrón dosis-repuesta. Por lo tanto es capaz de modular el estado inflamatorio asociado a la edad en los animales SAMP8.

Se administró melatonina a los ratones SAMR1 pero como los procesos inflamatorios no son mayores en estos ratones con la edad, el tratamiento con melatonina no ejerció ningún efecto en estos ratones. Un resultado paradójico es que los ratones SAMR1 viejos muestran mayores niveles de IL-10 que los jóvenes y los tratamientos con melatonina hacen que disminuyan dichos niveles. Los niveles pancreáticos de IL-6, que se encontraba aumentada en ambas cepas de ratones, disminuyen con los tratamientos.

En cuanto a las subunidades del factor de transcripción NFκB, el tratamiento es capaz de disminuir la expresión de NFκB p52 de manera dosis dependiente, pero no se observan cambios en la expresión de NFκB p50 ni de NFκB p65 en el páncreas de los ratones SAMP8. En cuanto a las subunidades reguladoras, el tratamiento es capaz de aumentar la expresión de IκBα a las dos dosis pero sólo la dosis más alta es capaz de aumentar la expresión de IκBβ en los ratones SAMP8. En los ratones SAMR1 sólo se encuentra aumentada la expresión de NFκB p52, las demás subunidades no están aumentadas con la edad.

Como ya se ha mencionado el proceso de apoptosis es un proceso fisiológico y finamente regulado que tiene lugar en el desarrollo normal de los individuos, en la morfogénesis y en la reparación de tejidos (Yew y cols, 2001; Khalfaoui y cols, 2007; Abu y cols, 2007). Con el envejecimiento la expresión del mRNA de Bcl-2 disminuye de manera significativa en los ratones SAMP8 a la vez que se observa un aumento del mRNA de BAD. Debido a esto, los ratones SAMP8 tienen menos protección frente a la apoptosis según aumenta la edad de éstos. En los ratones SAMR1 no se observan diferencias con la edad. Las proteínas inhibidoras de apoptosis

---

(IAPs) bloquean la actividad de las caspasas de manera endógena. XIAP (del inglés *X-chromosome linked inhibitor of apoptosis protein*) es el miembro más potente de la familia de las IAPs. XIAP inhibe tanto la activación de la cascada de las caspasas (a nivel de la caspasa 9) como la acción final de esta cascada (inhibiendo a la caspasa 3). Hay muchos estudios que demuestran que el aumento de XIAP está relacionado con la supresión de la apoptosis tanto en modelos in vivo como in Vitro (Deveraux y cols, 1997; Deveraux y cols, 1998). En nuestros resultados hemos observado una disminución de la expresión del mRNA de XIAP en los animales SAMP8 viejos mientras que en los SAMR1 no se encuentran diferencias con la edad. La dosis de melatonina 10mg es capaz de aumentar la expresión del mRNA de marcadores antiapoptóticos como son Bcl-2 y XIAP. Y además es capaz de aumentar el ratio anti/pro-apoptosis desplazando el equilibrio hacia la supervivencia.

Se sabe que la melatonina inhibe el crecimiento celular y la metástasis invasiva en cultivo de células cancerígenas, además hay muchos estudios en los que se demuestra que la melatonina in vivo disminuye el crecimiento de los tumores. Las propiedades antitumorales de la melatonina se limitan a la inhibición del crecimiento celular aumentando la apoptosis (Cos y cols, 1998). Por otra parte, la melatonina también ha demostrado poseer propiedades oncostáticas, anti-apoptóticas e inmunomoduladoras actuando como inmunoestimulante en células no cancerígenas. En nuestros animales podemos observar que la melatonina se comporta como anti-apoptótica. La dosis más baja de melatonina es suficiente para disminuir la expresión del mRNA de BAD mientras que no es capaz de modificar la expresión de Bcl-2 en los ratones SAMP8. Lo importante no es cómo se comporta cada marcador por separado, al analizar lo que ocurre con el ratio anti/pro-apoptótico podemos observar que disminuye en los animales viejos y sólo la dosis de melatonina a 10 mg es capaz de aumentarlo. Por otra parte el marcador XIAP también se encuentra aumentado con la dosis más elevada de melatonina. No se

---

encontraron diferencias significativas entre animales jóvenes y viejos SAMR1.

### Hormona de crecimiento combinada con melatonina (GH+Mel)

Al observar que los tratamientos con GH y melatonina administrados por separado dieron buen resultado en cuanto a las alteraciones debidas a la edad, planteamos el tratamiento combinado por si existiera algún tipo de sinergia.

Estudios previos de nuestro grupo en el corazón de ratones SAMP8 demuestran que el tratamiento combinado ejerce un efecto protector frente a los procesos inflamatorios, oxidativos y apoptóticos (Forman y cols, 2010).

En lo que se refiere al estrés oxidativo, el tratamiento de GH con melatonina hace que disminuya la expresión de las hemo-oxigenasas pero no ejerce ningún efecto en lo que a las oxido nítrico sintasas se refiere. Los tratamientos administrados por separado si que son capaces de disminuir la expresión de la oxido nítrico sintasa inducible. Por lo tanto, en algún punto de la cascada de señalización las acciones de la GH y de la melatonina tienen que bloquearse.

Además, en lo que se refiere a la defensa antioxidante no se han encontrado diferencias en la expresión de SOD, al igual que ocurría con los tratamientos administrados por separado, pero este enzima tampoco cambia con la edad en el páncreas de los ratones SAMP8.

El tratamiento combinado disminuye la expresión de GST, aunque no se veía modificada por la edad. Observamos que el tratamiento con melatonina no es capaz de modificar este parámetro pero la GH si que lo

---

modifica a sí que podríamos pensar que en este punto, las dos hormonas no siguen la misma ruta, ni se interrelacionan entre ellas.

GPx y GR que disminuyen con la edad, aumentan con el tratamiento de GH+Mel. La GPx sólo se modifica con el tratamiento con melatonina y la GR con la GH. No se encuentran diferencias significativas entre tratamientos.

El ratio GSH/GSSG que no se encontraba aumentado con la edad y disminuye con el tratamiento combinado, solamente el tratamiento con melatonina es capaz de modificarlo.

Estos resultados indican que en lo referido a la defensa antioxidante el tratamiento combinado ejerce efectos sinérgicos ya que es capaz de disminuir los marcadores de estrés oxidativo (de la misma manera que lo hacían los tratamientos por separado) pero los efectos son aditivos en cuanto a los parámetros medidos de defensa antioxidante (que los tratamientos por separado no eran capaces de modificar).

Con el tratamiento combinado disminuye la expresión de NFkB p52 y NFkB p65 pero no se ve modificada la expresión de NFkB p50 (la cual tampoco cambia con la edad). Tampoco es capaz de modificar la expresión de las IκBs.

Por otro lado los tratamientos por separado eran capaces de disminuir la expresión de las citoquinas inflamatorias TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  al igual que el tratamiento combinado y la expresión de IL-10 no se ve modificada con ninguno de los tratamientos. Por lo tanto se puede decir que a nivel de inflamación el tratamiento combinado no ejerce ningún efecto potenciador de los tratamientos por separado.

---

En cuanto al proceso de apoptosis, el tratamiento combinado de GH con melatonina no es capaz de modificar la expresión de proteínas y por lo tanto no modifica el balance pro/anti apoptótico. Por otra parte si que es capaz de aumentar la expresión génica de Bcl-2, por lo que a nivel génico ejerce efectos positivos.

---

# *Conclusiones*

- 
1. En los ratones SAMP8 el envejecimiento produce un aumento de marcadores de oxidación como óxido nítrico, hemoxigenasas y nitrogenasas, a la vez que una disminución de la defensa antioxidante tanto en el hígado como en el páncreas. Aumentan asimismo los marcadores de inflamación (como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, etc) y los favorecedores de la apoptosis (BAD, BAX) disminuyendo los antiapoptóticos (Bcl 2). Además el factor de transcripción NF $\kappa$ B aumenta su expresión durante el envejecimiento y las subunidades reguladoras de este factor de transcripción disminuyen.

Es posible que estas condiciones pancreáticas aceleren el deterioro de las células beta y disminuyan su capacidad secretora de insulina en los ratones SAMP8.

En los ratones de la cepa SAMR1 no se observan casi alteraciones con la edad de los individuos, por esto son un buen control de las alteraciones debidas al envejecimiento.

2. Los niveles plasmáticos de insulina están incrementados en ambos tipos de ratones como consecuencia del incremento en la resistencia periférica a la misma. El contenido pancreático de insulina se encuentra aumentado en los ratones de la cepa SAMP8, aunque la expresión del mRNA de insulina y glucagón no se modifica con el envejecimiento. Sin embargo, en los ratones SAMR1 viejos se mantiene el incremento del contenido pancreático mientras que en los SAMP8 disminuye, probablemente por incapacidad de mantenerlo con los niveles elevados de estrés oxidativo y de inflamación a los que se encuentra sometido el páncreas. También hemos observado que el mRNA de GLUT 2 se encuentra aumentado en los ratones SAMP8 viejos, éste además de ser un transportador es un sensor de glucosa y aumenta la sensibilidad a ésta.

---

Por esto, aunque los niveles de glucemia se mantienen controlados en todos los ratones, si la situación persistiera, el páncreas de los SAMP8 se agotaría, aumentando los niveles de glucemia y dando lugar a la Diabetes tipo 2.

3. Al analizar en los ratones SAMP8 viejos la expresión de genes relacionados con la proliferación (PCNA y Sei1) y la diferenciación de los islotes (Pdx-1) observamos que no disminuye el número de células con la edad, sino que hay una menor diferenciación de estas células, con lo que no llegan a diferenciarse como células secretoras y por lo tanto no ejercen su función.
  
4. La terapia sustitutiva con hormona de crecimiento y/o melatonina en los ratones SAMP8 es capaz de modular el estado inflamatorio, oxidativo y apoptótico ejerciendo un efecto protector sobre las lesiones tanto hepáticas como pancreáticas inducidas por la edad. De esta forma mejora la homeostasis de la glucosa disminuyendo los niveles plasmáticos de insulina y su contenido pancreático. En los ratones SAMR1, al no presentar evidentes alteraciones debidas al envejecimiento no se realizaron los tratamientos ya que no era teóricamente posible mejorar una situación que no se encuentra dañada.

---

# *Bibliografía*

---

Abu El-Asrar AM, Dralands L, Missotten L, Geboes K (2007). **Expression of antiapoptotic and proapoptotic molecules in diabetic retinas.** *Eye.* 21:238-245

Acuña Castroviejo D, Martín M, Macías M, Escames G, León J, Khaldy H y Reiter RJ (2001). **Melatonin, mitochondria and cellular bioenergetics.** *J Pineal Res.* 30:65-74.

Acuña-Castroviejo D, Escames G, León J, Carazo A, Khaldy H (2003). **Mitochondrial regulation by melatonin and its metabolites.** *Adv Exp Med Biol.* 527:549-57.

Adamson U, Cerasi E (1975). **Acute suppressive effect of human growth hormone on basal insulin secretion in man.** *Acta Endocrinol (Copenh).* 79:474-482

Adamson U, Efendic S (1979). **Insulin-like and diabetogenic effects of growth hormone in healthy subjects, diabetics, and low insulin responders.** *J Clin Endocrinol Metab.* 49:456-461

Adamson U (1981). **On the diabetogenic effect of growth hormone in man: effects of growth hormone of glucagon and insulin secretion.** *Eur J Clin Invest.* 11(Suppl 1):115-119

Adler A, Sinha S, Kawahara TLA, Zhang JY, Segal E y Chang HY (2007). **Motif module map reveals enforcement of aging by continual NF-kB activity.** *Genes & development.* 21:3244 -3257.

Ai M, Tanaka A, Ogita K, Sekine M, Numano F, Numano F y Reaven GM (2000). **Relationship between hyperinsulinemia and remnant lipoprotein concentrations in patients with impaired glucose tolerance.** *J Clin Endocrinol Metab.* 85:3557-60.

Aimoto T, Rohde BH, Chiou GC y Lauber JK (1985). **N-acetyltransferase activity and melatonin level in the eyes of glaucomatous chickens.** *J Ocul. Pharmacol.* 1:149-160.

Aleman V y Handler P (1967). **Dihydroorotate dehydrogenase. I. General properties.** *J. Biol. Chem.* 242:4087-4096.

Allegra M, Reiter RJ, Tan DX, Gentile C, Tesoriere L, Livrea MA (2003). **The chemistry of melatonin's interaction with reactive species.** *J Pineal Res.* Jan;34(1):1-10. Review.

Alonso M, Collado PS, González-Gallego J (2006). **Melatonin inhibits the expression of the inducible isoform of nitric oxide synthase and nuclear factor kappa B activation in rat skeletal muscle.** *J Pineal Res.* Aug;41(1):8-14.

---

Alonso-Fernández P y de la Fuente M (2008). **Immunological markers of ageing**. Rev Esp Geriatr Gerontol. May-Jun;43(3):167-79.

Anantharaju A, Feller A y Chedid A (2002). **Ageing Liver**. A review. Gerontology 2002. 48:343-353.

Andiran N y Yordam N (2007). **TNF-alpha levels in children with growth hormone deficiency and the effect of long-term growth hormone replacement therapy**. Growth Horm IGF Res. Apr;17(2):149-53. Epub 2007 Feb20.

Antolín I, Mayo JC, Sáinz RM, del Brio MA, Herrerías F, Martín V y Rodríguez C (2002). **Protective effect of melatonina in a chronic experimental model of Parkinson's disease**. Brain Res. 943:163-173.

Antolín I, Rodríguez C, Sáinz RM, Mayo JC, Rodríguez-Colunga MJ, Tolia D y Menéndez-Peláez A (1996). **Neurohormone melatonina prevents cell damage: effect on gene expresión for antioxidante enzymes**. FASEB J. 10:882-890.

Aoyama H, Nori N y Mori W (1988). **Effects of melatonin on genetic hypercholesterolemia in rats**. Atherosclerosis. 69:269-272.

Arce V y Devesa J (2000). **Hormona de crecimiento**. En Tresguerres J.A.F. (ed.) Tratado de Endocrinología básica y clínica. Síntesis, Madrid, pp: 337-378.

Ariznavarreta C, Cardinali DP, Villanua MA, Granados B, Martín M, Chiesa JJ, Golombek DA y Tresguerres JA (2002). **Circadian rhythms in airline pilots submitted to long-haul transmeridian flights**. Aviat Space Environ Med. 73:445-455.

Arkan MC, Hevener AL, Greten FR, Maeda S, Li ZW, Long JM, Wynshaw-Boris A, Poli G, Olefsky J y Karin M (2005). **IKK-β links inflammation to obesity-induced insulin resistance**. Nat Med. 11:191-198

Azcoitia I, Perez-Martin M, Salazar V, Castillo C, Ariznavarreta C, Garcia-Segura LM, Tresguerres JA (2005). **Growth hormone prevents neuronal loss in the aged rat hippocampus**. Neurobiol Aging. May;26(5):697-703.

Babior BM (1978). **Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes**. N Engl J Med. 298:659-68

Baeza I, Alvarado C, Alvarez P Salazar V, Castillo C, Ariznavarreta C, Fdez-Tresguerres JA y De la Fuente M (2009). **Improvement of leucocyte functions in ovariectomised aged rats after treatment with growth hormone, melatonin, oestrogen or phyto-oestrogens**. J Reprod Immunol. Jun 80(1-2):70-9

---

Barja G (2002). **Rate of generation of oxidative stress-related damage and animal longevity.** Free Radic Biol Med. Nov 1;33(9):1167-1172.

Barlas A, Cevik H, Arbak S, Bangir D, Sener G, Yeğen C, Yeğen BC (2004). **Melatonin protects against pancreaticobiliary inflammation and associated remote organ injury in rats: role of neutrophils.** J Pineal Res. Nov;37(4):267-75.

Barthel A, Schmoll D, Unterman TG (2005). **FoxO proteins in insulin action and metabolism.** Trends Endocrinol. Metab. 16:183-189.

Basu R, Breda E, Oberg AL, Powell CC, Dalla Man C, Basu A, Vittone JL, Klee GG, Arora P, Jensen MD, Toffolo G, Cobelli C, Rizza RA (2003). **Mechanisms of the age-associated deterioration in glucose tolerance: contribution of alterations in insulin secretion, action, and clearance.** Diabetes. 52:1738-1748.

Basuroy S, Bhattacharya S, Tcheranova D, Qu Y, Regan RF, Leffler CW, Parfenova H (2006). **HO-2 provides endogenous protection against oxidative stress and apoptosis caused by TNF-alpha in cerebral vascular endothelial cells.** Am J Physiol Cell Physiol. 2006 Nov;291(5):C897-908. Epub Jul 5.

Baynes JW (1991). **Role of oxidative stress in development of complications in diabetes.** Diabetes. 40(4):405-412.

Becattini B, Marone R, Zani F, Arsenijevic D, Seydoux J, Montani JP, Dulloo AG, Thorens B, Preitner F, Wymann MP, Solinas G (2011). **PI3K $\gamma$  within a nonhematopoietic cell type negatively regulates diet-induced thermogenesis and promotes obesity and insulin resistance.** Proc Natl Acad Sci U S A. Sep 26. [Epub ahead of print]

Beckman JS y Koppenol WH (1996). **"Nitric oxide, superoxide, and peroxyinitrite: the good, the bad and ugly."** Am. J. Physiol. 271:C1424-C1437.

Beckman JS, YeYZ Anderson PG, Chen J, Accavitti MA, Tarpey MM, White CR (1994). **"Extensive nitration of protein tyrosines in human atherosclerosis detected by immunohistochemistry."** Biol. Chem. Hoppe Seyler. 375:81-88.

Bellino FL y Wise PM (2003). **Nonhuman primate models of menopause workshop.** Biol. Reprod. 2003. 68:10-18.

Berthou C, Zhang Y, Sasportes M (1998). **Granzyme B: an essential protease for the inflammatory response.** Pathol Biol (Paris). 46:617-24.

Bielsky BH y Gebieki, JM (1977). **Application of radiation chemistry to biology.** Free radicals in biology. P. W.A., Academic Press. 3:1-19.

---

Bixquert Jiménez M (2004). **Cambios digestivos en la madurez. En: Longevidad. Tratado integral sobre la salud en la segunda mitad de la vida.** Salvador-Carulla L., Cano Sánchez A., Cabo-Soler JR (eds.). Editorial Médica Panamericana, Madrid pp.202-208.

Boveris A y Chance B (1973). **The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen.** Biochem. J. 134:707-716.

Boveris A, Oshino N, Chance B (1972). **"The cellular production of hydrogen peroxyde."** Biochem. J. 128:617-630.

Bratton SB y Cohen GM (2003). **Death receptors leave a caspase footprint that Smacs of XIAP.** Cell Death Differ 10:4-6, 2003

Breese, CR, R L Ingram, W E Sonntag (1991). **Influence of age and longterm dietary restriction on plasma insulin-like growth factor-1 (IGF-1), IGF-1 gene expression, and IGF-1 binding proteins.** J.Gerontol. v.46,pB180-B187.

