

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Departamento de Biología Celular



**CAMBIOS CRONOBIOLOGICOS DE LA ACTIVIDAD  
DEL EJE HIPOTÁLAMO-HIPOFISARIO EN FUNCIÓN  
DE LA EDAD: VARIACIONES EN LA SECRECIÓN  
ADENOHIPOFISARIA**

**MEMORIA PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE  
DOCTOR POR**

María del Pilar Cano Barquilla

Bajo la dirección del Doctor:

Ana Isabel Esquifino Parras

**Madrid, 2002**

**ISBN: 84-669-1682-2**

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

**CAMBIOS CRONOBIOLOGICOS DE LA ACTIVIDAD DEL EJE HIPOTÁLAMO-  
HIPOFISARIO EN FUNCIÓN DE LA EDAD: VARIACIONES EN LA SECRECIÓN  
ADENOHIPOFISARIA.**

M<sup>a</sup> DEL PILAR CANO BARQUIL LA

MADRID 2002

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

**CAMBIOS CRONOBIOLOGICOS DE LA ACTIVIDAD DEL EJE HIPOTÁLAMO-  
HIPOFISARIO EN FUNCIÓN DE LA EDAD: VARIACIONES EN LA SECRECIÓN  
ADENOHIPOFISARIA**

M<sup>a</sup> DEL PILAR CANO BARQUILLA

V<sup>o</sup>B<sup>o</sup> ANA I. ESQUIFINO PARRAS

MADRID 2002

**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III**

**Facultad de Medicina**

**Universidad Complutense**

**Ciudad Universidad**

**28040 Madrid**

**España**

**Fax: 34-1-3941691**

**Teléfono: 34-1-3941678**

**Correo electrónico: [pelayos@med.ucm.es](mailto:pelayos@med.ucm.es)**

Doña ANA ISABEL ESQUIFINO PARRAS, Profesora Titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid,

CERTIFICA:

Que los experimentos contenidos en la presente Memoria titulada “*Cambios cronobiológicos de la actividad del eje hipotálamo-hipofisario en función de la edad: variaciones en la secreción adenohipofisaria*”, presentada por M<sup>a</sup> del Pilar Cano Barquilla para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas, han sido realizados bajo mi dirección en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid, y hallándose concluida autorizo su presentación a fin de que sea juzgada por el tribunal correspondiente.

Y para que conste donde proceda firmo el presente documento en Madrid a 19 Noviembre de 2002.

Prof. Dra. Ana Isabel Esquifino Parras

Directora de la Tesis Doctoral

A mis padres

A Aurelio

## **AGRADECIMIENTOS**

---

*Antes de presentar este trabajo de investigación quiero dar las gracias a todas aquellas personas que han contribuido al desarrollo de esta Tesis Doctoral.*

*En primer lugar, quiero agradecer a la Dra. Ana I. Esquifino Parras, Profesora Titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid, la oportunidad que me ha brindado para conocer y apreciar la investigación durante todos estos años que llevo a su lado, así como el interés y el tiempo invertido en este trabajo de investigación.*

*Al Dr. Daniel P. Cardinali, Catedrático del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires, por la ayuda prestada.*

*Al Dr. Jorge Tamariz Rodríguez y al Dr. Enrique Blánquez Fernández, Catedráticos del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid, así como a todo el personal del departamento.*

*A la Dra. Elena Vara Ameigeiras y Dra Cruz García Martin, Profesoras titulares del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid, así como a la Dra Pilar Álvarez, Profesora Titular de Escuela Universitaria del Departamento de Biología Celular de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid, por su tiempo invertido.*

*También quiero agradecer las enseñanzas y los buenos momentos compartidos a todos los compañeros del laboratorio: Manolo, Patty, David, Gema, Agustín, Fernando, Sara, Vanesa y María. Así, como a Patri, Marta, Carmen, Mar, Tere, Bienve y M<sup>a</sup> Angeles. Todos estos años no los voy a olvidar nunca.*

*A mis amigas, Carmen, Elena, Elena G., María, Chusmi y Raquel, por su amistad.*

*A mis padres; José y Antonia porque me habéis enseñado lo más importante, a mis hermanos; José Antonio y Ana Belén, y a mi sobrino Jaime. Gracias a todos por el inmenso cariño y el apoyo que he recibido a lo largo de mi vida.*