Brown K PS, Kanno T, Franzoso G, Siebenlist U (1993). **Mutual regulation of the transcriptional activator NF-kappa B and its inhibitor, I kappa B-alpha.** Proc Natl Acad Sci U S A. 90:2532-2536.

Bubenik GA (1980). **Localization of melatonin in the digestive tract of the rat. Effect od maturation, diurnal variation, melatonin treatment and pinealectomy.** Horm Res. 12:313-323.

Butterfield DA y Poon HF (2005). **The senescence-accelerated prone mouse (SAMP8): a model of age-related cognitive decline with relevance to alterations of the gene expression and protein abnormalities in Alzheimer\_s disease.** Exp Gerontol. 40:774-783.

Cai H, Harrison DG (2000). **Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress.** Circ Res. Nov 10;87(10):840-4. Review.

Cardinali DP, Cano P, Jiménez-Ortega V, Esquifino AI (2011). **Melatonin and the Metabolic Syndrome: Physiopathologic and Therapeutical Implications.** Neuroendocrinology. 2011;93(3):133-42.

Carretero M, Escames G, López LC, Venegas C, Dayoub JC, García L, Acuña-Castroviejo D (2009). **Long-term melatonin administration protects brain mitochondria from aging.** Pineal Res. Sep;47(2):192-200. Epub 2009 Jul 1.

Castillo C, Salazar V, Ariznavarreta C, Vara E, Tresguerres JA (2004). **Effect of recombinant human growth hormone on age-related hepatocyte changes in old male and female Wistar rats.** Endocrine. Oct;25(1):33-9.

---

Castillo C, Salazar V, Ariznavarreta C, Vara E, Tresguerres JA (2005a). **Effect of growth hormone and estrogen administration on hepatocyte alterations in old ovariectomized female wistar rats.** *Endocrine.* Feb;26(1):11-8.

Castillo C, Salazar V, Ariznavarreta C, Vara E, Tresguerres JA (2005b). **Effect of melatonin administration on parameters related to oxidative damage in hepatocytes isolated from old Wistar rats.** *J Pineal Res.* May;38(4):240-6.

Chance B, Sies H y Boveris A (1979). **Hydroperoxide metabolism in mammalian organs.** *Physiol Rev.* 59:527-605

Chang HY y Yang X (2000). **Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases.** *Microbiol Mol Biol Rev.* 64:821-46.

Chuang JI, Mohan N, Meltz ML, Reiter RJ (1996). **Effect of melatonin on NF-kappa-B DNA-binding activity in the rat spleen.** *Cell Biol Int.* Oct;20(10):687-92.

Chung HY, Kim HJ, Kim JW y Yu BP (2001). **The inflammation hypothesis of aging: molecular modulation by calorie restriction.** *Ann N Y Acad Sci.* 928:327-335.

Chung HY, Kim HJ, Kim KW, Choi JS, Yu BP (2002). **Molecular inflammation hypothesis of aging based on the anti-aging mechanism of calorie restriction.** *Microsc Res Tech.* 59:264-272.

Chung HY, Sung B, Jung KJ, Zou Y y Yu BP (2006). **The molecular inflammatory process in aging, Antioxid. Redox. Signal.** 8:572-581

Cohen GM (1997). **Caspases: the executioners of apoptosis.** *Biochem J.* 326:1-16

Corpas E, Harman SM, Blackman M R (1993). **Human growth hormone and human aging.** *Endocr.Rev.* v. 14p.20-39.

Cos S, Fernández R, Guezmes A (1998). **Influence of melatonin on invasive and metastatic properties of MCF-7 human breast cancer cells.** *Cancer Res.* 58:4383-4390.

Coto-Montes A y Hardeland R (1999). **Antioxidative effects of melatonin in *Drosophila melanogaster*: antagonization of damage induced by the inhibition of catalase.** *J Pineal Res.* 27:154-158.

Cuesta S, Kireev R, Forman K, García C, Escames G, Ariznavarreta C, Vara E, Tresguerres JA (2010) . **Melatonin improves inflammation processes in liver of senescence-accelerated prone male mice (SAMP8).** *Exp Gerontol.* Dec;45(12):950-6.

---

Cuesta S, Kireev R, García C, Forman K, Escames G, Vara E, Tresguerres JA (2011b). **Beneficial effect of melatonin treatment on inflammation, apoptosis and oxidative stress on pancreas of a senescence accelerated mice model.** Mech Ageing Dev. Nov;132(11-12):573-82. Epub 2011 Oct 17.

Cuesta S, Kireev R, García C, Forman K, Vara E, Tresguerres JA (2011a). **Effect of growth hormone treatment on pancreatic inflammation, oxidative stress, and apoptosis related to aging in SAMP8 mice.** Rejuvenation Res. Oct;14(5):501-12. Epub Sep 29.

Czapski G y Goldstein S (1995). **The role of the reactions of NO with superoxide and oxygen in biological systems: A kinetic approach.** Free Radic. Biol. Med. 19(6):785-794.

Daitoku H, Hatta M, Matsuzaki H, Aratani S, Ohshima T, Miyagishi M, Nakajima T, Fukamizu A (2004). **Silent information regulator 2 potentiates Foxo1-mediated transcription through its deacetylase activity.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 101:10042-10047.

Dasgupta B, Milbrandt J (2007). **Resveratrol stimulates AMP kinase activity in neurons.** Proc Natl Acad Sci USA 104(17):7217- 7222.

Davidson MB (1987). **Effect of growth hormone on carbohydrate and lipid metabolism.** Endocr Rev. 8:115-131

Davies KJA, Sevanian A, Muakkassah-Kelly SF, Hochstein P (1986). **Uric acid-iron iron complexes. A new aspect of the antioxidant functions of uric acid.** Biochem. J. 235:747-754.

D'CostaAP, Ingram RL, Lenham JE, Sonntag WE (1993). **The regulation and mechanisms of action of growth hormone and insulin-like growth factor 1 during normal ageing.** J.Reprod.Fertil.Suppl. v. 46, p.87-98.

de Teresa Galván C (2004). **Sarcopenia. En: Longevidad. Tratado integral sobre la salud en la segunda mitad de la vida.** Salvador-Carulla L, Cano Sánchez A, Cabo-Soler JR (eds.). Editorial Médica Panamericana, Madrid 2004; pp.326-327.

del Peso L, González-García M, Page C, Herrera R y Nuñez G (1997) **Interleukin-3-Induced Phosphorylation of BAD Through the Protein Kinase Akt.** Science 24 October 1997:687-689.

Deng S, Vatamaniuk M, Huang X, Doliba N, Lian MM, Frank A, Velidedeoglu E, Desai NM, Koeberlein B, Wolf B, Barker CF, Naji A, Matschinsky FM, Markmann JF (2004). **Structural and functional abnormalities in the islets isolated from Type 2 diabetic subjects.** Diabetes. 53:624-632

---

Deveraux QL, Roy N, Stennicke HR, Van Arsdale T, Zhou Q, Srinivasula SM, Alnemri ES, Salvesen GS, Reed JC (1998). **IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases.** EMBO J. 17:2215-2223.

Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC (1997). **X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases.** Nature. 388:300-304.

Di Giulio C, Antosiewicz J, Walski M, Petruccelli G, Verratti V, Bianchi G, Pokorski M (2009). **Physiological carotid body denervation during aging.** Adv Exp Med Biol. 648:257-63.

Diabetes Atlas (2003). **2.a ed. Bruxelles:** International Diabetes Federation.

Dolphin D. (1988). **The generation of radicals during the normal and abnormal functioning of cytochromes P450. Oxygen radicals in biology and medicine.** M. G. Simic, K. A. Taylor, J. F. Ward and C. Sonntag. New York, Ed. Plenum Press. 491-500.

Donath MY y Halban PA (2004). **Type 1, type 1.5, and type 2 diabetes: NOD the diabetes we thought it was.** Diabetologia. 47, 581

Doroshov J y Hochstein P (1982). **Redox cycling and the mechanism of action of antibiotics in neoplastic diseases.** Pathology of Oxygen. New York, Academic Press. 245-253.

Eberhardt O, Coelln RV, Kugler S, Lindenau J, Rathke-Hartlieb S, Gerhardt E, Haid S, Isenmann S, Gravel C, Srinivasan A, Bahr M, Weller M, Dichgans J, Schulz JB (2000). **Protection by synergistic effects of adenovirus-mediated X-chromosome-linked inhibitor of apoptosis and glial cell line-derived neurotrophic factor gene transfer in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine model of Parkinson's disease.** J Neurosci. 20:9126-9134.

Egermann M, Heil P, Tami A, Ito K, Janicki P, Von Rechenberg B, Hofstetter W, Richards PJ (2010). **Influence of defective bone marrow osteogenesis on fracture repair in an experimental model of senile osteoporosis.** J Orthop Res. 2010;28:798-804.

Esser N, Paquot N, Scheen AJ (2011). **Type 2 diabetes and anti-inflammatory agents: new therapeutic prospects?.** Rev Med Suisse. Aug 31;7(306):1614-8, 1620.

Esterbauer H y Cheeseman KH (1987). **Lipid peroxidation: pathological implications.** Chem Phys Lipids. 45:103-370.

Evans MJ y Scarpulla RC (1988). **The human somatic cytochrome c gene: two classes of processed pseudogenes demarcate a period of rapid molecular evolution.** Proc Natl Acad Sci USA. 85(24):9625-9

---

Fadeel B, Orrenius S y Zhiotovskiy B (1999b). **Apoptosis in human disease: a new skin for the old ceremony?**. *Biochem Biophys Res Commun.* 266(3):699-717.

Fehrenbach E y Northoff H (2001). **Free radicals, exercise, apoptosis, and heat shock proteins.** *Exerc Immunol Rev.* 7:66-89)

Feldman EL (2003). **Oxidative stress and diabetic neuropathy: a new understanding of an old problem.** *Journal of Clinical Investigation.* 111(4):431-433

Fenton HJH (1894). **Oxidation of tartaric acid in the presence of iron.** *J. Chem. Soc. Trans.* 65:899-910.

Fenton M, Huang HL, Hong Y, Hawe E, Kurz DJ, Erusalimsky JD (2004). **Early atherogenesis in senescence-accelerated mice.** *Exp Gerontol.* 39:115-122.

Ferrari E, Magri F, Dori D, Migliorati G, Nescis T, Molla G, Fioravanti M, Solerte SB (1995). **Neuroendocrine correlates of the aging brain in humans.** *Neuroendocrinology.* 61:464-470.

Ferrari E, Magri F, Locatelli M, Balza G, Nescis T, Battezzato C, Cuzzoni G, Fioravanti M, Solerte SB (1996). **Chrono-neuroendocrine markers of the aging brain.** *Aging Clin. Exp. Res.* 8:320-327

Feskens EJM, Bowles CH, Cromboyt D (1991). **Carbohydrate intake and body mass index relation to the risk of glucosa intolerante in an elderly population.** *An J. Clin Nutr.* 54:136-140

Finck BN, Kelly DP (2007). **Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 (PGC-1) regulatory cascade in cardiac physiology and disease.** *Circulation* 115(19):2540-2548.

Forman K, Vara E, García C, Ariznavarreta C, Escames G, Tresguerres JA (2010a). **Cardiological aging in SAM model: effect of chronic treatment with growth hormone.** *Biogerontology.* Jun;11(3):275-86.

Forman K, Vara E, García C, Kireev R, Cuesta S, Acuña-Castroviejo D, Tresguerres JA (2010b). **Beneficial effects of melatonin on cardiological alterations in a murine model of accelerated aging.** *J Pineal Res.* Oct;49(3):312-20.

Foster RE y Estabrook RW (1993). **Is oxygen an essential nutrient?**. *Annu. Rev. Nutr* 13:383-403.

Franceschi C, Bonafe M, Valensin S, Olivieri F, De Luca M, Ottaviani E, De Benedictis G (2000). **Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence.** *Ann N Y Acad Sci* 2000. 908:208-218.

---

Franceschi Cy Bonafe M (2003). **Centenarians as a model for healthy aging.** *Biochem Soc Trans* 31:457-461

Franch Nadal J, Álvarez Torrices JC, Álvarez Guisasola F, Diego Domínguez F, Hernández Mejía R, Cueto Espinar A (1992) . **Epidemiología de la diabetes mellitus en la provincia de León.** *Med Clin (Barc)*. 98:607-11.

Freeman BA Y Crapo J (1982). **Biology of disease: Free radicals and tissue injure.** *Lab. Invest.* 47:412-426.

Frei B. (1994). **Reactive oxygen species an antioxidant vitamins: Mechanisms of action.** *Am. J. Med.* 97(3A):5S-13S.

Fresno M, Alvarez R, Cuesta N (2011). **Toll-like receptors, inflammation, metabolism and obesity.** *Arch Physiol Biochem.* 2011 Jul. 117(3):151-64.

Fridovich I (1978): **The biology of oxygen radicals.** *Science.* 201:875–880.

Galsgaard ED, Gouilleux F, Groner B, Serup P, Nielsen JH, Billestrup N (1996). **Identification of a growth hormone-responsive STAT5-binding element in the rat insulin 1 gene.** *Molecular Endocrinology.* June 1, vol. 10 no. 6 652-660

Gee J, Ding Q y Keller J (2005). **Modulation of apolipoprotein E and interleukin-1 $\beta$  in the aging liver.** *Experimental Gerontology.* 40(5),409-415.

Giulivi G, Davies KJ (1990). **A novel antioxidant role for hemoglobin. The comproportionation of ferrylhemoglobin with oxyhemoglobin.** *J Biol Chem.* 265(32):19453-60.

Goto M, Katayama KI, Shirakawa F y Tanaka I (1999). **Involvement of NF- $\kappa$ B p50/p65 heterodimer in activation of the human pro-interleukin-1beta gene at two subregions of the upstream enhancer element.** *Cytokine* 11:16–28

Grace MS, Cahill GM y Besharse JC (1991). **Melatonin in deacetylation: retinal vertebrate class distribution and *Xenopus laevis* tissue distribution.** *Brain Res.* 559:56-63.

Graidon SM y Tesier D (2000). **Diabetes in the elderly.** In: *Endocrinology of aging.* Humana Press Morley J.E. and Van den Berg L eds. Totowa, New Jersey.

Greer EL, Brunet A (2005). **FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression.** *Oncogene.* 24:7410–25.

- 
- Griffith OW y Stuehr DJ (1995). **Nitric oxide synthases: Properties and catalytic mechanism.** *Annu Rev Physiol.* 57:707-736.
- Grisham MB, Jourdeuil D, Wink DA (1999). **Nitric Oxide I. Physiological chemistry of nitric oxide and its metabolites: implications in inflammation.** *Am. J. Physiol.* 276: G315-G321.
- Gross A, Jockel J, Wei MC, Korsmeyer SJ (1998). **Enforced dimerization of BAX results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis.** *EMBO J* 15:17(14):3878-85
- Guerrero JM y Reiter RJ (2002). **Melatonin immune system relationships.** *Curr Top Med Chem.* 2:167-179
- Gustafsson AB y Gottlieb RA (2003). **Mechanisms of apoptosis in the heart.** *J Clin Immunol.* Nov;23(6):447-59. Review.
- Gutteridge JMC (1988). **Lipid peroxidation: some problems and concepts. En: Oxygen radicals and tissue injury.** Halliwell B. (Ed.). Bethesda Am Soc Exp Biol. 9-19
- Haber F y Weiss J (1934). **The catalytic compensation of hydrogen peroxide by iron salts.** *Proc. R. Soc. London.* 147:332-351.
- Hail N Jr, Carter BZ, Konopleva M, Andreeff M (2006). **Apoptosis effector mechanisms: a requiem performed in different keys.** *Apoptosis.* Jun;11(6):889-904.
- Hakim J (1993). **Reactive oxygen species and inflammation.** *C R Seances Soc Biol Fil.* 187(3):286-95.
- Halliwell B (1994). **Free radicals, antioxidants and human disease: Curiosity, cause or consequence?.** *Lancet* 344:721-724.
- Halliwell B y Gutteridge JMC (1989). **Free Radicals in Biology and Medicine.** Oxford, Clarendon Press, Reino Unido.
- Halliwell B y Gutteridge JMC (1990). **Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview.** *Methods Enzymol.* 186:1-85.
- Hampton MB, Kettle AJ, Winterbourn CC (1998). **Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing.** *Blood.* 92(9):3007-17
- Hampton MB, Orrenius S (1998). **Redox regulation of apoptotic cell death in the immune system.** *Toxicol Lett.* 102-103:355-8

- 
- Han D, Antunes F, Canali R, Rettori D, Cadenas E (2003). **Voltage-dependent anion channels control the release of the superoxide anion from mitochondria to cytosol.** *J Biol Chem.* 278(8):5557-63.
- Hardeland R (2008). **Melatonin, hormone of darkness and more-occurrence, control mechanisms, actions and bioactive metabolites.** *Cell Mol Life Sci.* Jul;65(13):2001-18.
- Harding HP y Ron D (2002). **Endoplasmic reticulum stress and the development of diabetes: a review.** *Diabetes.* 51 Suppl 3:S455-S461.
- Harman D (1981). **The aging process.** *Medical Sciences Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 78;11,7124-7128
- Harman D (1992). **Role of free radicals in aging and disease.** *Ann N Y Acad Sci.* Dec 26;673:126-41
- Harman D (2001). **Aging. Overview.** *A N Y Acad Sci* 2001. 928:1-21.
- Harman, D (1956). **Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry.** *Journal of Gerontology.* 11 (3):298-300.
- Hayden MS y Ghosh S (2004). **Signaling to NF-kappaB.** *Genes Dev.* Sep 15;18(18):2195-224.
- Hayflick L y Moorhead PS (1961). **The serial cultivation of human diploid cell strains.** *Exp Cell Res* 25:585-621
- Heimberg H, Heremans Y, Jobin C, Leemans R, Cardozo AK, Darville M, Eizirik DL (2001). **Inhibition of cytokine-induced NF-κB activation by adenovirus-mediated expression of a NF-κB super-repressor prevents β-cell apoptosis.** *Diabetes.* 50:2219-2224
- Helenius M HM, Lehtinen SK, Salminen A (1996). **Aging-induced Up-regulation of Nuclear Binding Activities of Oxidative Stress Responsive NF-κB Transcription Factor in Mouse Cardiac Muscle.** *J Mol Cell Cardiol.* 28:487-498.
- Helenius M, Kyrylenko S, Vehviläinen P, Salminen A (2001). **Characterization of aging-associated up-regulation of constitutive nuclear factor-kappa B binding activity.** *Antioxid Redox Signal.* Feb;3(1):147-56.
- Hilmer SN, Cogger VC, Le Couteur DG (2007). **Basal activity of Kupffer cells increases with old age.** *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* Sep;62(9):973-8.
- Holcik M, Gibson H, Korneluk RG (2001). **XIAP: apoptotic brake and promising therapeutic target.** *Apoptosis.* 6:253-261, 2001

---

Hon WM, Lee KH, Khoo HE (2002). **Nitric oxide in liver diseases: friend, foe, or just passerby?** *Ann N Y Acad Sci.* May;962:275-95. Review.

Hosokawa M (2002). **A higher oxidative status accelerates senescence and aggravates agedependent disorders in SAMP strains of mice.** *Mech Ageing Dev.* 123:1553-1561.

Hoyos M, Guerrero JM, Perez-Cano R, Olivan J, Fabiani F, Garcia-Pergañeda A, Osuna C (2000). **Serum cholesterol and lipid peroxidation are decreased by melatonin in diet-induced hypercholesterolemic rats.** *J. Pineal Res.* 28:150-155.

Hussein MR, Ahmed OG, Hassan AF, Ahmed MA (2007). **Intake of melatonin is associated with amelioration of physiological changes, both metabolic and morphological pathologies associated with obesity: an animal model.** *Int J Exp Pathol.* 2007. 88:19-29

Iozzo P, Beck-Nielsen H, Laakso M, Smith U, Yki-Järvinen H, Ferrannini E (1999). **Independent influence of age on basal insulin secretion in nondiabetic humans. European group for the study of insulin resistance.** *J Clin Endocrinol Metab.* 84:863-868.

Ito Y, Betsuyaku T, Moriyama C, Nasuhara Y, Nishimura M (2008). **Aging affects lipopolysaccharide-induced upregulation of heme oxygenase-1 in the lungs and alveolar macrophages.** *Biogerontology.* 2009 Apr;10(2):173-80. Epub Aug 9.

Itoh MT, Ishizuka B, Kudo Y, Fusama S, Amemiya A, Sumi Y (1997). **Detection of melatonin and serotonin N-acetyltransferase and hydroxyindole-O-methyltransferase activities in rat ovary.** *Mol Cell Endocrinol.* Dec 31;136(1):7-13.

Jeschke MG, Herndon DN, Wolf SE, DebRoy MA, Rai J, Thompson JC, Barrow RE (2000). **Hepatocyte growth factor modulates the hepatic acute-phase response in thermally injured rats.** *Crit Care Med.* Feb;28(2):504-10.

Jurgensmeier JM, Xie Z, Deveraux Q, Ellerby L, Bredesen D, Reed JC (1998). **Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 28;95(9):4997-5002

Kaltschmidt B, Kaltschmidt C, Hofmann TG, Hehner SP, Dröge W, Schmitz ML (2000). **The pro- or anti-apoptotic function of NF-kappaB is determined by the nature of the apoptotic stimulus.** *Eur J Biochem.* Jun;267(12):3828-35.

Kanner J, German JB, Kinsella JE (1987). **Initiation of lipid peroxidation in biological systems.** *Crit Rev Food Sci Nutr.* 1987;25(4):317-64.

- 
- Kasapoglu M y Ozben T (2001). **Alterations of antioxidant enzymes and oxidative stress markers in aging.** *Exp Gerontol.* 36:209–220.
- Kenyon C (2005). **The plasticity of aging: insights from long-lived mutants.** *Cell.* 120:449–460.
- Khalifaoui T, Beltaief O, Meddeb Amel O (2007). **Expression of Bax and Bcl-2 apoptotic factors in the conjunctiva of diabetic patients: a preliminary study.** *J Fr Ophtalmol.* 30:799–806
- Kireev RA, Tresguerres AC, Castillo C, Salazar V, Ariznavarreta C, Vara E, Tresguerres JA (2007a). **Effect of exogenous administration of melatonin and growth hormone on pro-antioxidant functions of the liver in aging male rats.** *J Pineal Res.* Jan;42(1):64-70.
- Kireev RA, Tresguerres AC, Garcia C, Ariznavarreta C, Vara E, Tresguerres JA (2008). **Melatonin is able to prevent the liver of old castrated female rats from oxidative and pro-inflammatory damage.** *J Pineal Res.* Nov;45(4):394-402.
- Kireev RA, Tresguerres AC, Garcia C, Borrás C, Ariznavarreta C, Vara E, Vina J, Tresguerres JA (2010). **Hormonal regulation of pro-inflammatory and lipid peroxidation processes in liver of old ovariectomized female rats.** *Biogerontology.* Apr;11(2):229-43.
- Kireev RA, Tresguerres AF, Vara E, Ariznavarreta C, Tresguerres JA (2007b). **Effect of chronic treatments with GH, melatonin, estrogens, and phytoestrogens on oxidative stress parameters in liver from aged female rats.** *Biogerontology.* Oct;8(5):469-82. Epub 2007 May 3.
- Kirkwood TB (1977). **Evolution of ageing.** *Nature.* 170(5635)201-4
- Kuida K, Haydar TF, Kuan CY, Gu Y, Taya C, Karasuyama H, Su MS, Rakic P, Flavell RA (1998). **Reduced apoptosis and cytochrome c mediated caspase activation in mice lacking caspase 9.** *Cell.* 7;94(3):325-37
- Kumar D, Jugdutt BI (2003). **Apoptosis and oxidants in the heart.** *J Lab Clin Med.* Nov;142(5):288-97. Review.
- Kurokawa T, Osaki N, Ishibashi S (1998). **Difference between senescence-accelerated prone and resistant mice in response to insulin in the heart.** *Mech Ageing Dev.* 102:25–32.
- Lagouge M, Argmann C, Gerhart-Hines Z, Meziane H, Lerin C, Daussin F, Messadeq N, Milne J, Lambert P, Elliott P, Geny B, Laakso M, Puigserver P, Auwerx J (2006). **Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating Sirt1 and PGC-1alpha.** *Cell.* 127(6):1109-11022.

- 
- Lamkanfi M, Declercq W, Kalai M, Saelens X, Vandenabeele P (2002). **Alice in caspase land. A phylogenetic analysis of caspases from worm to man.** *Cell Death Differ.* 9:358-61
- Le Roith D, Bondy C, Yakar S, Liu JL, Butler A (2001). **The somatomedin hypothesis.** *Endocr Rev.* 22:53-74
- Lebermann T y Baltimore D (1990). **Activation of the interleukin-6 gene expression through the NF- $\kappa$ B transcription factor.** *Molecular and Cellular Biology.* 10:2327-2334.
- Lenardo MJ, Baltimore D (1989). **NF-kappa B: a pleiotropic mediator of inducible and tissue-specific gene control.** *Cell.* Jul 28;58(2):227-9. Review. No abstract available.
- León J, Acuña-Castroviejo D, Escames G, Tan DX, Reiter RJ (2005). **Melatonin mitigates mitochondrial malfunction.** *J Pineal Res.* Jan;38(1):1-9. Review.
- Lerner AB, Case JD, Takahashi Y Lee TH y Mori W (1958). **Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes.** *J. Am Chem Soc.* 80:2587-2587.
- Libby P (2003). **Vascular biology of atherosclerosis: overview and state of the art.** *Am J Cardiol* 91:3A-6A.
- Lin L, Hron JD, Peng SL (2004). **Regulation of NF-kappaB, Th activation, and autoinflammation by the forkhead transcription factor Foxo3a.** *Immunity.* 21:203-13.
- Lingohr MK, Buettner R, Rhodes CJ (2002). **Pancreatic beta-cell growth and survival--a role in obesity-linked type 2 diabetes?** *Trends Mol. Med.* 8, 375.
- Liu LP, Hong H, Liao JM, Wang TS, Wu J, Chen SS, Li YQ, Long Y, Xia YZ (2009). **Upregulation of RAGE at the blood-brain barrier in streptozotocin-induced diabetic mice.** *Synapse.* Aug;63(8):636-42.
- Livak KJ y Schmittgen TD (2001). **Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method.** *Methods.* 25: 402-408.
- Lu Y, Herrera PL, Guo Y, Sun D, TangZ, LeRoith D, Liu JL (2004). **Pancreatic-specific inactivation of IGF-I gene causes enlarged pancreatic islets and significant resistance to diabetes.** *Diabetes.* 53 (12)3131-3141.
- Lynch HJ, Eng JP, Wurtman RJ (1973). **Control of pineal indole biosynthesis by changes in sympathetic tone caused by factors other than environmental lighting.** *Proc Natl Acad Sci USA.* 70:1704-1707.

---

Macías M, Rodríguez-Cabezas MN, Reiter RJ, Osuna A y Acuña-Castroviejo D (1999). **Presence and effects of melatonin in Trypanosoma cruzi.** J. Pineal Res. 27:86-94.

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

Mann DA y Oakley F (2005). **NF- $\kappa$ B: a signal for cancer.** J. Hepatol. 42:610- 611

Martin JE, McKeel DW, Jr y Sattler C (1982). **Melatonin directly inhibits rat gonadotroph cells.** Endocrinology. 110:1079-1084.

Mason RP (1982). **Free radical intermediates in the metabolism of toxicological significance.** Free radicals biology. W. A. Pryor. New York, Academic Press. 262-165.

Mayo JC, Sáinz RM, Antolín I, Herrera F, Martín V y Rodríguez C (2002). **Melatonin regulation of antioxidant enzyme gene expresión.** Cell Mol Life Sci. 59:1706-1713.

Mazzon E, Esposito E, Crisafulli C, Riccardi L, Muià C, Di Bella P, Meli R, Cuzzocrea S (2006). **Melatonin modulates signal transduction pathways and apoptosis in experimental colitis.** J Pineal Res. Nov;41(4):363-73.

Mc Cann SM, Licinio J, Wong ML, Yu WH, Karanth S, Rettorri V (1998). **The nitric oxide hypothesis of aging.** Exp Gerontol. 33:813-826.

Mellado C, Rodriguez V, de Diego JG, Alvarez E, Blazquez E (1989). **Effect of pinealectomy and of diabetes on liver insulin and glucagon receptor concentrations in the rat.** J Pineal Res. 6:295-306.

Menéndez-Peláez A, Howes KA, González-Brito A y Reiter RJ (1987). **N-acetyltransferase activity, hydroxindole-O-methyltransferase activity, and melatonin levels in the Hardelian glands of the female Syrian hamster: changes Turing the Light:dark cycle and the effect of 6-parachlorophenylalanine administration.** Biochem Biophys res Commi;un. 145:1231-1238

Merchav S, Silvian-Drachsler I, Tatarsky I, Lake M, Skottner A (1992). **Comparative studies of the erythroid-potentiating effects of biosynthetic human insuline-like factors I and II.** J Clin Endocrinol and Metab. 74:447-452.

Mhatre MC, van Jaarsveld AS y Reiter RJ (1988). **Melatonin in the lacrimal gland: first demonstration and experimental manipulation.** Biochem Biophys Res Commun. 153:1186-1192.

---

Miquel J, Economos AC, Fleming J, Johnson JE Jr (1980). **Mitochondrial role in cell aging.** *Exp Gerontol.* 15:575-591.

Mira JP, Cariou A, Grall F, Delclaux C, Losser MR, Heshmati F, Cheval C, Monchi M, Teboul JL, Riché F, Leleu G, Arbibe L, Mignon A, Delpech M, Dhainaut JF (1999). **Association of TNF2, TNFalpha promoter polymorphism, with septic shock susceptibility and mortality: a multicenter study.** *JAMA.* 282:561-8.

Mirkes PE (2002). **Warkany lecture: to die or not to die, the role of apoptosis in normal and abnormal mammalian development.** *Teratology.* 65:228-39

Miwa K, Nakamura J, Hamada Y, Naruse K, Nakashima E, Kato K, Kasuya Y, Yasuda Y, Kamiya H, Hotta N (2003). **The role of polyol pathway in glucose-induced apoptosis of cultured retinal pericytes.** *Diabetes Research and Clinical Practice.* 60(1):1-9.

Moller N, Butler PC, Antsiferov MA, Alberti KGMM (1989). **Effects of growth hormone on insulin sensitivity and forearm metabolism in normal man.** *Diabetologia.* 32:105-110

Møller N, Gormsen L, Fuglsang J, Gjedsted J (2003). **Effects of ageing on insulin secretion and action.** *Horm Res.* 60:102-104.

Montilla PL, Vargas JF, Túnez IF, Muñoz de Agueda MC, Valdelvira ME, Cabrera ES (1998). **Oxidative stress in diabetic rats induced by streptozotocin: protective effects of melatonin.** *J. Pineal Res.* 25:94-100.

Mor M, Plazzi PV, Spadoni G y Tarzia G (1999). **Melatonin.** *Curr Med Chem.* 6:501-518.

Mori A, Utsumi K, Liu J, Hosokawa M (1998). **Oxidative damage in the senescence accelerated mouse.** *Ann N Y Acad Sci.* 854:239-250.

Mori M, Higuchi K (2004). **Genetic monitoring system for SAM strains utilizing DNA markers.** *Int Congr Ser.* 1260:187-190.

Mori N, Aoyama H, Murase T, Mori W (1989). **Anti-hypercholesterolemic effect of melatonin in rats.** *Acta Pathol. Jpn.* 39: 613-618.

Moutoussamy S, Kelly PA, Finidori J (1998). **Growth-hormone-receptor and cytokine-receptor-family signalling.** *Eur J, Biochem.* 255:1-11

Mühlbauer E, Wolgast S, Finckh U, Peschke D, Peschke E (2004). **Indication of circadian oscillations in the rat pancreas.** *FEBS Lett.* 564:91-96.

---

Nass R, Johannsson G, Christiansen JS, Kopchick JJ, Thorner MO (2009). **The aging population - Is there a role for endocrine interventions?** Growth Hormone & IGF Research. Volume 19, Issue 2, April Pages 89-100.

Nassis GP y Geladas ND (2003). **Age-related pattern in body composition changes for 18-69 year old women.** J Sports Med Phys Fitness. 2003 Sep;43(3):327-33.

Niimi K, Takahashi E, Itakura C (2008). **Improved short-term memory and increased expression of NR2B observed in senescence-accelerated mouse (SAM) P6.** Exp Gerontol. 43:847-852.

Nishida S, Segawa T, Murai I, Nakagawa S (2002). **Long-term melatonin administration reduces hyperinsulinemia and improves the altered fatty-acid compositions in type 2 diabetic rats via the restoration of Delta-5 desaturase activity.** J. Pineal Res. 2002. 32:26-33.

Nohl H y Hegner D (1978). **Evidence for the existence of catalase in the matrix space of rat-heart mitochondria.** FEBS Lett. 1;89(1):126-30.

Nomura T, Mimata H, Takeuchi Y, Yamamoto H, Miyamoto E, Nomura Y (2003). **The X-linked inhibitor of apoptosis protein inhibits taxol-induced apoptosis in LNCaP cells.** Urol Res. 31:37-44.

Nussler AK, Vergani G, Gollin SM, Dorko K, Morris SM Jr, Demetris AJ, Nomoto M, Beger HG, Strom SC (1999). **Isolation and characterization of a human hepatic epithelial-like cell line (AKN-1) from a normal liver.** In Vitro Cell Dev Biol Anim. Apr;35(4):190-7.

Patriarca S, Furfaro AL, Cosso L, Pesce Maineri E, Balbis E, Domenicotti C, Nitti M, Cottalasso D, Marinari UM, Pronzato MA, Traverso N (2007). **Heme oxygenase 1 expression in rat liver during ageing and ethanol intoxication.** Biogerontology. Jun;8(3):365-72. Epub Jan 13.

Peeters AC, Netea MG, Janssen MC, Kullberg BJ, Van der Meer JW, Thien T (2001). **Pro-inflammatory cytokines in patients with essential hypertension.** Eur J Clin Invest. 31:31-36.

Pereira SG (2008). **Nuclear factor-kappaB1: regulation and function.** Int J Biochem Cell Biol. 40:1425-1430.

Picard F, Kurtev M, Chung N, Topark-Ngarm A, Senawong T, Machado De Oliveira R, Leid M, McBurney MW, Guarente L (2004). **Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR-gamma.** Nature. 429(6993):771-776.

Pierrefiche G y Laborit H (1995). **Oxygen free radicals, melatonin, and aging.** Exp Gerontol. 30:213-227.

---

Pietraforte D y Minetti M (1997). **Direct ESR detection of peroxynitrite-induced tyrosine-centred protein radicals in human blood plasma.** *Biochem J.* Aug 1; 325:675-684.

Pinkoski MJ, Waterhouse NJ, Heibein JA, Wolf BB, Kuwana T, Goldstein JC, Newmeyer DD, Bleackley RC, Green DR (2001). **Granzyme B-mediated apoptosis proceeds predominantly through a Bcl-2-inhibitable mitochondrial pathway.** *J Biol Chem.* 276:12060-7

Poeggeler B y Hardeland R (1994). **Detection and quantification of melatonina in a dinoflagellate, Gonyaulax polyedra: solutions to the problem of methoxyindole destruction in non vertebrate material.** *J. Pineal Res.* 17:1-10

Popper H (1986). **Aging and the liver.** *Prog Liver Dis.* 8:659-683.

Postel-Vinay MC, Finidori J (1995). **Growth hormone receptor: structure and signal transduction.** *Eur J Endocrinol.* 133:654-659

Pozo D, Reiter RJ, Calvo JR y Guerrero JM (1994). **Physiological concentrations of melatonin inhibit nitric oxide synthase in rat cerebellum.** *Life Sci.* 55:PL455-460.

Pozo D, Reiter RJ, Calvo JR y Guerrero JM (1997). **Inhibition of cerebellar nitric oxide synthase and cyclic GMP production by melatonina via complex formation with calmodulin.** *J Cell Biochem.* 65:430-442.

Press M (1988). **Growth hormone and metabolism.** *Diabetes Metab Rev.* 4:391-414

Prunet-Marcassus B, Desbazeille M, Bros A, Louche K, Delagrangé P, Renard P, Casteilla L, Pénicaud L (2003). **Melatonin reduces body weight gain in Sprague Dawley rats with diet-induced obesity.** *Endocrinology.* 144:5347-5352

Putchá GV, Le S, Frank S, Besirli CG, Clark K, Chu B, Alix S, Youle RJ, LaMarche A, Maroney AC, Johnson EM Jr (2003). **JNK mediated BIM phosphorylation potentiates BAX-dependent apoptosis.** *Neuron.* 38:899-914

Qi W, Reiter RJ, Tan DX, Manchester LC, Kim SJ, Garcia JJ (1999). **Inhibitory effects of melatonin on ferric nitrilotriacetate-induced lipid peroxidation and oxidative DNA damage in the rat kidney.** *Toxicology.* Nov 29;139(1-2):81-91.

Rao N, Nguyen S, Ngo K, Fung-Leung WP (2005). **A novel splice variant of interleukin-1 receptor (IL-1R)-associated kinase 1 plays a negative regulatory role in Toll/IL-1R-induced inflammatory signaling.** *Mol Cell Biol.* 25(15):6521-32.