*Y a Aurelio. Gracias por tu paciencia, apoyo y comprensión.*

**ABREVIATURAS**

---



**ACTH:** Hormona adrenocorticotropa.

**Ac:** Anticuerpo.

**Ag:** Antígeno.

**Ag-Ac:** Complejo antígeno-anticuerpo.

**Ag\*-Ac:** Complejo antígeno marcado radiactivamente-anticuerpo.

**ANOVA:** Análisis de la varianza.

**ANUC:** Animalario Central de la Universidad Complutense.

**Bc:** Controles de unión con los puntos de curva.

**BSA:** Albúmina de suero bovino.

**Bo:** Controles de unión máxima.

**°C:** Grados centígrados.

**Ci:** Curio.

**Cols:** Colaboradores.

**Cpm:** Cuentas por minuto.

**DA:** Dopamina.

**D.O.595:** Densidad óptica a 595 nm.

**DOPAC:** Acido dihidroxifenilacético.

**EDTA:** Acido etiléndiamino tetraacético.

**eem:** Error estándar de la media.

**FEP:** Factor estimulador de prolactina.

**FIP:** Factor inhibidor de prolactina.

**FSH:** Hormona folículo estimulante.

**g:** Gramo.

**GABA:** Acido gamma-aminobutírico.

**GH:** Hormona del crecimiento.

**GHRH:** Hormona liberadora de la hormona del crecimiento.

**<sup>3</sup>H:** Tritio.

**HCl:** Acido clorhídrico.

**HPLC:** Cromatografía líquida de alta resolución.

**IGF-1:** Factor de crecimiento 1 como la insulina.

**KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>:** Fosfato monopotásico.

**L:** Litro.

**LH:** Hormona luteinizante.

**M:** Molar.

**MAO:** Enzima monoamina oxidasa.

**mCi:** MiliCurio.

**MeOH:** Metanol.

**mg:** Miligramo.

**mL:** mililitro.

**µg:** Microgramo.

**µL:** Microlitro.

**NA:** Noradrenalina.

**NaCl:** Cloruro de sodio.

**NaHCO<sub>3</sub>:** Bicarbonato sódico.

**NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>:** Fosfato monosódico.

**NaOH:** Hidróxido de sodio.

**Ne:** Controles de unión no específica.

**ng:** Nanogramo.

**NT:** Neurotensina.

**OPA:** O-phytaldialdehido.

**PACAP:** Péptidos activadores de la adenilato ciclasa hipofisaria.

**PBS:** Tampón fosfato salino.

**pg:** Picogramo.

**RIA:** Radioimmunoanálisis.

**rpm:** Revoluciones por minuto.

**SOS:** Octil sulfato sódico.

**SS:** Somatostatina.

**OT:** Oxitocina.

**TH:** Enzima tirosina hidroxilasa.

**TSH:** Hormona estimulante del tiroides.

**TRH:** Hormona secretora de tirotropina.

**UCM:** Universidad Complutense de Madrid.

**VIP:** Péptido intestinal vasoactivo.

**5-HT:** serotonina.

**5-HIAA:** Acido 5-hidroxiindol acético.

**<sup>125</sup>I:** Iodo 125.

**<sup>131</sup>I:** Iodo 131.

**ÍNDICE**

---

AGRADECIMIENTOS

ABREVIATURAS

ÍNDICE

**INTRODUCCIÓN**.....20

**A) RITMOS BIOLÓGICOS**.....21

a.1.- Ritmos biológicos circadianos.....22

*a.1.1.- Regulación de los ritmos circadianos en mamíferos*.....22

*a.1.2.- Ritmos circadianos y envejecimiento*.....24

**B) EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS**.....24

b.1.- La actividad diaria del eje hipotálamo-hipofisario..... 26

b.2.-Envejecimiento y la actividad diaria del eje hipotálamo-hipófisis..... 28

**C) HORMONAS ADENOHIPOFISARIAS: Prolactina y GH**..... 29

c.1.- Prolactina.....29