---

Rebrin I y Sohal RS (2004). **Comparison of thiol redox state of mitochondria and homogenates of various tissues between two strains of mice with different longevities.** *Exp Gerontol.* 39:1513-1519

Rehman KK, Bertera S, Bottino R, Balamurugan AN, Mai JC, Mi Z, Trucco M, Robbins PD (2003). **Protection of islets by in situ peptide-mediated transduction of the I $\kappa$ B kinase inhibitor nemo-binding domain peptide.** *J Biol Chem.* 278:9862-9868

Reiter RJ (1991a). **Pineal melatonin: cell biology of its síntesis ando f its physiological interations.** *Endocr Rev.* 12:151-180.

Reiter RJ (1991b). **Melatonin: That ubiquitously acting pineal hormone.** *NIPS.* 223-227.

Reiter RJ (1995). **The role of the neurohormone melatonin as a buffer against macromolecular oxidative damage.** *Neurochem Int.* Dec;27(6):453-60. Review.

Reiter RJ (1995b). **The role of the neurohormone melatonin as a buffer against macromolecular oxidative damage.** *Neurochem Int.* 27:453-460.

Reiter RJ (1997). **Antioxidant actions of melatonin.** *Adv Pharmacol.* 1997;38:103-17.

Reiter RJ (1998). **Melatonin, active oxygen species and neurological damage.** *Drug News Perspect.* Jun;11(5):291-6.

Reiter RJ (2000). **Melatonin: Lowering the High Price of Free Radicals.** *News Physiol Sci.* Oct;15:246-250.

Reiter RJ, Craft CM, Johnson JE Jr, King TS, Richardson BA, Vaughan GM, Vaughan MK (1981). **Age-associated reduction in nocturnal pineal melatonin levels in female rats.** *Endocrinology.* Oct;109(4):1295-7.

Reiter RJ, Richardson BA, Johnson LY, Ferguson BN, Dinh DT (1980). **Pineal melatonin rhythm: reduction in aging Syrian hamsters.** *Science.* Dec 19;210(4476):1372-3.

Reiter RJ, Tan DX, Manchester LC, López-Burillo S, Sáinz RM y Mayo JC (2003b). **Melatonin. Detoxification of oxygen and nitrógeno-based toxic reactants.** *Adv Exp Med Biol.* 527:539-548.

Reiter RJ, Tan DX, Manchester LC, Qi W (2001). **Biochemical reactivity of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species: a review of the evidence.** *Cell Biochem Biophys.* 34(2):237-56. Review.

Reiter RJ, Tan DX, Mayo JC, Sáinz RM, León J y Czarnocki Z (2003a). **Melatonin as an antioxidante: biochemical mechanisms and**

---

**pathophysiological implications in humans.** Acta Biochim Pol. 50:1129-1146.

Reppert SM, Weaver DR y Godson C (1996). **Melatonin receptors step into the light: cloning and classification of subtypes.** Trends in Pharmacol Sci. 17:100-102.

Robertson RP, Harmon J, Tran PO, Poitout V (2004). **Beta-cell glucose toxicity, lipotoxicity, and chronic oxidative stress in Type 2 diabetes.** Diabetes. 53, Suppl 1:S119-S124.

Rodgers JT, Lerin C, Haas W, Gygi SP, Spiegelman BM, Puigserver P (2005). **Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1alpha and Sirt1.** Nature 434(7029):113- 118.

Rodríguez MI, Carretero M, Escames G, López LC, Maldonado MD, Tan DX, Reiter RJ, Acuña-Castroviejo D (2007b). **Chronic melatonin treatment prevents age-dependent cardiac mitochondrial dysfunction in senescence-accelerated mice.** Free Radic Res 41:15-24.

Rodríguez MI, Carretero M, Escames G, López LC, Maldonado MD, Tan DX, Reiter RJ, Acuña-Castroviejo D (2007). **Chronic melatonin treatment prevents age-dependent cardiac mitochondrial dysfunction in senescence-accelerated mice.** Free Radic Res. 41:15-24.

Rodríguez MI, Escames G, Lopez LC (2008). **Improved mitochondrial function and increased life span after chronic melatonin treatment in senescent prone mice.** Exp Gerontol. 43:749-756.

Rodríguez MI, Escames G, López LC, García JA, Ortiz F, López A, Acuña-Castroviejo D (2007). **Melatonin administration prevents cardiac and diaphragmatic mitochondrial oxidative damage in senescence-accelerated mice.** J Endocrinol. 194(3):637-643

Rodríguez MI, Escames G, López LC, López A, García JA, Ortiz F, Acuña-Castroviejo D (2007b). **Chronic melatonin treatment reduces the age-dependent inflammatory process in senescence-accelerated mice.** J Pineal Res. 42:272-279

Sacher George A (1978). **Longevity and Aging in Vertebrate Evolution.** American Institute of Biological Sciences. 28:497-501.

Sack RL, Lewy AJ, Erb DL, Vollmer WM, Singer CM (1986). **Human melatonin production decreases with age.** J Pineal Res. 3(4):379-88.

Salmeron J, Asherio A, Rimm EB, Colditz GA, Spiegelman D, Jenkins DJ (1997). **Dietary fiber, glucemic load and risk of NIDDM in men.** Diabetes Care. 20:545-550

- 
- Sano M, Schneider MD (2005). **Energizer: PGC-1 alpha keeps the heart going.** *Cell Metab.* 1(4):216-218.
- Sastre J, Pallardó FV y Viña J (1996). **Glutathione, oxidative stress and aging.** *Age.* 19:129-139.
- Sastre J, Pallardó FV, Viña J (2000). **Mitochondrial oxidative stress plays a key role in aging and apoptosis.** *IUBMB Life.* 49(5):427-35.
- Sawyer DT (1988). **The redox thermodynamics for dioxygen species (O<sub>2</sub>, O<sub>2</sub><sup>-</sup>; HOO·; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and HOO<sup>-</sup>) and monooxygen species (O, O<sup>-</sup>; ·OH, and OH<sup>-</sup>) in water and aprotic solvents.** *Oxygen radicals in biology and medicine.* M. G. Simic, K. A. Taylor, J. F. Ward and C. Sonntag, New York, Ed. Plenum Press. 11-20.
- Schmucker D (1998). **Aging and the liver: an update.** *Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences.* 53(5),B315-B320.
- Seiva FR, Ebaid GM, Castro AV, Okoshi K, Nascimento A, Rocha KK, Padovani CR, Cicogna AC, Novelli EL (2008). **Growth hormone and heart failure: oxidative stress and energetic metabolism in rats.** *Growth Horm IGF Res.* 2008 Aug;18(4):275-83. Epub Jan 10.
- Shimokata H, Muller CD, Reubin Andres MD (1989). **Studies in the Distribution of Body Fat.** *JAMA.* 261(8):1169-1173.
- Sies H (1986). **Biochemistry of oxidative stress.** *Angewandte Chem.* 25:1058-1071.
- Sies H (1993). **Strategies of antioxidant defense.** *Eur J Biochem.* 215(2):213-9.
- Sies H, Mehlhorn R (1986). **Mutagenicity of nitroxide-free radicals.** *Arch Biochem Biophys.* Nov 15;251(1):393-6
- Simons M, Beinroth S, Gleichmann M, Liston P, Korneluk RG, MacKenzie AE, Bahr M, Klockgether T, Robertson GS, Weller M, Schulz JB (1999) **Adenovirus-mediated gene transfer of inhibitors of apoptosis protein delays apoptosis in cerebellar granule neurons.** *J Neurochem.* 72:292-301.
- Slee EA, Adrain C, Martin SJ (1999). **Serial killers: ordering caspase activation events in apoptosis.** *Cell Death Differ.* 6(11):1067-74
- Sohal RS y Brunk UT (1989). **Lipofuscin as an indicator of oxidative stress and aging.** *Adv. Exp. Med. Biol.* 266:17-26.
- Sohal RS, Ku HH, Agarwal S (1993). **Biochemical correlates of longevity in two closely related rodent species.** *Biochem Biophys Res Commun.*

---

Sohal RS, Mockett RJ, Orr WC (2002). **Mechanisms of aging: an appraisal of the oxidative stress hypothesis.** *Free Radic Biol Med.* Sep 1;33(5):575-86.

Sohal RS, Sohal BH (1991). **Hydrogen peroxide release by mitochondria increases during aging.** *Mech Ageing Dev.* 57:187-202.

Sohal RS, Sohal BH, Brunk UT (1990). **Relationship between antioxidant defenses and longevity in different mammalian species.** *Mech Ag Dev* 53:217-27

Song Y, Chan CW, Brown GM, Pang SF y Silverman M (1997). **Studies of the renal action of melatonin: evidence that the effects are mediated by 37 kDa receptors of the Mel1a subtype localized primarily to the basolateral membrane of the proximal tubule.** *FASEB J.* 11:93-100.

Stancovski I. y Baltimore D (1997). **NF-kappaB activation: the I kappaB kinase revealed?** *Cell* 91:290-302

Starkov AA (2008). **The role of mitochondria in reactive oxygen species metabolism and signaling.** *Ann N Y Acad Sci.* 1147:37-52

Sugino K, Dohi K, Yamada K, Kawasaki T (1987). **The role of lipid peroxidation in endotoxin induced damage and the protective effects of antioxidants.** *Surgery.* 101:746-52

Sun C, Zhang F, Ge X, Yan T, Chen X, Shi X, Zhai Q (2007). **Sirt1 improves insulin sensitivity under insulin-resistant conditions by repressing PTP1B.** *Cell Metab.* 6(4):307-319.

Sun SC GP, Ballard DW, Greene WC (1993). **NF-kappa B controls expression of inhibitor I kappa B alpha: evidence for an inducible autoregulatory pathway.** *Science.* 259:1912-1915.

Takeda T (1999). **Senescence-accelerated mouse (SAM): a biogerontological resource in aging research.** *Neurobiol Aging.* 1999;20:105-110.

Takeda T (2009). **Senescence-accelerated mouse (SAM) with special references to neurodegeneration models, SAMP8 and SAMP10 mice.** *Neurochem Res.* 34:639-659.

Takeda T (2009). **Senescence-accelerated mouse (SAM) with special references to neurodegeneration models, SAMP8 and SAMP10 mice.** *Neurochem Res.* 34:639-659.

Takeda T, Hosokawa M, Takeshita S (1981). **A new murine model of accelerated senescence.** *Mech Ageing Dev.* 17:183-194.

---

Tan D, Reiter RJ, Chen LD, Poeggeler B, Manchester LC, Barlow-Walden LR (1994). **Both physiological and pharmacological levels of melatonin reduce DNA adduct formation induced by the carcinogen safrole.** *Carcinogenesis*. Feb;15(2):215-8.

Tan DX, Chen LD, Poeggeler B, Manchester LC y Reiter RJ (1993b). **Melatonin: a potent, endogenous hydroxyl radical scavenger.** *Endocrine J*. 1:57-60.

Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, Qi WB, Karbownik M, Calvo JR (2000). **Significance of melatonin in antioxidative defense system: reactions and products.** *Biol Signals Recept*. May-Aug;9(3-4):137-59. Review.

Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, Qi WB, Zhang M, Weintraub ST, Cabrera J, Sainz RM, Mayo JC (1999). **Identification of highly elevated levels of melatonin in bone marrow: its origin and significance.** *Biochim Biophys Acta*. 1472:206-214

Taylor B, de Vera ME, Ganster RW, Wang Q, Shapiro RA, Morris SM Jr., Billiar TR y Geller DA (1998). **Multiple NF- $\kappa$ B enhancer elements regulate cytokine induction of the human inducible nitric oxide synthase gene.** *The Journal of Biological Chemistry*. 273:15148-15156

Tha KK, Okuma Y, Miyazaki H, Murayama T, Uehara T, Hatakeyama R, Hayashi Y, Nomura Y (2000). **Changes in expressions of proinflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and IL-6 in the brain of senescence accelerated mouse (SAM) P8.** *Brain Res*. Dec 1;885(1):25-31.

The DECODE Study Group (2003). **Is the current definition for diabetes relevant to mortality risk from all causes and cardiovascular and noncardiovascular diseases?** *Diabetes Care*. 26:688-96.

Tietze F (1969). **Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione.** *Anal. Biochem*. 17:502-522.

Tiidus PM, Pushkarenko J, Houston ME (1996). **Lack of antioxidant adaptation to short-term aerobic training in human muscle.** *Am J Physiol*. 271:R832-6

Tollet-Egnell P, Flores-Morales A, Stahlberg N, Malek RL, Lee N, Norstedt G (2001). **Gene expression profile of the aging process in rat liver: normalizing effects of growth hormone replacement.** *Mol Endocrinol*. 15:308-318.

Toogood AA y Shalet SM (1998). **Ageing and growth hormone status: Baillieres Clin.Endocrinol. Metab.** v. 12, p.281-296.

---

Toogood AA, O'Neill PA, Shalet SM (1996). **Beyond the somatopause: GH deficiency in adults over the age of 60 years.** J Clin Endocrinol Metab. 81:460-465.

Touitou Y y Haus E (2000). **Alterations with aging of the endocrine and neuroendocrine circadian system in humans.** Chronobiol. Int. 17:369-390

Tresguerres 2010. **Fisiología humana.** 4ª edición. Mc-Graw Hill

Tresguerres JAF, Kireev RA, Tresguerres ACF Borrás C, Vara E, Ariznavarreta C (2008). **Molecular mechanisms involved in the hormonal prevention of aging in rat.** J Steroid Biochem Mol Biol. 108:318-326.

Treskes M, Adriaansen HJ, van der Leur SJ, Idema RN, Péquériauux N, Pronk C (1996). **Multicentre evaluation of the EBIO plus glucose analyser.** Eur J Clin Chem Clin Biochem. 34:777-784.

Troen BR (2003). **The Biology of aging.** The Mount Sinai Journal of Medicine. 70:3-22.

Turrens JF (2003). **Mitochondrial formation of reactive oxygen species.** J Physiol. 2003;552 Pt 2:335-44.

Urata Y, Honma S, Goto S, Todoroki S, Lida T, Cho S, Honma K y Kondo T (1999). **Melatonin induces gamma-glutamylcysteine synthetase mediated by activator protein-1 in human vascular endothelial cells.** Free Radic Biol Med. 27:838-847.

Vaag A, Henriksen JE, Madsbad S, Holm N, Beck-Nielsen H (1995). **Insulin secretion, insulin action and hepatic glucose production in identical twins for noninsulin-dependent diabetes mellitus.** J. Clin Invest. 95:690-698.

Vakkuri O, Rintamaki H y Leppaluoto J (1985b). **Plasma and tissue concentrations of melatonin after midnight light exposure and pinealectomy in the pigeon.** J. Endocrinol. 105:263-268

Valdés, S; Rojo- Martínez G; Soriguer, F (2007). **Evolución de la Prevalencia de la diabetes tipo 2 en población adulta española.** Medicina Clínica (Barc). 129 (9):352-355.

Valen G, Paulsson G y Vaage J (2001). **Induction of inflammatory mediators during reperfusion of the human heart.** Ann Thorac Surg. Jan;71(1):226-32.

Valen G, Yan ZQ y Hansson GK (2001). **Nuclear factor kappa-B and the heart.** J Am Coll Cardiol. Aug;38(2):307-14. Review.

---

Vara E, García C, Hernández J, Balibrea JL (1996). **The TNF $\alpha$ -induced inhibition of PC synthesis by human type II pneumocytes is sequentially mediated by PGE2 and NO.** Am. J. Physiol. (Lung Cell Mol Physiol). 271(15):L359-L365.

Vieira E, Salehi A y Gylfe E (2007). **Glucose inhibits glucagon secretion by a direct effect on mouse pancreatic alpha cells.** Diabetologia. 50:370-379

Viña J (1990). **Glutathione: Metabolism and Physiological Functions.** CRC Pres, Boston. ISBN. 0-8493- 3274-5

Waldhauser F, Ehrhart B y Foster E (1993). **Clinical aspects of the melatonin action: impact of development, aging, and puberty, involvement of melatonin in psychiatric disease and importance of neuroimmunoendocrine interactions.** Experientia. 49:671-681.

Warner HR (2005). **Longevity genes: from primitive organisms to humans.** Mech.Ageing Dev. 126:235-242.

Weinberg EJ, Schoen FJ, Mofrad MR (2009). **A computational model of aging and calcification in the aortic heart valve.** PLoS One. 2009; 4:e5960.

Wickens AP (1998). **Genetic theories of aging.** En: **The causes of aging.** Norwood Academic Publisherspp. 79-104(d).

Wickens AP (1998d). **The cellular basis of aging.** En: **The causes of aging.** Norwood Academic Publisherspp. 105-128 (f)

Wickens AP (1998f). **The characteristics of aging.** En: **The causes of aging.** Norwood Academic Publishers pp. 1-29 (a).

Wickens AP (2001). **Ageing and the free radical theory.** Respir Physiol. 128:379-391.

Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H (2004). **Global prevalence of diabetes. Estimates for the year 2000 and projections for 2030.** Diabetes Care. 27:1047-53.

Woo M, Hakem R, Furlonger C, Hakem A, Duncan GS, Sasaki T, Bouchard D, Lu L, Wu GE, Paige CJ y Mak TW (2003). **Caspase-3 regulates cell cycle in B cells: a consequence of substrate specificity.** Nat. Immunol. 4:1016-1022.

Yakar S, Liu JL, Fernandez AM, Wu Y, Schally AV, Frystyk J, Chernausek SD, Mejia W, Le Roith D (2001). **Liver-specific igf-1 gene deletion leads to muscle insulin insensitivity.** Diabetes. 50 (5)1110-1118.

- 
- Yamamoto Y y Gaynor RB (2001). **Therapeutic potential of inhibition of the NF- $\kappa$ B pathway in the treatment of inflammation and cancer.** J Clin Invest. 107:135-142
- Yao J, Mackman N, Edgington TS y Fan ST (1997). **Lipopolysaccharide induction of the tumor necrosis factor-alpha promoter in human monocytic cells. Regulation by Egr-1, c-Jun, and NF- $\kappa$ B transcription factor.** The Journal of Biological Chemistry. 272:795-801.
- Yeung F, Hoberg JE, Ramsey CS, Keller MD, Jones DR, Frye RA, Mayo MW (2004). **Modulation of NF-kappaB dependent transcription and cell survival by the Sirt1 deacetylase.** EMBO J. 23(12):2369-2380.
- Yew DT, Sha O, Li WWY, Lam TT, Lorke DE (2001). **Proliferation and apoptosis in the epithelium of the developing human cornea and conjunctiva.** Life Sci. 68:2987-3003
- Yu GL, Bradley JD, Attardi LD, Blackburn EH (1990). **In vivo alteration of telomere sequences and senescence caused by mutated Tetrahymena telomerase RNAs.** Nature. 344(6262):126-32.
- Yuan M, Konstantopoulos N, Lee J, Hansen L, Li ZW, Karin M, Shoelson SE (2001). **Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of IKK $\beta$ .** Science. 293:1673-1677
- Zhang Y y Herman B (2002). **Apoptosis and successful aging.** Mech Ageing Dev 2002. 123:563-565.



---

# *Anexos*

---

*Artículo I.*

*Melatonin improves inflammation processes in liver of senescence-accelerated prone male mice (SAMP8).*

*Sara Cuesta; Roman Kireev; Katherine Forman; Cruz García; Germaine Escames; Carmen Ariznavarreta; Elena Vara; Jesús Tresguerres.*



## Melatonin improves inflammation processes in liver of senescence-accelerated prone male mice (SAMP8)

Sara Cuesta<sup>a</sup>, Roman Kireev<sup>a</sup>, Katherine Forman<sup>a</sup>, Cruz García<sup>b</sup>, Germaine Escames<sup>c</sup>, Carmen Ariznavarreta<sup>a</sup>, Elena Vara<sup>b</sup>, Jesús A.F. Tresguerres<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department Physiology, Medical School, University Complutense of Madrid, Spain

<sup>b</sup> Department Biochemistry and Molecular Biology, Medical School, University Complutense of Madrid, Spain

<sup>c</sup> Department of Physiology, Institute of Biotechnology, University of Granada, Granada, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 19 February 2010

Received in revised form 22 August 2010

Accepted 24 August 2010

Available online 9 September 2010

Section Editor: Andrzej Bartke

#### Keywords:

Liver

Aging

Inflammation

Cytokines

Senescence-accelerated mouse

Melatonin

### ABSTRACT

Aging is associated with an increase in oxidative stress and inflammation. The aim of this study was to investigate the effect of aging on various physiological parameters related to inflammation in livers obtained from two types of male mice models: Senescence-accelerated prone (SAMP8) and senescence-accelerated-resistant (SAMR1) mice, and to study the influence of the administration of melatonin (1 mg/kg/day) for one month on old SAMP8 mice on these parameters.

The parameters studied have been the mRNA expression of TNF- $\alpha$ , iNOS, IL-1 $\beta$ , HO-1, HO-2, MCP1, NF $\kappa$ B1, NF $\kappa$ B2, NF $\kappa$ B protein or NKAP and IL-10. All have been measured by real-time reverse transcription polymerase chain reaction RT-PCR. Furthermore we analyzed the protein expression of TNF- $\alpha$ , iNOS, IL-1 $\beta$ , HO-1, HO-2, and IL-10 by Western-blot.

Aging increased oxidative stress and inflammation especially in the liver of SAMP8 mice. Treatment with melatonin decreased the mRNA expression of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , HO (HO-1 and HO-2), iNOS, MCP1, NF $\kappa$ B1, NF $\kappa$ B2 and NKAP in old male mice. The protein expression of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  was also decreased and IL-10 increased with melatonin treatment and no significant differences were observed in the rest of parameters analyzed. The present study showed that aging was related to inflammation in livers obtained from old male senescence prone mice (SAMP8) and old male senescence resistant mice (SAMR1) being the alterations more evident in the former. Exogenous administration of melatonin was able to reduce inflammation.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

Senescence-accelerated prone mice (SAMP) are commonly used as animal models to study aging. The SAMP strains exhibit several features that make them interesting models for human aging.

Aging is associated with several changes in structure and function of different organs and tissues, and this process also affects the liver (Sohal, 1993; Anantharajua et al., 2002; Gasbarrini et al., 1998). Furthermore, the defence capacity of the liver to different injuries, such as anoxia/reperfusion damage (Gasbarrini et al., 1998) or drug toxicity (Palomero et al., 2001), is reduced with aging. In our group we have previously reported an increase in several parameters related to oxidative stress such as lipoperoxides (LPO), cyclic guanosine monophosphate (cGMP), nitric oxide (NO) and carbon monoxide (CO), as well as a reduction on adenosine tri phosphate (ATP) content in hepatocytes isolated from 24 months old male rats (Castillo et al., 2005).

Inflammation is a complex host's normal defence reaction to injury and stress. Reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) are heavily implicated in the inflammatory process. Cytokines are the major communication channels that provide links within and between the immune system and other organ. During aging, a shift occurs in the ratio of native to memory T cells, with associated changes in the cytokine profile that favour increases in inflammatory substances such as tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin 1-beta (IL-1 $\beta$ ), interleukin 6 (IL-6), interferon-gamma (INF $\gamma$ ) and transforming growth factor beta (TGF $\beta$ ) (Hobbs et al., 1993; Riancho et al., 1994; Müller, 1991; Kubo and Cinader, 1990). Our group also found that aging was able to increase the level of pro-inflammatory cytokines such as TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6 in livers of old male rats as compared to young animals (Kireev et al., 2007). In SAMP8 mice similar findings were detected by our group in the heart (Forman et al., 2010).

Nuclear factor kappa beta (NF- $\kappa$ B) plays a key role in the expression of many genes that are central to the inflammatory response (Baldwin, 1994; Bauerle, 1991). Under challenged conditions by various stressors, pro-inflammatory genes are activated and their encoded proteins are expressed. As a part of the defence components, these newly synthesized proteins mediated by NF- $\kappa$ B activation serve to

\* Corresponding author. Laboratory of Experimental Endocrinology, Department of Physiology, School of Medicine, Complutense University, Avda, Complutense s/n. 28040, Madrid, Spain. Tel.: +34 91 3941484; fax: +34 91 3941628.

E-mail address: [guerres@med.ucm.es](mailto:guerres@med.ucm.es) (J.A.F. Tresguerres).

---

*Artículo II.*

*Growth hormone can improve insulin resistance and differentiation in pancreas of senescence accelerated prone male mice (SAMP8).*

*Sara Cuesta, Roman Kireev, Katherine Forman, Cruz García, Darío Acuña, Elena Vara, Jesús A.F. Tresguerres.*



## Growth hormone can improve insulin resistance and differentiation in pancreas of senescence accelerated prone male mice (SAMP8)

Sara Cuesta<sup>a</sup>, Roman Kireev<sup>a</sup>, Katherine Forman<sup>a</sup>, Cruz García<sup>b</sup>, Darío Acuña<sup>c</sup>,  
Elena Vara<sup>b</sup>, Jesús A.F. Tresguerres<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department Physiology, Medical School, University Complutense of Madrid, Madrid, Spain

<sup>b</sup> Department Biochemistry and Molecular Biology, Medical School, University Complutense of Madrid, Madrid, Spain

<sup>c</sup> Department of Physiology, Institute of Biotechnology, University of Granada, Granada, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 20 December 2010

Accepted 22 December 2010

Available online 15 January 2011

#### Keywords:

Pancreas

Aging

Growth hormone

Senescence accelerated mouse

### ABSTRACT

**Objective:** The aim of the present study was to investigate the effect of aging on several parameters related to glucose metabolism, proliferation and differentiation in the pancreas and how GH administration to old SAMP8 mice could affect these parameters.

**Materials and methods:** Pancreas samples were obtained from two types of male mice models: senescence-accelerated prone (SAMP8) and senescence-accelerated-resistant (SAMR1) mice SAMP8 and SAMR1 mice and the influence of exogenous administration of GH (2 mg s.c./kg/day) on SAMP8 mice. RNA was isolated from pancreas samples of male mice using the kit RNeasy total RNA kit Ref. 50974104 (Qiagen). Insulin was measured in plasma by RIA kit and glucose was measured in plasma by an assay kit.

**Results:** Aging decreases the expression of differentiation in the pancreas of Pdx-1, FoxO 1 and FoxO 3A but not of Sirt 1 or of the expression of the proliferative genes PCNA and Sei1. The expression of glucagon and GLUT2 were increased with aging and no differences were observed in somatostatin and insulin expressions. Insulin levels in plasma were increased with aging in SAMP8 mice. IGF-1 expression was reduced with aging. The treatment with GH was able to increase the expression of Sirt 1, Pdx-1, FoxO 3A and IGF-1. On the other hand, the treatment decreased the expression of glucagon, GLUT2, somatostatin and insulin, furthermore GH was able to decrease the plasma levels of insulin in old male SAMP8 mice ( $p < 0.0004$ ).

**Conclusion:** The present study has shown that aging is associated with significant alterations in the relative expression of pancreatic genes involved in insulin secretion as well as in the differentiation and in the intra islet glucose metabolism. According to our results, GH administration to old SAMP8 mice was able to improve the pancreatic function of the old SAMP8 mice and to decrease insulin and glucagon expressions in the pancreas improving instead insulin levels and glucose metabolism.

© 2010 Growth Hormone Research Society. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Type-2 diabetes mellitus (T2DM) is a chronic metabolic disorder characterized by insulin resistance in liver, muscle, and adipose tissue, as well as progressive  $\beta$ -cell dysfunction leading to hyperglycemia [1–3]. To cope with this increased demand of insulin secretion,

the pancreatic islet needs to enhance its secretory activity. The reasons for this failure to maintain sufficient insulin secretion are a decrease in  $\beta$ -cell mass combined with defective insulin secretion. Several mechanisms have been proposed to explain this failure, including endoplasmic reticulum stress, oxidative stress, amyloid deposition, lipotoxicity, and glucotoxicity [4–8]. The prevalence of type 2 diabetes and impaired glucose tolerance (IGT) increases with aging [9–11]. This theory implied that  $\beta$ -cell dysfunction was a relatively late and possibly secondary event in the pathogenesis of type 2 diabetes. In support of insulinitis in type 2 diabetes, elevated numbers of immune cells have been detected in the islets of patients with the disease in combination with increased levels of cytokines and chemokines [12–14]. Insulin resistance leads to a situation in which, muscle and fat tissue, that need to allow access to glucose, thought the insulin mediated GLUT4 activation; are not able to do so. The presence of FFA and also the inflammation related molecules like IL-1 $\beta$  and TNF $\alpha$  seem to reduce insulin receptor interaction, and more insulin is

**Abbreviations:** SAMP, the senescence-accelerated prone mouse; SAMR, senescence accelerated-resistant mouse; GH, growth hormone; IGF-1, insulin-like growth factor 1; RT-PCR, reverse transcription polymerase chain reaction; RNA, ribonucleic acid; cDNA, complementary DNA; SG, SYBR-Green; FoxO, forkhead box; PCNA, proliferating cell nuclear antigen; SERTAD1 (Sei1), SERTA domain containing 1; Pdx 1, Pancreatic and duodenal homeobox 1; GLUT-2, Glucose transporter 2; Sirt, Sirtuin; HOMA-IR, homeostatic model assessment-insulin resistance.

\* Corresponding author. Laboratory of Experimental Endocrinology, Department of Physiology, School of Medicine, Complutense University, Avda, Complutense s/n. 28040, Madrid, Spain. Tel.: +34 91 3941484; fax: +34 91 3941628.

E-mail address: [guerres@med.ucm.es](mailto:guerres@med.ucm.es) (J.A.F. Tresguerres).

---

*Artículo III.*

*Effect of GH treatment on pancreas inflammation, oxidative stress and apoptosis related to aging in SAMP8 mice.*

*Sara Cuesta, Roman Kireev, Cruz García, Katherine Forman, Elena Vara, Jesús A.F. Tresguerres.*

# Effect of Growth Hormone Treatment on Pancreatic Inflammation, Oxidative Stress, and Apoptosis Related to Aging in SAMP8 Mice

Sara Cuesta,<sup>1</sup> Roman Kireev,<sup>1</sup> Cruz García,<sup>2</sup> Katherine Forman,<sup>1</sup> Elena Vara,<sup>2</sup> and Jesús A.F. Tresguerres<sup>1</sup>

## Abstract

Aging is associated with an increase in inflammation, oxidative stress, and apoptosis. Furthermore, aging is accompanied by an alteration of the growth hormone (GH)–insulin-like growth factor-1 (IGF-1) axis. The aim of this study was to examine the regulation of these parameters in the pancreas of old mice and how GH treatment could affect this process. Male senescence-accelerated prone mice (SAMP8) and male senescence-accelerated resistant mice (SAMR1) 2 (young) and 10 months old were used ( $n=40$ ). Animals were divided into five experimental groups: 1 and 2, SAMP8/R1 young control; 3 and 4, SAMP8/R1 old control (untreated); and 5, SAMP8 old treated with GH. Physiologically equivalent doses of GH were administered for 1 month (2 mg subcutaneously [s.c.]/kg/day) and several parameters were analyzed.

Aging was associated with increased inflammation, oxidative stress, and apoptosis (increased tumor necrosis factor- $\alpha$  [TNF- $\alpha$ ], interleukin- $\beta$  [IL- $\beta$ ], IL-6, monocyte chemoattractant protein-1 [MCP1], IL-2, heme oxygenase [HO-1], inducible nitric oxide synthase [iNOS], and nitric oxide metabolites [NOx]). The ratio of anti/pro apoptotic mRNA expression—B cell lymphoma 2 (Bcl-2) Bcl-2-associated X protein (BAX) + Bcl-xL/Bcl-2-associated death promoter (BAD)—was decreased during aging in SAMP8 mice. X-inhibitor of apoptosis (XIAP) was decreased during the aging process. Furthermore, no changes were observed in protein expression of nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B p65 and NF- $\kappa$ Bp50–105). However, the protein expression of NF- $\kappa$ B p52–100 and inhibitor kappa B (I $\kappa$ B) alpha was increased with age in the pancreas of SAMP8 mice. On the other hand, the expression of I $\kappa$ B beta was decreased with aging. These results indicate that aging is associated with significant alterations in the relative expression of pancreatic genes involved in inflammation, oxidative stress, and apoptosis. According to our results, GH administration to old SAMP8 mice was able to improve pancreas from this parameters.

## Introduction

AGING IS ASSOCIATED WITH INFLAMMATION, nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) activation, increased apoptosis,<sup>1,2</sup> impaired mitochondrial activity,<sup>3</sup> and a decline in immune function<sup>4</sup> and also leads to a rise in the rate of free radical production.<sup>5</sup> In addition, decreases in plasma levels of some hormones, including growth hormone (GH), have been observed.<sup>6</sup>

The senescence-accelerated mouse (SAM), a murine model of accelerated aging, was established by Toshio Takeda and colleagues. SAM consists of series of SAMP (prone) and SAMR (resistant) lines. We chose SAMP8 mice as a model of senescence and for comparative purposes used SAMR1 mice as model of age-resistant animals. The same model was used extensively by our group in previous studies regarding heart and liver aging.<sup>7,8</sup>

Increased age is accompanied by alterations in the GH/insulin-like growth factor-1 (IGF-1) axis, leading to a decrease in GH secretion and plasma IGF-1 levels.<sup>9,10</sup> GH administration (acting either directly or through IGF-1 production) was shown to exert beneficial effects on several organs and tissues deteriorated by aging, such as bone, cardiovascular system, central nervous system, and body composition.<sup>10,11</sup> Both GH and IGF-1 replacement are able to reduce oxidative stress and to improve defenses against oxidation.<sup>12,13</sup> GH and IGF-1 administration have also been shown to reduce oxidative stress and to improve antioxidant activity in several experimental models in which oxidative damage is involved.<sup>14</sup> Thus, GH and its mediator IGF-1 seem to play a role in the regulation of oxidative stress, apoptosis, and inflammation in aged organs.

<sup>1</sup>Department Physiology and <sup>2</sup>Department Biochemistry and Molecular Biology, Medical School, University Complutense of Madrid Medical School, University Complutense of Madrid, Madrid, Spain.

---

*Artículo IV.*

*Beneficial effect of melatonin treatment on inflammation, apoptosis and oxidative stress on pancreas of Senescence Accelerated Mice Model.*

*Sara Cuesta; Roman A Kireev; Cruz Garcia; Katherine Forman; Elena Vara; Jesus AF Tresguerres.*



## Beneficial effect of melatonin treatment on inflammation, apoptosis and oxidative stress on pancreas of a senescence accelerated mice model

Sara Cuesta<sup>a</sup>, Roman Kireev<sup>a</sup>, Cruz García<sup>b</sup>, Katherine Forman<sup>a</sup>, Germaine Escames<sup>c</sup>, Elena Vara<sup>b</sup>, Jesús A.F. Tresguerres<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Physiology, Medical School, University Complutense of Madrid, Complutense s/n. 28040, Madrid, Spain

<sup>b</sup> Department of Biochemistry and Molecular Biology, Medical School, University Complutense of Madrid, Complutense s/n. 28040, Madrid, Spain

<sup>c</sup> Department of Physiology, Institute of Biotechnology, University of Granada, Granada, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 16 March 2011

Received in revised form 4 October 2011

Accepted 8 October 2011

Available online 17 October 2011

#### Keywords:

Pancreas

Aging

Inflammation

Cytokines

Senescence accelerated mouse

Melatonin

### ABSTRACT

This study has investigated the effect of aging on parameters of inflammation, oxidative stress and apoptosis in pancreas obtained from two types of male mice models: senescence-accelerated prone (SAMP8) and resistant mice (SAMR1). Animals of 2 (young) and 10 months of age (old) were used ( $n = 64$ ). The influence of the administration of melatonin in the drinking water for one month at two different dosages (1 and 10 mg/(kg day)) on old SAMP8 mice on these parameters was also studied.

SAMP8 mice showed with age a significant increase in the relative expression of pancreatic genes involved in inflammation, oxidative stress and apoptosis. Furthermore the protein expression of several NF $\kappa$ B subunits was also enhanced. On the contrary aged SAMR1 mice did not show significant increases in these parameters. Melatonin administration to SAMP8 mice was able to reduce these age related alterations at the two used dosages.

© 2011 Published by Elsevier Ireland Ltd.

## 1. Introduction

Aging is the time associated progressive accumulation of changes related with or responsible for the ever-increasing susceptibility to disease and death. Enhanced oxidative stress, inflammation and apoptosis are the most common aging associated alterations that can be used as markers of the process (Harman, 1981). Progressive and irreversible physiological decline is a characteristic of all organisms late in life. Aging can affect gene regulation (Helenius et al., 2001) and is accompanied by evident activation of inflammatory pathways and enhanced apoptosis (Zhang and Herman, 2002; Tresguerres et al., 2008).

Elderly humans have altered cellular redox levels and suppressed regenerative responses, both of which are key events underlying the progression of chronic degenerative diseases of

aging, such as diabetes mellitus. Poorly maintained cellular redox levels lead to elevated activation of nuclear transcription factors such as NF $\kappa$ B (nuclear factor kappa beta) and AP-1. These factors are coordinately responsible for a huge range of extracellular signalling molecules responsible for inflammation, tissue remodelling, oncogenesis and apoptosis progresses that orchestrate many of the degenerative processes associated with aging (Hu et al., 2000).