*c.1.1. – Síntesis y secreción de prolactina: ritmo circadiano*.....30

*c.1.2.- Regulación neuroendocrina de la secreción de prolactina*.....32

*c.1.2.1.- DA*.....33

*c.1.2.2.- GABA*.....35

*c.1.2.3.- Somatostatina*.....36

*c.1.2.4.- Factores estimuladores de la secreción de prolactina*.....36

*c.1.3. – Funciones fisiológicas de prolactina*.....37

*c.1.4.- Prolactina y envejecimiento*.....38

c.2.- <u>GH</u> .....	38
c.2.1.- <i>Síntesis y secreción de GH: ritmo circadiano</i> .....	38
c.2.2.- <i>Regulación neuroendocrina de la secreción de GH</i> .....	39
c.2.2.1.- <i>GHRH</i> .....	40
c.2.2.2.- <i>Somatostatina</i> .....	41
c.2.3.- <i>Funciones fisiológicas de GH</i> .....	43
c.2.4. <i>GH y envejecimiento</i> .....	44
OBJETIVOS Y DISEÑOS EXPERIMENTALES.....	45
MATERIALES Y METODOS.....	50
A) INSTALACIONES.....	51
B) ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.....	51
C) METODOS EXPERIMENTALES.....	52
c.1.- <u>Sacrificio de animales</u> .....	52
c.2.- <u>Recogida de muestras</u> .....	52
D) METODOS ANALÍTICOS.....	52
d.1.- <u>Radioinmunoanálisis</u> .....	52
d.1.1.- <i>Radioinmunoanálisis de prolactina y de GH</i> .....	53
d.1.1.1.- <i>Tampones y reactivos</i> .....	53
d.1.1.2.- <i>Marcaje de la hormona</i> .....	54
d.1.1.3.- <i>Titulación del anticuerpo</i> .....	56
d.1.1.4.- <i>Curva patrón</i> .....	56
d.1.1.5.- <i>Representación gráfica de la curva patrón</i> .....	56
d.1.1.6.- <i>Protocolo de experimentación para PRL y GH</i> .....	57

<i>d.1.2.- Radioinmunoanálisis de somatostatina.....</i>	60
<i>d.1.2.1.- Preparación de las muestras.....</i>	60
<i>d.1.2.2.- Tampones y reactivos.....</i>	61
<i>d.1.2.3.- Marcaje de somatostatina.....</i>	61
<i>d.1.2.4.- Protocolo de experimentación para somatostatina.....</i>	62
<u>d.2.- Determinación de aminas biógenas y melatonina por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), con detector electroquímico.....</u>	63
<i>d.2.1.- Determinación de aminas biógenas.....</i>	63
<i>d.2.1.1.- Preparación de las muestras.....</i>	64
<i>d.2.1.2.- Tampones y reactivos.....</i>	64
<i>d.2.1.3.- Componentes del sistema cromatográfico.....</i>	64
<i>d.2.1.4.- Condiciones de estudio.....</i>	65
<i>d.2.2.- Determinación de melatonina.....</i>	67
<i>d.2.2.1.- Preparación de las muestras.....</i>	67
<i>d.2.2.2.- Tampones y soluciones.....</i>	67
<i>d.2.2.3.- Componentes del sistema cromatográfico.....</i>	67
<i>d.2.2.4.- Condiciones de estudio.....</i>	67
<u>d.3.- Determinación de aminoácidos por HPLC con detección de fluorescencia.....</u>	68
<i>d.3.1.- Preparación de las muestras.....</i>	68
<i>d.3.2.- Tampones y reactivos.....</i>	68
<i>d.3.3.- Componentes del sistema cromatográfico.....</i>	69
<i>d.3.4.- Condiciones de estudio.....</i>	70
<u>d.4.- Cuantificación de proteínas.....</u>	71
<i>d.4.1.- Soluciones.....</i>	72
<i>d.4.2.- Preparación de la recta patrón.....</i>	72
<i>d.4.3.- Ensayo colorimétrico.....</i>	73
<u>d.5.- Análisis estadístico de los datos.....</u>	73