Aging is usually associated with decreasing glucose tolerance and to increase susceptibility to diabetes (De Fronzo, 1984). It was also shown that insulin secretion in rabbits was reduced with age (Reaven and Reaven, 1981). The decreased ability to maintain carbohydrate homeostasis may be a major factor in the pathogenesis of age-induced diabetes (Meites et al., 1987). Increasing evidence suggests that pancreatic islet dysfunction in type 2 diabetes can be promoted by an inflammatory process. Indeed, pancreas of patients with type 2 diabetes are characterized by the enhancement of cytokines, immune cells, NF $\kappa$ B activation, beta cell apoptosis, amyloid deposits, and fibrosis (Donath et al., 2008).

Melatonin is an endogenous chemical mediator, which regulates the circadian rhythm and it has also a number of other important functions, like powerful anti-inflammatory and antioxidant activities which have been tested in several experimental studies. For example melatonin was shown to modulate the inflammatory process associated with pancreatitis and also to

*Abbreviations:* SAMP, senescence-accelerated prone mouse; SAMR, senescence accelerated-resistant mouse; Mel, melatonin; RT-PCR, reverse transcription polymerase chain reaction; RNA, ribonucleic acid; cDNA, complementary DNA; SG, SYBR-Green; HOMA-IR, homeostatic model assessment-insulin resistance; XIAP, X-inhibitor apoptosis.

\* Corresponding author at: Laboratory of Experimental Endocrinology, Department of Physiology, School of Medicine, Complutense University, Avda, Complutense s/n. 28040, Madrid, Spain. Tel.: +34 91 3941484; fax: +34 91 3941628.

E-mail address: [guerres@med.ucm.es](mailto:guerres@med.ucm.es) (Jesús A.F. Tresguerres).

---

*Artículo V.*

*Melatonin can improve insulin resistance and aging “problems” in pancreas of senescence accelerated prone male mice (SAMP8).*

*Sara Cuesta, Roman Kireev, Cruz García, Elena Vara, Jesús A. F. Tresguerres.*

Melatonin can improve insulin resistance and aging-induced pancreas alterations in senescence accelerated prone male mice (SAMP8).

Sara Cuesta<sup>1</sup>, Roman Kireev<sup>1</sup>, Cruz García<sup>2</sup>, Lisa Rancan<sup>2</sup>, Elena Vara<sup>2</sup>, Jesús A. F. Tresguerres<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department Physiology, Medical School, University Complutense of Madrid, Madrid, Spain.

<sup>2</sup>Department Biochemistry and Molecular Biology, Medical School, University Complutense of Madrid, Madrid, Spain.

**\*Correspondence:** Prof. Jesus A.F. Tresguerres.

Laboratory of Experimental Endocrinology.

Department of Physiology, School of

Medicine, Complutense University, Avda,

Complutense s/n. 28040, Madrid, Spain.

Tel. 34 91 3941484, Fax 34 91 3941628

E-mail: [guerres@med.ucm.es](mailto:guerres@med.ucm.es)

**Running title:** Melatonin and its effect in aging pancreas.

**Keywords:** Pancreas, Aging, Melatonin, Senescence Accelerated Mouse.

## **ABSTRACT**

The aim of the present study was to investigate the effect of aging on several parameters related to glucose homeostasis and insulin resistance in pancreas and how melatonin administration could affect these parameters. Pancreas samples were obtained from two types of male mice models: Senescence-accelerated prone (SAMP8) and senescence-accelerated-resistant mice (SAMR1).

Insulin levels in plasma were increased with aging in both SAMP8 and SAMR1 mice, whereas insulin content in pancreas was decreased with aging in SAMP8 and increased in SAMR1 mice. Expression of glucagon and GLUT2 mRNAs were increased with aging in SAMP8 mice and no differences were observed in somatostatin and insulin mRNA expressions. Furthermore, aging decreased also the expressions of Pdx-1, FoxO 1, FoxO 3A and Sirt 1 in pancreatic SAMP8 samples. Pdx-1 was decreased in SAMR1 mice but no differences were observed in the rest of parameters on these mice strains.

Treatment with melatonin was able to decrease plasma insulin levels and to increase its pancreatic content in SAMP8 mice. In SAMR1, insulin pancreatic content and plasma levels were decreased. HOMA-IR was decreased with melatonin treatment in both strains of animals. On the other hand, in SAMP8 mice, treatment decreased the expression of glucagon, GLUT2, somatostatin and insulin mRNA. Furthermore it was also able to increase the expression of Sirt 1, Pdx-1 and FoxO 3A.

According to these results, aging is associated with significant alterations in the relative expression of pancreatic genes associated to glucose metabolism. This has been especially observed in SAMP8 mice. Melatonin administration was able to improve pancreatic function in old SAMP8 mice and to reduce HOMA-IR improving there insulin physiology and glucose metabolism.

## INTRODUCTION

The prevalence of obesity, insulin resistance, and type 2 diabetes is reaching epidemic proportions worldwide. Type 2 diabetes is a disease with a slow but progressive pathogenesis. Both genes and the environment play a critical role in its development. Insulin resistance is the earliest detectable defect that may occur 15-25 years or more before the clinical onset of disease. Insulin-resistant states are characterized by the inability of insulin to promote glucose uptake in the tissues [1, 2]. Thus, insulin resistance constitutes what epidemiologists call an 'intervening phenotype,' as well as a marker for the disease. Initially, there is an attempt to compensate for this resistance with increased insulin secretion, but eventually, hormone secretion fails and type 2 diabetes develops. The reasons for the failure to maintain sufficient insulin secretion would be a decrease in  $\beta$ -cell mass combined with defective insulin secretion. The exact molecular site for the insulin resistance is unknown. Environmental factors, particularly those leading to obesity, further enhance this diabetogenic tendency by accentuating insulin resistance. Increasing evidence suggests that an inflammatory process promotes islet dysfunction in type 2 diabetes [3]. Indeed, pancreas of patients with type 2 diabetes are characterized by the presence of cytokines, NF- $\kappa$ B activation, immune cells, beta cell apoptosis, amyloid deposits, and fibrosis. Elevated free fatty acid levels establish the link between obesity and insulin resistance. Patients with insulin resistance or type 2 diabetes mellitus usually exhibit obesity and elevated free fatty acid levels. However insulin resistance can also originate in the adipose tissue, where it leads to an increase in lipolysis, with a subsequent release of glycerol and FFA into the circulation. It is widely accepted that increased availability and utilization of FFA contribute to the development of insulin resistance in skeletal muscle, as well as to increased hepatic glucose production. In fact, the progression of this situation in rats on a high-fat diet is closely related to plasma FFA levels. The clinical consequences of insulin resistance and compensatory hyperinsulinemia have become a major public health problem.

Melatonin (N-acetyl-5-methoxytryptamine), a tryptophan derived small indolic molecule, is mainly produced by the pineal gland but is also produced in other tissues [4,5,6]. Melatonin is a highly filogenetically conserved molecule that exerts many regulatory functions, modulating cellular metabolism through its binding to specific membrane and nuclear receptors [7,8]. Data obtained from experimental animal models

*in vivo* and studies *in vitro* suggest that melatonin might regulate glucose homeostasis [7,8,9]. In normal rats, pinealectomy induces insulin resistance and glucose intolerance [7, 8]. In obese insulin-resistant rats, parenteral melatonin administration was able to decrease body weight and to lower plasma glucose [10] and insulin [11] levels, but the underlying mechanisms are not known. Melatonin was also shown to reduce serum cholesterol levels in mammalian species [12,13,14,15] and to prevent oxidative stress in diabetic subjects [15,16]. It is also been shown to reduce hyperglycemia, hyperinsulinemia, and hyperleptinemia, and to restore hepatic  $\Delta$ -5 desaturase (an insulin-permissive enzyme) activity in type 2 diabetic rats. These animals also exhibited a restoration in their altered polyunsaturated fatty acids (PUFA) levels to near normal values [16]. Thus, melatonin may prevent changes in membrane fluidity during lipid peroxidation induced by oxidants [17] and diabetes [16].

The decrease in the production of melatonin, the increase in insulin secretion, the decrease in sensitivity of peripheral tissues and of pancreatic islet  $\beta$  cells to insulin have been described as typical for aging in humans [18,19 ,20,21,22].

Establishing pertinent animal models which have characteristics closely similar to humans is essential to elucidate the fundamental mechanisms of age-related changes and to develop effective drugs for the prevention of age-related diseases. SAM (senescence-accelerated mouse) has been already established as a murine model of accelerated aging. It is composed actually by a group of related inbred mice including nine strains showing accelerated, senescence-prone, short-lived animals (SAMP), and three resistant to accelerated senescence, long-lived mice (SAMR) [23,24]. SAMP animals show relatively specific age-associated phenotypic pathologies such as a shortened life span and early manifestation of senescence. Previous studies from our group have investigated age associated changes in SAMP8 and SAMR1 mice in heart [25, 26]. In this study biochemical parameters associated with glucose homeostasis have been investigated in SAMP8 mice as compared with SAMR1 mice which serve as their controls.

Due to all the above mentioned facts, in this paper the effect of aging on glucose metabolism, cell proliferation and differentiation in pancreas of SAMP8 mice has been investigated as compared with SAMR1 mice. The effect of a chronic treatment with melatonin, at two different doses has been also tested.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Animals and treatment**

Melatonin was obtained from Actafarma (Madrid, Spain). Other reagents were of the highest quality available and obtained from different commercial companies.

Male senescence-accelerated mice (SAMP8/ SAMR1) of 2 (young) and 10 months (old) of age were used (n = 64). Animals were divided into eight experimental groups (n=8 animals per group) (1) young SAMP8 untreated (2 month age), (2) old SAMP8 untreated (10 month age), (3) old SAMP8 (10 month age) treated with Melatonin 1mg, (4) old SAMP8 (10 month age) treated with Melatonin 10mg, (5) SAMR1 young untreated (2 month age), (6) SAMR1 old untreated (10 month age) (7) old SAMR1 (10 month age) treated with Melatonin 1mg , (8) old SAMP8 (10 month age) treated with Melatonin 10mg. The animals remained during all the time including the treatment period in conditions of controlled light (12-h light/dark cycle) and temperature (20–24°C) and received a standard diet and water ad libitum. Mice were treated with melatonin during 4 weeks between 9 and 10 month of age. Melatonin was dissolved in absolute ethanol and added to the drinking water in a final ethanol concentration of 0.066%. Water bottles were covered with aluminium foil to be protected from light, and the drinking fluid was changed three times a week, depending on the water consumption and the weight of the animals. Untreated animals received 0.1% alcohol in tap water. After 30 days of treatment, animals were killed by cervical dislocation followed by decapitation and pancreas were collected in RNA later (for PCR determinations). All animals received humane care according to the Guidelines for Ethical Care of Experimental Animals of the European Union.

### **RNA isolation and PCR quantification**

RNA was isolated from pancreas samples of male mice using the kit RNeasy total rna kit ref.50974104 (Qiagen) and following the manufacturer's protocol. The purity of the RNA was estimated by 1.5% agarose gel electrophoresis, and RNA concentration was determined by spectrophotometry. Reverse transcription of 2 µg RNA for cDNA synthesis was performed using the Reverse Transcription System, (Promega, Madison, WI, USA) and a pd (N) 6 random hexamer. RT- PCR was performed in an Applied Biosystems 7300 apparatus using the SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Warrington, UK) and 300 nM concentrations of specific primers (Table 1). The thermo cycling profile conditions used were: 50°C for 2 m, 95°C for 10 m

(followed by 40 cycles), 95°C for 15 s, 60°C for 1 m, 95°C for 15 s, 60°C for 30 s and 95°C for 15 s. For the normalization of cDNA loading in the PCR reaction, the amplification of 18S rRNA for every sample was used. The primers used were for the estimation of: Glucagon, GLUT-2, Insulin, Somatostatin, FoxO1, FoxO3A, Sirtuin 1, Sei1 and Pdx-1 (Table 1). Relative changes in gene expression were calculated using the 2-DDCT method [27].

### **Insulin and Glucose**

Insulin was measured in plasma by a RIA kit according to the manufacturer's instructions (DRG Instruments, GmbH, Germany)

Glucose was measured in plasma by an assay kit according to the manufacture's instructions (GAG 020-1kt, SIGMA)

Plasma glucose and insulin values were used to calculate a homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) as follows:  $\text{glucose (nmol/L)} \times \text{insulin (mIU/L)} / 22.5$  [28].

### **Free fatty acids**

Free fatty acids was measured in plasma by an assay kit according to the manufacture's instructions (NEFA ACS-ACOD Method, Wako Chemicals GmbH)

### **Statistical analyses**

The results were statistically analyzed with the ANOVA method, with a confidence level of 95% ( $p < 0.05$ ) was considered significant. Results are expressed as the  $\text{mean} \pm \text{SEM}$ . Mean comparison was done by the ANOVA analysis of variance followed by a Fisher test. In each case analysis for PCR was carried out and normalized according to 18S rRNA endogenous gene run in parallel.

Relative changes in gene expression were calculated using the 2-DDCT method

## RESULTS

Plasma Insulin levels were increased in both old SAMP8/SAMR1 mice as compared with their respectively young controls ( $p<0.001$ ). Treatments with melatonin were able to restore these levels in a dose dependent manner ( $p<0.05$ ).

Pancreatic content of this hormone was decreased with aging ( $p<0.001$ ) in SAMP8 animals. Treatments with melatonin at 1 and 10 mg/kg/day were able to restore values of insulin to those present in young animals and in a dose dependent manner ( $p<0.05$ ). In SAMR1 mice pancreatic content of this hormone was increased ( $p<0.001$ ) and treatments with melatonin 1 and 10 mg were able to decrease its values ( $p<0.05$ ) (Table 2)

Glucose was measured as a metabolic index for insulin action and no differences were found with aging in SAMP8 animals. Melatonin treatments at 1 and 10 mg were able to decrease plasma glucose levels of these mice ( $p<0.05$ ). In SAMR1 mice no differences were observed neither with aging nor with melatonin treatment (Table 2).

HOMA-IR index showed significant increases in old SAMP8 and SAMR1 male mice as compared to young animals ( $p<0.001$ ). The index was also significantly higher in old SAMP8 mice as compared with old SAMR1 mice ( $p<0.01$ ). Melatonin administration was able to reduce the HOMA-IR index in both old SAMP8 and SAMR1 mice in a dose dependent manner ( $p<0.05$ ) (Table 2).

Whereas gene expression of Glucagon ( $p<0.05$ ) and GLUT2 ( $p<0.05$ ) were significantly increased with aging in pancreas of SAMP8 mice, no differences were observed in its expression on SAMR1 animals (Fig 1). Expression of GLUT2 was lower ( $p<0.01$ ) in young SAMP8 mice as compared with young SAMR1 animals (Fig 1B) but old SAMP8 mice showed higher values than old SAMR1 mice.

Expression of Insulin and Somatostatin didn't change during aging in pancreas of male SAMP8 mice and also no significant differences were observed between old and young SAMR1 animals (Fig 2). Expressions of Insulin ( $p<0.05$ ) and Somatostatin ( $p<0.001$ ) mRNA were increased in pancreas of young and old SAMP8 animals as compared with young and old SAMR1 mice (Fig 2).

Treatment with melatonin at 1 and 10 mg/kg/day were able to reduce expression of Glucagon ( $p<0.05$ ), GLUT2 ( $p<0.01$ ), Somatostatin ( $p<0.001$ ) and insulin ( $p<0.01$ ) in old SAMP8 male mice as compared with untreated animals (Fig 1, 2).

mRNA expressions of FoxO1 ( $p < 0.05$ ) and FoxO 3A ( $p < 0.001$ ) and Sirtuin ( $p < 0.05$ ) were decreased with aging in old SAMP8 mice (Fig 3). No significant differences in these parameters were observed between old and young SAMR1 mice. The comparative analysis of the gene expression of FoxO1 ( $p < 0.05$ ) between old SAMP8 and old SAMR1 mice demonstrated significantly lower values in SAMR1 mice (Fig. 3). Treatment with melatonin (1 and 10 mg/kg/day) significantly increased mRNA expression of FoxO 3A ( $p < 0.001$ ), Sirtuin ( $p < 0.05$ ) and FoxO1 ( $p < 0.05$ ) in old male SAMP8 mice as compared with untreated animals (Fig 3). We observed a dose dependent increase in mRNA expression of FoxO3a and Sirtuin.

No significant differences were observed with aging in the pancreatic expression of proliferation gen (Sei1) between SAMP8 and SAMR1 mice. Melatonin administration did not influence these parameters in old SAMP8 mice. No differences were observed also in SAMR1 mice.

Pdx-1 expression was decreased in both old SAMP8 and SAMR1 mice ( $p < 0.001$ ) and only melatonin 10 mg/kg/day treatment increased this expression in SAMP8 mice ( $p < 0.001$ ) (Fig 4).

No significant differences were observed between young and old SAMP8 mice in plasma free fatty acids levels. Treatments with melatonin didn't change these levels of FFA. No differences were observed neither between young and old SAMR1 nor between young and old SAMP8 mice (Fig 5).

## DISCUSSION

One of the greatest risk factors for the development of type 2 diabetes in humans is age [29]. Type 2 diabetes is characterized by a combination of defective insulin secretion that results from a progressive age-associated decline in pancreatic function and appearance of insulin resistance [30,31,32]. In our data a decrease in pancreatic insulin content of old SAMP8 mice as compared with young mice has been observed. However, mRNA expression of insulin did not change with aging, neither in SAMP8 nor in SAMR1 mice. On the other hand, enhanced plasma levels of this hormone were also observed but without changes in glycemia (Table 2). So, according to our results, the decrease in pancreatic insulin content observed in old SAMP8 mice was surely still preceding the appearance of hyperglycemia. In addition, levels of plasma insulin were elevated in both old SAMP8 and SAMR1 mice. Furthermore, HOMA-IR index was calculated and in old SAMP8 and SAMR1 mice was found to be elevated as compared with young animals. So, we considered that animals were in an initial insulin resistance state. Two different approaches have been considered in order to solve the insulin resistance problem. In SAMR1 mice, when tissues become less sensitive and more resistant to insulin, pancreas did increase insulin secretion (and therefore its level) to maintain normal glucose levels, but HOMA-IR index didn't change in this animals. In SAMP8 mice the insulin content of pancreas decreased with aging, due to the fact that pancreas in these animals couldn't secrete enough insulin, since beta cell in these animals were already damaged due to the aging process. Furthermore, an increase in plasma insulin levels with aging was observed in these animals. Glucose levels did not change between young and old animals, due to the increased plasma levels of insulin plasma levels of insulin but also to the increase in GLUT-2 expression in these animals (Figure 6). People suffering type 2 diabetes mellitus, normally experience normoglycemic hyperinsulinism for many years before hyperglycaemia and clinical characteristics occurs [33,34]. However, if insulin resistance worsens, plasma insulin levels are finally reduced and glucose levels should begin to rise. These are then two of the major symptom of an established type 2 diabetes mellitus.

Islets of Langerhans are heterogeneous cell aggregates containing  $\beta$ -,  $\alpha$ -,  $\delta$ -, and PP cells, which secrete insulin, glucagon, somatostatin (SST), and pancreatic polypeptide, respectively. The different cell types within the islet are affected by changes in extracellular glucose concentrations. Thus, elevations in circulating glucose should stimulate insulin secretion from  $\beta$ -cells and somatostatin secretion from  $\delta$ -cells [35].

Our results showed that insulin and somatostatin mRNA expression seem to behave in the same way and no differences were observed between young and old animals. These results showed correlation with plasma glucose levels. Other pancreatic hormones were also analyzed in these mice. The mRNA expression of glucagon was increased in old SAMP8 and SAMR1 mice ( $p < 0.05$ ). Other studies have found that type 2 diabetes is characterised not only by problems with  $\beta$ -cell function and mass, but also by a relative increase of  $\alpha$ -cells, resulting in a relative hyperglucagonemia due to a certain type of  $\alpha$ -cell dysfunction [36,37,38], that these mice could also display.

Cuesta et al. [26] showed that the proliferative genes PCNA and Sei 1 did not change with aging in SAMP8 old mice, but Pdx-1 expression was lower in aged mice. Pancreatic and duodenal homeobox-1 (Pdx-1) is a transcription factor necessary for pancreatic development and  $\beta$ -cell maturation. In our results, mRNA expression of Pdx-1 was lowered in old SAMP8 mice. The reduced Pdx-1 expression has been shown to accompany the development of full blown diabetes, in complex genetic or environmentally related animal models of the disease, showing a correlation between low Pdx-1 levels and  $\beta$  cell failure [39,40, 41].

FOXO factors are associated with a wide range of biological processes, including cell cycle arrest, apoptosis, DNA repair, glucose metabolism, anti-oxidative stress and longevity [42,43]. mRNA expression of FoxO1 and FoxO3A were measured showing a decrease with aging in SAMP8 mice.

SIRT1 is a known regulator of hepatic gluconeogenesis; it deacetylates peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ )-coactivator1 $\alpha$  (PGC1- $\alpha$ ), thereby increasing liver gluconeogenic gene transcription and repressing glycolytic gene expression. Furthermore, SIRT1 has been shown to bind and to deacetylate FOXO proteins [44, 45–46] and, in our results, mRNA expression of SIRT1 was also decreased with aging in SAMP8 mice. SIRT1 effects on FOXO activities vary depending on FOXO target genes. The consensus that emerges from these studies is that SIRT1 may play a crucial role in tilting the balance of FOXO functions away from cell death and more towards resistance to stress [47].

Pineal melatonin biosynthesis declines with aging. Nocturnal plasma melatonin levels are significantly decreased already by middle-age and this reduction has been hypothesized to be associated with a variety of age related physiological changes [50]. Melatonin levels tend to decrease significantly by middle age and then continue to decline throughout old age [51,52], intra abdominal adiposity, plasma insulin and

plasma leptin levels tend to increase at the same time [53,54] due to the development of insulin resistance, leading to diabetes, dyslipidemia and cardiovascular diseases [53]. Reports indicate that factors that increase oxidative stress like hyperglycemia, increased free-fatty acids and adipokines contribute to insulin resistance [48,49]. No significant differences with age were observed in these mice in plasma free fatty acids levels.

Both humans [55] and rodents seem to have a relationship between circulating melatonin and the regulation of carbohydrate metabolism [56,57]. Pinealectomy induced diminished glucose tolerance, insulin resistance, decreased hepatic and muscular glycogenesis and an increase in blood pyruvate concentration in rats [58]. On the other hand, it has been shown that melatonin was able to reduce insulin secretion under several experimental conditions [57, 59, 60]. However, the action of melatonin in the process of glucose-induced insulin secretion has not been well understood. In these mice, treatment with melatonin was able to decrease mRNA expression of insulin. However insulin content in pancreas was increased and plasma levels of this hormone were decreased in old male SAMP8 mice. Glucemic level was decreased with melatonin treatment and HOMA-IR showed a significant reduction in treated animals, with a clear cut dose-response effect. This seems to indicate that melatonin is able to ameliorate glucose homeostasis.

The absence of a pancreatic insulin increase with age in animals was probably due to a certain damage of its beta cells. Treatment with melatonin induced an increase in pancreatic insulin content, reaching values similar to those found in young mice and due to this increase, plasma glucose levels were reduced. On the other hand, melatonin treatment was also able to decrease plasma insulin levels since in these animals, melatonin was able to decrease peripheral insulin resistance or increase insulin sensitivity. Furthermore treatment with melatonin was able to decrease HOMA-IR in a dose-response manner. Similarly, due to the glucemic decrease, glucose sensor GLUT-2 expression was also decreased.

Other pancreatic hormones like somatostatin and glucagon, showed also a decrease with melatonin treatment. So, in these mice, melatonin treatment was able to restore a previous situation of “hyperglucagonemia” and to reduce mRNA expression of somatostatin, decreasing the levels of insulin in plasma and increasing pancreatic content of this hormone.

Pancreas development is the result of an orchestrated series of events. Pancreatic and duodenal homeobox factor-1 (Pdx-1) is a transcription factor that plays an important

role in the endocrine pancreas [61] and is present in all endocrine pancreatic cells during embryonic development. However, its expression is largely restricted to beta cells in the adult pancreas [62]. In our results mRNA expression of Pdx-1 has been found to be elevated with 10 mg of melatonin. As we mentioned above, reduced Pdx-1 expression accompanies the development of a full blown diabetes, in specific animal models of the disease, showing an evident correlation between low Pdx-1 levels and  $\beta$  cell failure [63]. Melatonin treatment was able to increase the expression of this factor. Pdx-1 is regulated in part by the forkhead transcription factor, FoxO1, the most abundant forkhead transcription factor in pancreatic beta cells [64]. The maintenance of enough beta cell mass and function is critical for glucose homeostasis. Beta cell mass can be affected by changes in cell size, proliferation, neogenesis or apoptosis. In previous studies of our group, melatonin was found to be able to decrease the age-dependent oxidative stress, inflammation and apoptosis in pancreas [65]. In our actual results, an increase in mRNA expression of FoxO factors and SIRT 1 on old SAMP8 mice in a dose dependent manner has been found. FoxO factors could mediate a protective effect by promoting the expression of genes involved in fighting oxidative stress.. SIRT1 is a selective activator of FoxO signalling but simultaneously also an inhibitor of the NF-kB pathway [67,68]. This type of regulation can enhance the FoxO-dependent longevity associated functions, while inhibiting NF-kB dependent pro-aging processes. The increase of these genes could help to preserve beta cell function also under conditions of enhanced oxidative stress, such as in insulin-resistant states [66]

According to our results, aging of the pancreas in SAMP8 mice was associated with alterations in insulin secretion, pancreas differentiation and glucose homeostasis. Melatonin, at two different doses, was able to improve the age related pancreatic damage, restoring insulin levels, differentiation and glucose metabolism. SAMR1 were not highly affected by aging and in the same way melatonin effects were not as important.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work has been possible through grants from Instituto de Salud Carlos III (RETICEF RD06/0013 RD06/0013/0008), Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa, Junta de Andalucía (P07-CTS-03135), PI081644 (ISCIII) and SAF 2007 66878-C02-01. Thanks are given to Daniel and Rocío Campón for their technical support.

## REFERENCES

1. DUPLAIN H, BURCELIN R, SARTORI C, et al. Insulin resistance, hyperlipidemia, and hypertension in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *Circulation*. 2001; 104:342–345
2. VOLLENWEIDER P, RANDIN D, TAPPY L, et al. Impaired insulin-induced sympathetic neural activation and vasodilation in skeletal muscle in obese humans. *J Clin Invest*. 1994; 93:2365–2371
3. DONATH MY, STORLING J, BERCHTOLD LA, et al. Cytokines and beta-cell biology: from concept to clinical translation. *Endocr Rev*. 2008; 29(3):334-350.
4. ERREN TC, REITER RJ. A generalized theory of carcinogenesis due to chronodisruption. *Neuro Endocrinol Lett*. 2008; 29(6):815-21.
5. HARDELAND R. Melatonin, hormone of darkness and more: occurrence, control mechanisms, actions and bioactive metabolites. *Cell Mol Life Sci*. 2008; 65(13):2001-18.
6. REITER RJ, PAREDES SD, MANCHESTER LC, et al. Reducing oxidative/nitrosative stress: a newly-discovered genre for melatonin. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2009; 44(4):175-200.
7. ZANQUETTA MM, SERAPHIM PM, SUMIDA DH, et al. Calorie restriction reduces pinealectomy-induced insulin resistance by improving GLUT4 gene expression and its translocation to the plasma membrane. *J Pineal Res*. 2003; 35:141–148
8. LIMA FB, MACHADO UF, BARTOL I, et al. Pinealectomy causes glucose intolerance and decreases adipose cell responsiveness to insulin in rats. *Am J Physiol*. 1998; 275:934–941
9. HA E, YIM SV, CHUNG JH, et al. Melatonin stimulates glucose transport via insulin receptor substrate-1/phosphatidylinositol 3-kinase pathway in C2C12 murine skeletal muscle cells. *J Pineal Res*. 2006;41:67–72

10. PRUNET-MARCASSUS B, DESBAZEILLE M, BROS A, et al. Melatonin reduces body weight gain in Sprague Dawley rats with diet-induced obesity. *Endocrinology*. 2003; 144:5347–5352
11. HUSSEIN MR, AHMED OG, HASSAN AF, et al. Intake of melatonin is associated with amelioration of physiological changes, both metabolic and morphological pathologies associated with obesity: an animal model. *Int J Exp Pathol*. 2007; 88:19–29
12. HOYOS M, GUERRERO JM, PEREZ-CANO R, et al. Serum cholesterol and lipid peroxidation are decreased by melatonin in diet-induced hypercholesterolemic rats. *J. Pineal Res*. 2000; 28, 150–155.
13. MORI N, AOYAMA H, MURASE T, et al. Anti-hypercholesterolemic effect of melatonin in rats. *Acta Pathol. Jpn*. 1989; 39, 613–618.
14. AOYAMA H, NORI N, AND MORI W. Effects of melatonin on genetic hypercholesterolemia in rats. *Atherosclerosis*. 1988; 69, 269–272.
15. MONTILLA PL, VARGAS JF, TUNEZ IF, et al. Oxidative stress in diabetic rats induced by streptozotocin: protective effects of melatonin. *J. Pineal Res*. 1998; 25, 94–100.
16. NISHIDA S, SEGAWA T, MURAI I, et al. Long-term melatonin administration reduces hyperinsulinemia and improves the altered fatty-acid compositions in type 2 diabetic rats via the restoration of Delta-5 desaturase activity. *J. Pineal Res*. 2002; 32, 26–33.
17. GARCIA JJ, REITER RJ, GUERRERO JM, et al. Melatonin prevents changes in microsomal membrane fluidity during induced lipid peroxidation. *FEBS*. 1997; 408, 297–300.
18. BARBIERI M, RIZZO MR, MANZELLA D, et al. Glucose regulation and oxidative stress in healthy centenarians. *Exp. Gerontol*. 2002; 38, 137–143.
19. BELLINO FL AND WISE PM. Nonhuman primate models of menopause workshop. *Biol. Reprod*. 2003; 68, 10–18.
20. FERRARIE, MAGRI F, DORI D, et al. Neuroendocrine correlates of the aging brain in humans, *Neuroendocrinology*. 1995; 61, 464–470.
21. FERRARIE, MAGRI F, LOCATELLI M, et al. Chrono-neuroendocrine markers of the aging brain, *Aging Clin. Exp. Res*. 1996; 8, 320–327
22. TOUITOU Y AND HAUS E. Alterations with aging of the endocrine and neuroendocrine circadian system in humans, *Chronobiol. Int*. 2000;17, 369–390

23. KITADO H, HIGUCHI K, TAKEDA T. Molecular genetic characterization of the Senescence-Accelerated Mouse (SAM) Strains. *J. Gerontol.* 1994; 49: B247-B254.
24. TAKEDA T, MATSUSHITA T, KUROZUMI M, TAKEMURA K, HIGUCHI K, HOSOKAWA M. Pathobiology of the Senescence-Accelerated Mouse (SAM). *Exp. Gerontol.* 1997; 32: 117-128.
25. FORMA K, VARA E, GARCÍA C, et al. Beneficial effects of melatonin on cardiological alterations in a murine model of accelerated aging. *J Pineal Res.* 2010. Oct;49(3):312-20
26. CUESTA S, KIREEV R, FORMAN K, et al. Growth hormone can improve insulin resistance and differentiation in pancreas of senescence accelerated prone male mice (SAMP8). *Growth Horm IGF Res.* 2011 Apr;21(2):63-8.
27. LIVAK KJ AND SCHMITTGEN TD. Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods.* 2001; 25, 402–408.
28. MATTHEWS DR, HOSKER JP, RUDENSKI AS, et al. Homeostasis model assessment: insulin resistance and  $\beta$ -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia.* 1985; 28, 412–419.
29. WILSON PW, ANDERSON KM, KANNEL WB. Epidemiology of diabetes mellitus in the elderly. The Framingham study. *Am J Med.* 1986; 80:3–9.
30. IOZZO P, BECK-NIELSEN H, LAAKSO M, et al. Independent influence of age on basal insulin secretion in nondiabetic humans. European group for the study of insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999; 84: 863–868.
31. BASU R, BREDA E, OBERG AL, et al. Mechanisms of the age-associated deterioration in glucose tolerance: contribution of alterations in insulin secretion, action, and clearance. *Diabetes.* 2003; 52:1738–1748.
32. MOLLER N, GORMSEN L, FUGLSANG J, et al. Effects of ageing on insulin secretion and action. *Horm Res.* 2003; 60:102–104.
33. DI GIULIO C, ANTOSIEWICZ J, WALSKI M, et al. Physiological carotid body denervation during aging. *Adv Exp Med Biol.* 2009; 648:257–63.
34. WEINBERG EJ, SCHOEN FJ, MOFRAD MR. A computational model of aging and calcification in the aortic heart valve. *PLoS One.* 2009; 4:e5960.
35. VIEIRA E, SALEHI A, GYLFE E: Glucose inhibits glucagon secretion by a direct effect on mouse pancreatic alpha cells. *Diabetologia.* 2007; 50 :370 –379
36. DENG S, VATAMANIUK M, HUANG X, et al. (2004) Structural and functional abnormalities in the islets isolated from Type 2 diabetic subjects. *Diabetes* 53: 624–632

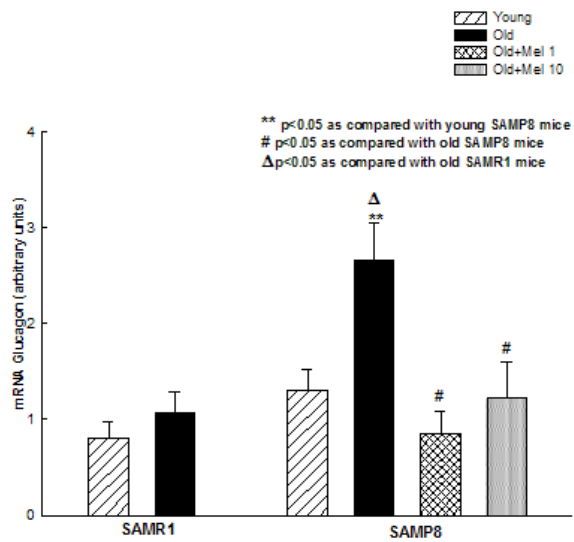
37. UNGER RH AND ORCI L. The essential role of glucagon in the pathogenesis of diabetes mellitus. *Lancet*. 1975; 1: 14–16.
38. YOON KH, KO SH, CHO JH, et al. Selective beta-cell loss and alpha-cell expansion in patients with Type 2 diabetes mellitus in Korea. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003; 88: 2300–2308.
39. SEUFERT J, WEIR GC, HABENER JF. Differential expression of the insulin gene transcriptional repressor CCAAT/enhancer-binding protein beta and transactivator islet duodenum homeobox-1 in rat pancreatic beta cells during the development of diabetes mellitus. *J Clin Invest*. 1998; 101:2528–2539.
40. AHN YB, XU G, MARSELLI L, et al. Changes in gene expression in beta cells after islet isolation and transplantation using laser-capture microdissection. *Diabetologia*. 2007; 50: 334–342.
41. BONNER-WEIR S, TANEJA M, WEIR GC, et al. In vitro cultivation of human islets from expanded ductal tissue. *PNAS*. 2000b; 97 7999–8004.
42. ACCILI D, ARDEN KC. FoxOs at the crossroads of cellular metabolism, differentiation, and transformation. *Cell*. 2004; 117:421-426.
43. BARTHEL A, SCHMOLL D, UNTERMAN TG. FoxO proteins in insulin action and metabolism. *Trends Endocrinol. Metab*. 2005; 16:183-189.
44. DAITOKU H, HATTA M, MATSUZAKI H, et al. Silent information regulator 2 potentiates Foxo1-mediated transcription through its deacetylase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2004; 101:10042-10047.
45. KOBAYASHI Y, FURUKAWA-HIBI Y, CHEN C, et al. SIRT1 is critical regulator of FOXO-mediated transcription in response to oxidative stress. *Int. J. Mol. Med*. 2005;16:237-243.
46. BRUNET A, SWEENEY LB, STURGILL JF, et al. Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. *Science*. 2004; 303:2011-2015.
47. WANG Y, TISSENBAUM HA. Overlapping and distinct functions for a *Caenorhabditis elegans* SIR2 and DAF-16/FOXO. *Mech. Ageing Dev*. 2006;127:48-56.
48. EVANS JL, GOLDFINE ID, MADDUX BA, et al. Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocrine Reviews*. 2002; 23, 5: 599–622.
49. EVANS JL, GOLDFINE ID, MADDUX BA, et al. Are oxidative stress—activated signaling pathways mediators of insulin resistance and  $\beta$ -cell dysfunction? *Diabetes*. 2003; 52, 1: 1–8.