RESULTADOS.....	74
A).ENVEJECIMIENTO EN EL HIPOTÁLAMO, EN LA EMINENCIA MEDIA Y EN LA ADENOHIPÓFISIS.....	75
a.1.- <u>Hipotálamo anterior</u> .....	75
a.1.1.- <i>Patrón diario de concentración de NA en animales jóvenes y envejecidos</i> .....	75
a.1.2.- <i>Patrones diarios de concentración de DA y del índice DOPAC/DA en animales jóvenes y envejecidos</i> .....	76
a.1.3.- <i>Patrones diarios de concentración de 5-HT y del índice 5-HIAA/5-HT en animales jóvenes y envejecidos</i> .....	78
a.1.4.- <i>Patrón diario de concentración de GABA en animales jóvenes y envejecidos</i> .....	80
a.1.5.- <i>Patrón diario de concentración de taurina en animales jóvenes y envejecidos</i> .....	81
a.1.6.- <i>Patrón diario de concentración de somatostatina en animales jóvenes y envejecidos</i> .....	82
a.2.- <u>Hipotálamo mediobasal</u> .....	83
a.2.1.- <i>Patrón diario de concentración de NA en animales jóvenes y envejecidos</i> .....	83
a.2.2.- <i>Patrones diarios de concentración de DA y del índice DOPAC/DA en animales jóvenes y envejecidos</i> .....	84
a.2.3.- <i>Patrones diarios de concentración de 5-HT y del índice 5-HIAA/5HT de animales jóvenes y envejecidos</i> .....	86
a.2.4.- <i>Patrón diario de concentración de GABA en animales jóvenes y envejecidos</i> .....	88
a.2.5.- <i>Patrón diario de concentración de taurina en animales jóvenes y envejecidos</i> .....	89
a.2.6.- <i>Patrón diario de concentración de somatostatina en animales jóvenes y envejecidos</i> .....	90

<a href="#">a.3.- Eminencia media</a> .....	91
<i>a.3.1.- Patrón diario de concentración de NA en animales jóvenes y envejecidos</i> .....	91
<i>a.3.2.- Patrón diario de concentración de DA en animales jóvenes y envejecidos</i> .....	92
<i>a.3.3.- Patrón diario de concentración de 5-HT en animales jóvenes y envejecidos</i> .....	93
<i>a.3.4.- Patrón diario de concentración de GABA en animales jóvenes y envejecidos</i> .....	94
<i>a.3.5.- Patrón diario de concentración de taurina en animales jóvenes y envejecidos</i> .....	95
<i>a.3.6.- Patrón diario de concentración de somatostatina en animales jóvenes y envejecidos</i> .....	96
 <a href="#">a.4.- Adenohipófisis</a> .....	 97
<i>a.4.1.- Patrón diario de concentración de DA en animales jóvenes y envejecidos</i> .....	97
<i>a.4.2.- Patrón diario de concentración de 5-HT en animales jóvenes y envejecidos</i> .....	98
<i>a.4.3.- Patrón diario de concentración de GABA en animales jóvenes y envejecidos</i> .....	99
<i>a.4.4.- Patrón diario de concentración de taurina en animales jóvenes y envejecidos</i> .....	100
<i>a.4.5.- Patrón diario de concentración de somatostatina en animales jóvenes y envejecidos</i> .....	101
 <a href="#">a.5- Niveles circulantes de prolactina, GH y contenido de melatonina en la glándula pineal</a> .....	 102
<i>a.5.1.- Efecto de la edad sobre los niveles circulantes de la prolactina a lo largo del día</i> .....	102



a.5.2.- Efecto de la edad sobre los niveles circulantes de GH a lo largo del día.....	103
a.5.3.- Efecto de la edad sobre el patrón de concentración de melatonina en la glándula pineal a lo largo del día.....	104
<b>B) EFECTO DE LA EDAD SOBRE LOS MECANISMOS DE INTERRELACION ENTRE LOS NEUROMODULADORES ESTUDIADOS, IMPLICADOS EN LA REGULACIÓN DE PROLACTINA.....</b>	<b>105</b>
<b><u>b.1.- Correlaciones entre las variaciones diarias de concentración de DA y el resto de los neuromoduladores estudiados, en la eminencia media.....</u></b>	<b>105</b>
b.1.1.- Correlación entre los patrones diarios de concentración de NA y de DA en animales jóvenes y envejecidos.....	105
b.1.2.- Correlación entre los patrones diarios de concentración de 5-HT y de DA en animales jóvenes y envejecidos.....	106
b.1.3.- Correlación entre los patrones diarios de concentración de GABA y de DA en animales jóvenes y envejecidos.....	107
b.1.4.- Correlación entre los patrones diarios de concentración de taurina y de DA en animales jóvenes y envejecidos.....	108
b.1.5.- Correlación entre los patrones diarios de concentración de somatostatina y de DA en animales jóvenes y envejecidos.....	109
<b><u>b.2.- Relaciones entre los patrones de concentración de los neuromoduladores estudiados en la eminencia media y la adenohipófisis en animales jóvenes y envejecidos. Efecto sobre el ritmo secretor de prolactina.....</u></b>	<b>110</b>
b.2.1.- Correlación entre los patrones de concentración de DA en la eminencia media y en la adenohipófisis. Efecto sobre el ritmo secretor de prolactina.....	110
b.2.2.- Correlación entre los patrones de concentración de 5-HT en la eminencia media y en la adenohipófisis. Efecto sobre el ritmo secretor de prolactina.....	113
b.2.3.- Correlación entre los patrones de concentración de GABA en la eminencia media y en la adenohipófisis. Efecto sobre el ritmo secretor de prolactina.....	116

*b.2.4.- Correlación entre los patrones de concentración de taurina en la eminencia media y en la adenohipófisis. Efecto sobre el ritmo secretor de prolactina.....119*

*b.2.5.- Correlación entre los patrones de concentración de somatostatina en la eminencia media y en la adenohipófisis. Efecto sobre el ritmo secretor de prolactina.....122*

**C) EFECTO DE LA EDAD SOBRE LOS MECANISMOS DE INTERRELACION ENTRE LOS NEUROMODULADORES, ESTUDIADOS, IMPLICADOS EN LA REGULACIÓN DE GH.....125**

**c.1.- Correlaciones entre las variaciones diarias de concentración de somatostatina y el resto de los neuromoduladores estudiados, en el hipotálamo anterior.....125**

*c.1.1.- Correlación entre los patrones diarios de concentración de 5-HT y de somatostatina en animales jóvenes y envejecidos.....125*

*c.1.2.- Correlación entre los patrones diarios de concentración de GABA y de somatostatina en animales jóvenes y envejecidos.....126*

*c.1.3.- Correlación entre los patrones diarios de concentración de taurina y de somatostatina en animales jóvenes y envejecidos.....127*

**c.2.- Correlaciones entre las variaciones diarias de concentración de somatostatina y el resto de los neuromoduladores estudiados, en la eminencia media.....128**

*c.2.1.- Correlación entre los patrones diarios de concentración de NA y de somatostatina en animales jóvenes y envejecidos.....128*

*c.2.2.- Correlación entre los patrones de concentración de 5-HT y de somatostatina en los animales jóvenes y envejecidos.....129*

*c.2.3.- Correlación entre los patrones de concentración de GABA y de somatostatina en los animales jóvenes y envejecidos.....130*

*c.2.4.- Correlación entre los patrones de concentración de taurina y de somatostatina en los animales jóvenes y envejecidos.....131*

**c.3.- Correlaciones entre las variaciones diarias de concentración de NA y de 5-HT, GABA o taurina, en la eminencia media.....132**

<i>c.3.1.- Correlación entre los patrones de concentración de 5-HT y de NA en los animales jóvenes y envejecidos.....</i>	132
<i>c.3.2.- Correlación entre los patrones de concentración de GABA y de NA en los animales jóvenes y envejecidos.....</i>	133
<i>c.3.3.- Correlación entre los patrones de concentración de taurina y de NA en los animales jóvenes y envejecidos.....</i>	134

<u><i>c.4.- Relaciones entre los patrones de concentración de los neuromoduladores estudiados en la eminencia media y la adenohipófisis en animales jóvenes y envejecidos. Efecto sobre el ritmo secretor de GH.....</i></u>	135
--	-----

<i>c.4.1.- Correlación entre los patrones de concentración de somatostatina en la eminencia media y en la adenohipófisis. Efecto sobre el ritmo secretor de GH.....</i>	135
---	-----

<i>c.4.2.- Correlación entre los patrones de concentración de 5-HT en la eminencia media y en la adenohipófisis. Efecto sobre el ritmo secretor de GH.....</i>	138
--	-----

<i>c.4.3.- Correlación entre los patrones de concentración de GABA en la eminencia media y en la adenohipófisis. Efecto sobre el ritmo secretor de GH.....</i>	141
--	-----

<i>c.4.4.- Correlación entre los patrones de concentración de taurina en la eminencia media y en la adenohipófisis. Efecto sobre el ritmo secretor de GH.....</i>	144
---	-----

<u><b>DISCUSIÓN.....</b></u>	147
------------------------------	-----

<u><b>A) EFECTOS DEL ENVEJECIMIENTO EN EL CONTENIDO EN AMINAS BIOGENAS, GABA, TAURINA Y SOMATOSTATINA EN HIPOTÁLAMO, EMINENCIA MEDIA Y ADENOHIPÓFISIS.....</b></u>	148
--	-----

<u><b>a.1.- Hipotálamo anterior.....</b></u>	148
--	-----

<u><b>a.2.- Hipotálamo mediobasal.....</b></u>	152
--	-----

<u><b>a.3.- Eminencia media.....</b></u>	157
--	-----

<u><b>a.4.- Adenohipófisis.....</b></u>	160
---	-----

a.5.- <u>Prolactina, GH y melatonina</u> .....	163
<b>B) EFECTO DE LA EDAD SOBRE LOS PARÁMETROS IMPLICADOS EN LA REGULACIÓN DE PROLACTINA</b> .....	164
b.1.- <u>Correlaciones entre las variaciones diarias de concentración de DA y el resto de los neuromoduladores estudiados, en la eminencia media</u> .....	164
b.2.- <u>Relaciones entre los patrones de concentración de los neuromoduladores estudiados en la eminencia media y la adenohipófisis en animales jóvenes y envejecidos. Efecto sobre el ritmo secretor de prolactina</u> .....	167
<b>C) EFECTO DE LA EDAD SOBRE LOS PARÁMETROS IMPLICADOS EN LA REGULACIÓN DE GH</b> .....	170
c.1.- <u>Correlaciones entre las variaciones diarias de concentración de somatostatina y el resto de los neuromoduladores estudiados, en el hipotálamo anterior y en la eminencia media</u> .....	170
c.2.- <u>Relaciones entre los patrones de concentración de los neuromoduladores estudiados en la eminencia media y la adenohipófisis en animales jóvenes y envejecidos. Efecto sobre el ritmo secretor de GH</u> .....	171
<b>CONCLUSIONES</b> .....	174
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	176

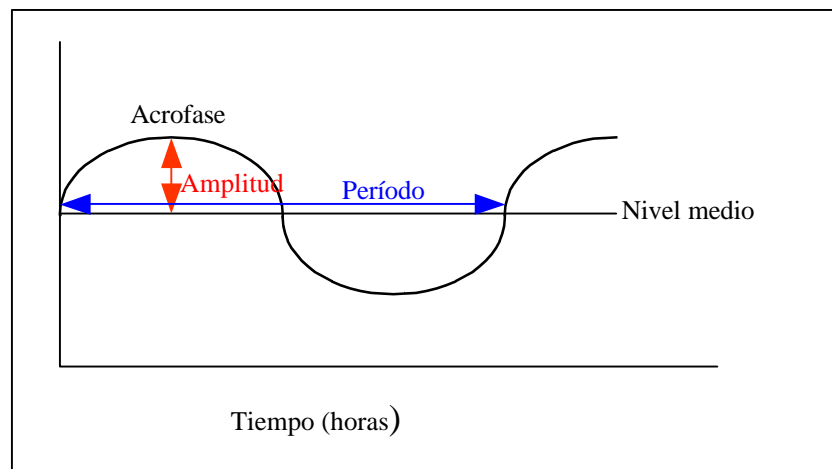
## **INTRODUCCIÓN**

---

## A) RITMOS BIOLÓGICOS

En condiciones naturales, la mayoría de los procesos bioquímicos, fisiológicos y conductuales muestran cambios temporales periódicos, que generalmente se adaptan a la duración de determinados ritmos geofísicos, como el movimiento de rotación y de traslación de la tierra. Este fenómeno se ha descrito en todos los seres vivos, y en todos los niveles de organización (*Cardinali y cols, 1994*). A la oscilación regular de una variable biológica se la denomina ritmo biológico, y tiene carácter hereditario (*García Fernández, 1998*). Cualquier ritmo biológico debe ser analizado mediante medidas de una variable a intervalos de tiempo lo suficientemente cortos como para que permita describir su periodo. En general a un ritmo fisiológico se suele ajustar una función cosenoidal (*Cardinali y cols, 1994; Cardinali y cols, 1998a; Cardinali y cols, 1998b; Cardinali y Golombek, 1998; García-Bonacho y cols, 2001*); que nos permite definir:

- ❖ **Periodo:** definido como el intervalo de tiempo entre dos acontecimientos idénticos.
- ❖ **Valor medio o mesor:** es la media aritmética de todos los valores obtenidos de una variable, calculada a lo largo de un periodo completo o ciclo.
- ❖ **Amplitud:** diferencia entre el mesor y el valor máximo o mínimo alcanzado por la variable durante el periodo.



**Figura 1.-** Parámetros que definen un ritmo.

- ❖ Fase: estado de una variable biológica en un momento dado del ciclo. Para caracterizar la fase, lo más habitual es determinar la hora del día en la que la variable estudiada alcanza su valor máximo a lo largo del ciclo (acrofase).

### **a.1.- Ritmos biológicos circadianos**

Cuando un ritmo biológico presenta oscilaciones repetitivas lo largo de un periodo de aproximadamente 24 horas, se dice que es un ritmo circadiano (*Takahashi, 1995*). Es importante resaltar que el ritmo circadiano endógeno se conserva aunque el individuo de estudio se mantenga en condiciones experimentales constantes (*Esquifino y cols, 1999b; Esquifino y cols, 1999c; Pazo, 2002*).

A lo largo de toda la escala filogenética, se encuentran ejemplos de ritmos biológicos, como la tasa de crecimiento en organismos unicelulares (*Sanviens, 1989; Moore, 1999*) o los procesos de muda y de migración en vertebrados (*Tellería, 1987*), entre otros. Los datos relativos a mamíferos refuerzan la idea de que los ritmos circadianos se hallan presentes en múltiples actividades fisiológicas. Así, tanto el sistema nervioso central como el periférico (*Cardinali y cols, 1996a; Cardinali y cols, 1996b; Cardinali y cols, 1998a; Cardinali y cols, 1998b*), el endocrinológico (*Casanueva y cols, 1984; Cai y Wise, 1996; Selgas y cols, 1998; Esquifino y cols, 1999a; Esquifino y cols, 1999b; García-Bonacho y cols, 2000; Cano y cols, 2001*) y el inmunitario (*Ratajczak y cols, 1992; Bourin y cols, 1993; Esquifino y cols, 1996; Cardinali y cols, 1998a; Cardinali y cols, 1998b; Castrillón y cols, 2000; Labunet's, 2001*) muestran variaciones diarias.

#### ***a.1.1.- Regulación de los ritmos circadianos en mamíferos***

Los ritmos circadianos se generan y se regulan en estructuras específicas del sistema nervioso central que constituyen “el reloj endógeno”, que se encuentran en los núcleos supraquiasmáticos, situados en el hipotálamo anterior (*Aschoff, 1960, Pittendrigh, 1960; Schweiger y cols, 1986; Minors y Waterhouse, 1986; Cardinali y cols, 1992*). Las neuronas de estos núcleos responden a variaciones periódicas del medio externo, así como a señales endógenas. La principal señal endógena es la melatonina, hormona secretada por la

glándula pineal (*Reiter, 1983*). Así pues los núcleos supraquiasmáticos actúan como un centro regulador capaz de proporcionar una respuesta anticipada del organismo, frente a cambios periódicos de variables ambientales, con la máxima eficacia y mínimo gasto de energía. Esto proporciona al organismo un mecanismo de homeostasis predictiva (*