50. V SRINIVASAN, GJM MAESTRONI, DP CARDINALI, et al. Melatonin, immune function and aging. *Immunity & Ageing*. 2005, 2:17
51. REITER R. The ageing pineal gland and its physiological consequences. *BioEssays*. 1992; 14:169–175
52. PANG SF, TSANG CW, HONG GX, et al. Fluctuation of blood melatonin concentrations with age: result of changes in pineal melatonin secretion, body growth and aging. *J Pineal Res*. 1990; 8:179–192
53. BJORNTORP P. Neuroendocrine ageing. *J Intern Med*. 1995; 238:401–404
54. RASMUSSEN DD, BOLDT BM, WILKINSON CW, et al. Daily melatonin administration at middle age suppresses male rat visceral fat, plasma leptin, and plasma insulin to youthful levels. *Endocrinology*. 1999; 140:1009–1012.
55. ALCOZER G, GIORDANO G, MASCIOTTO D. Studi sull' epifisi. influenza dell' estratto acquoso della pineale su alcuni aspetti del metabolismo glicidico in soggetti sani ed eucrinici. *Arch Pat Clin*. 1956; 12:1105–1113.
56. VAN CAUTER E, BLACKMAN JD, ROLAND D et al. Modulation of glucose regulation and insulin secretion by circadian rhythmicity and sleep. *J Clin Invest*. 1991; 88:934–942.
57. PESCHKE E, PESCHKE D. Evidence for a circadian rhythm of insulin release from perfused rat pancreatic islets. *Diabetologia*. 1998; 41:1085–1092.
58. MELLADO C, RODRÍGUEZ V, DIEGO JG et al. Effect of pinealectomy and of diabetes on liver and glucagon receptor concentrations in the rat. *J Pineal Res*. 1986; 6:295–306.
59. LA FLEUR SE, KALSBECK A, WORTEL J et al. A suprachiasmatic nucleus generated rhythm in basal glucose concentrations. *J Neuroendocrinol*. 1999; 11:643–652.
60. LA FLEUR SE. *The Suprachiasmatic Nucleus Generated Rhythm in Blood Glucose*. Ponsen and Looijen, Amsterdam, 2001.
61. KANETO H, MIYATSUKA T, KAWAMORI D, et al. PDX-1 and MafA play a crucial role in pancreatic beta-cell differentiation and maintenance of mature beta-cell function. *Endocr J*. 2008; 55(2):235–52.
62. PRADO CL, PUGH-BERNARD AE, ELGHAZI L, et al. 2004. Ghrelin cells replace insulin-producing beta cells in two mouse models of pancreas development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101: 2924–9
63. \_LOOTS GG, OVCHARENKO I. Evolutionary analysis of transcription factor binding sites. *Nucleic Acids Res*. 2004; 32:W217–221

64. KITAMURA T, NAKAE J, KITAMURA Y, et al. The forkhead transcription factor Foxo1 links insulin signaling to Pdx1 regulation of pancreatic beta cell growth. *Journal of Clinical Investigation*. 2002; 110 1839–1847.
65. CUESTA S, KIREEV RA, GARCIA C, et al. Beneficial effect of melatonin treatment on inflammation, apoptosis and oxidative stress on pancreas of Senescence Accelerated Mice Model. *Mech Ageing Dev*. 2011 Oct 17.
66. KITAMURA YI, KITAMURA T, KRUSE JP, et al. FoxO1 protects against pancreatic beta cell failure through NeuroD and MafA induction. *Cell Metabolism* 2005; 2: 153–163.
67. YEUNG F, HOBERG JE, RAMSEY CS, et al. Modulation of NFkappaB-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase. *EMBO J*. 2004; 23, 2369–2380.
68. GIANNAKOU, M. E. AND PARTRIDGE, L. The interaction between FOXO and SIRT1: Tipping the balance towards survival. *Trends Cell Biol*. 2004; 13: 408–412.

## Figure legends

**Figure 1**  
**a**



**b**

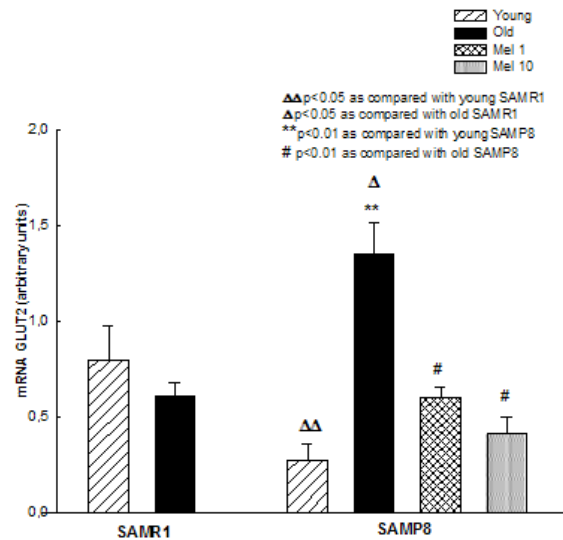
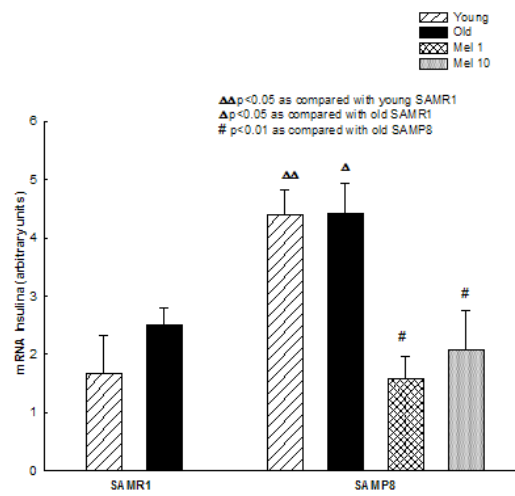


Fig 1. mRNA expression of (a) Glucagon and (b) GLUT2 on pancreas of SAMP8 and SAMR1 mice.

Fig 1. Effect of aging and melatonin administration on mRNA expression of (a) Glucagon and (b) GLUT2 in pancreas from male SAMP8 and SAMR1 mice. N=8 animals per group.

**Figure 2**  
**a**



**b**

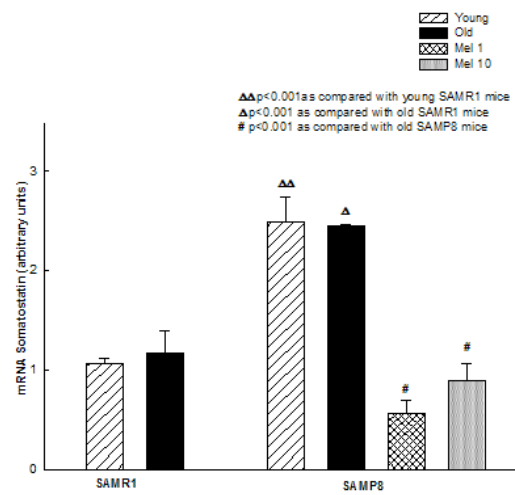


Fig 2. mRNA expression of (a) Insulin and (b) Somatostatin on pancreas of SAMP8 and SAMR1 mice.

Fig 2. Effect of aging and melatonin administration on mRNA expression of (a) Insulin and (b) Somatostatin in pancreas from male SAMP8 and SAMR1 mice. N=8 animals per group.

Figure 3

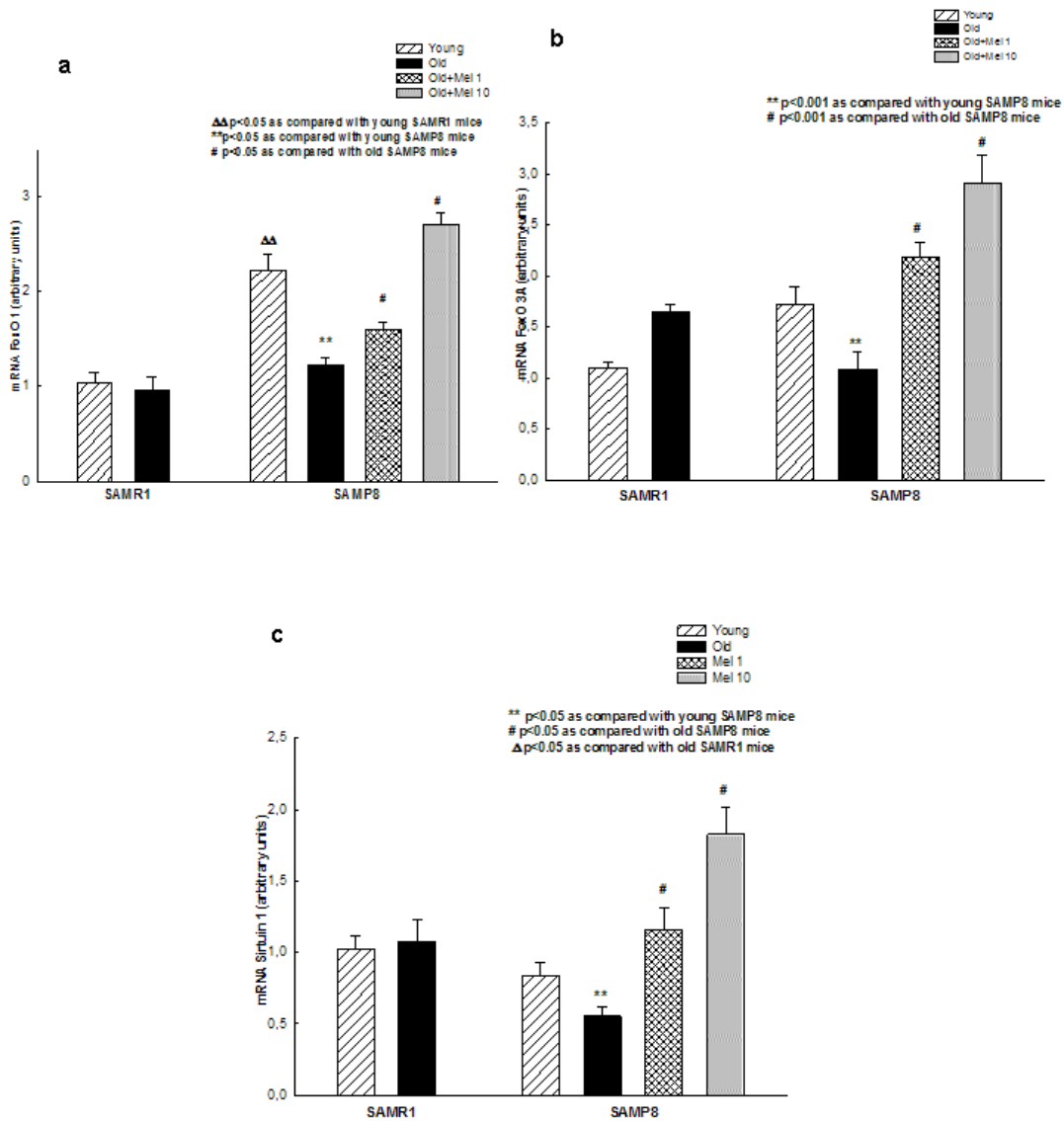
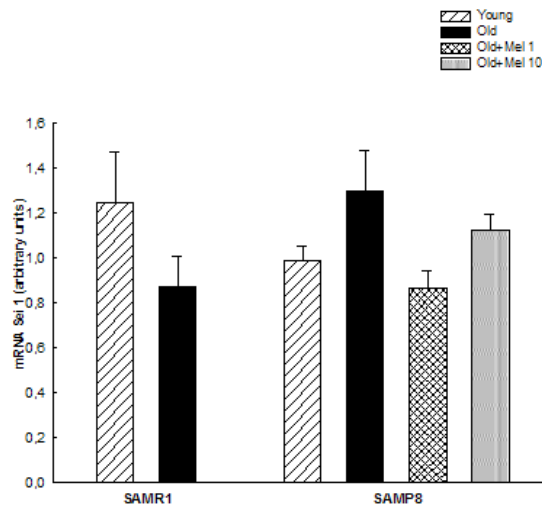


Fig 3. mRNA expression of (a) FoxO1, (b) FoxO 3A and (c) Sirtuin 1 on pancreas of SAMP8 and SAMR1 mice.

Fig 3. Effect of aging and melatonin administration on mRNA expression of (a) FoxO1, (b) FoxO 3A and (c) Sirtuin 1 in pancreas from male SAMP8 and SAMR1 mice. N=8 animals per group.

**Figure 4**  
**a**



**b**

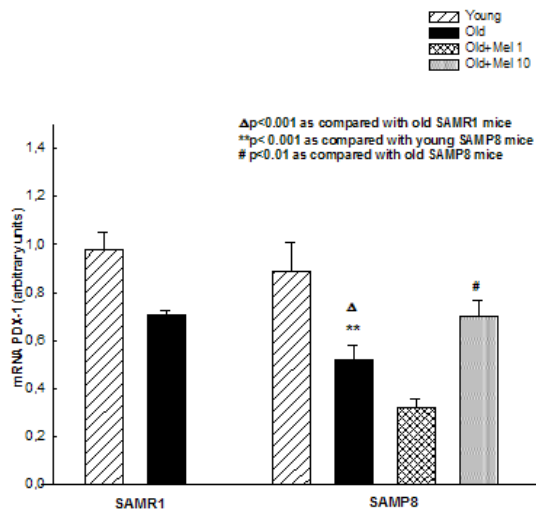


Fig 4. mRNA expression of (a) Sei1 and (b)Pdx-1 on pancreas of SAMP8 and SAMR1 mice.

Fig 4. Effect of aging and melatonin administration on mRNA expression of (a) Sei1 and (b)Pdx-1 in pancreas from male SAMP8 and SAMR1 mice. N=8 animals per group.

Figure 5

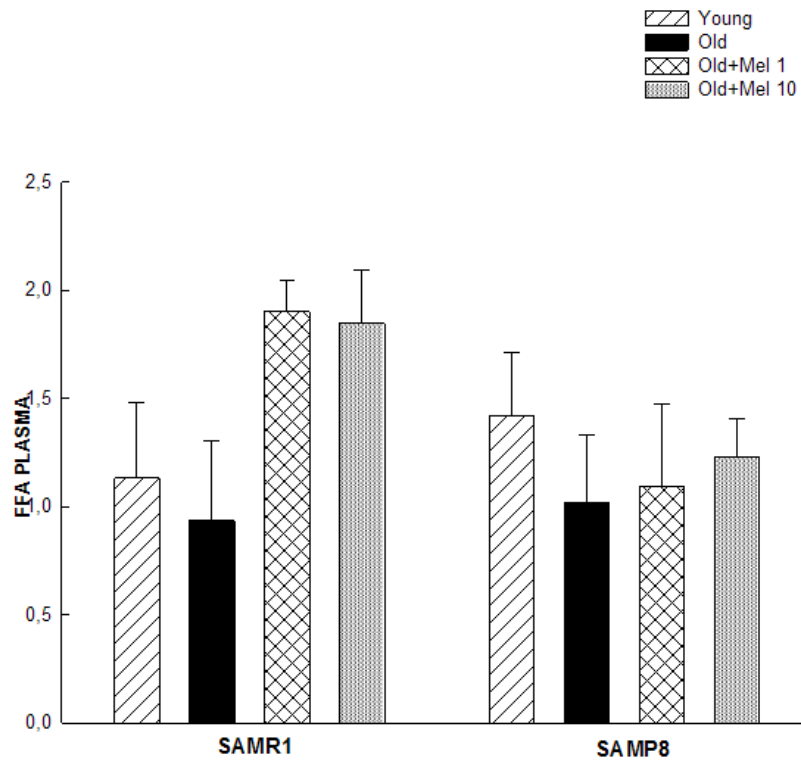


Fig 5. Levels of free fatty acids on plasma of SAMP8 and SAMR1 mice young, old and melatonin treatments

Fig 5. Effect of aging and melatonin administration on levels of free fatty acids in plasma from male SAMP8 and SAMR1 mice. N=8 animals per group.

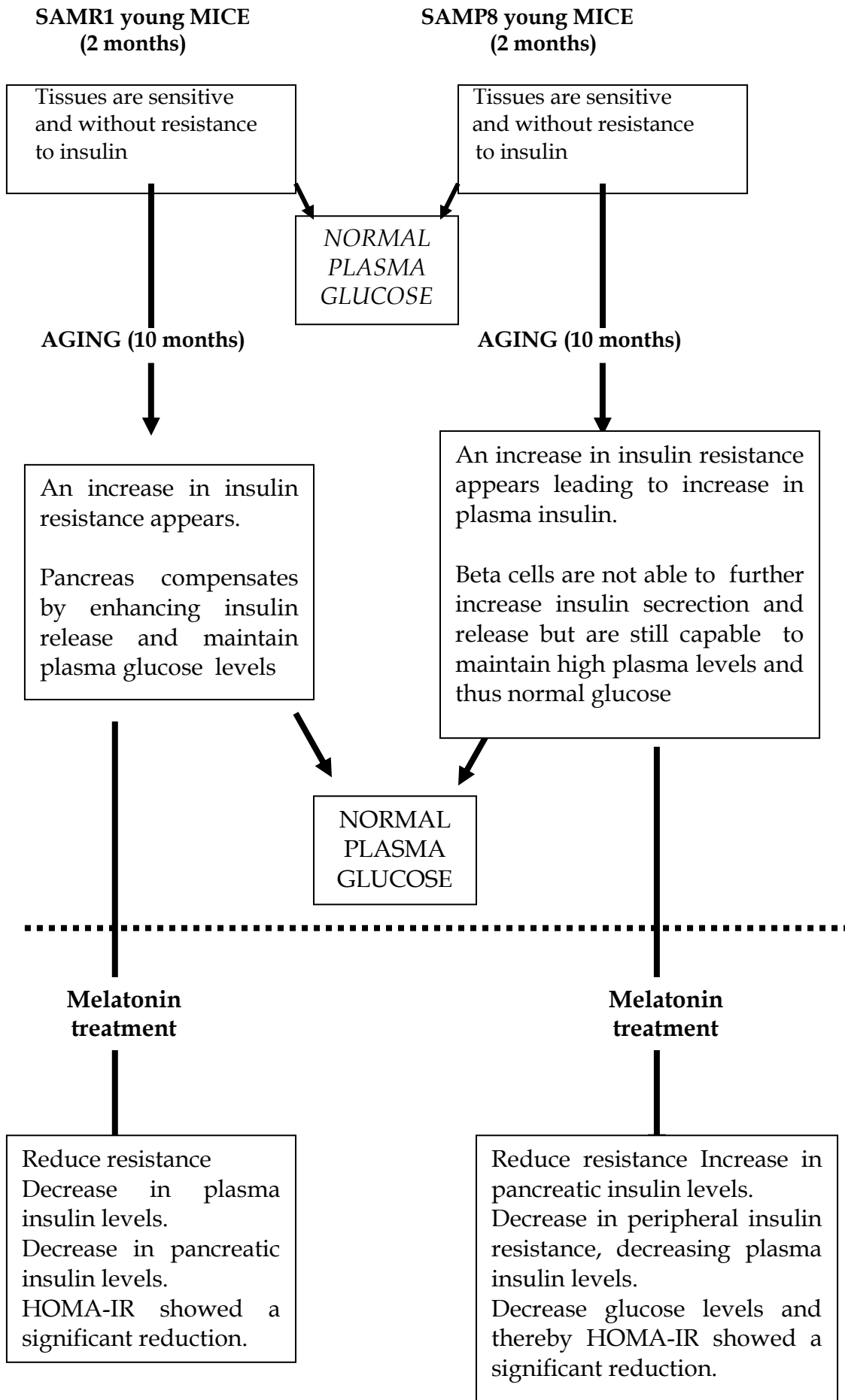


Fig 6. Diagram of two different approaches considered in order to solve the insulin resistance problem in the two different strains of mice.

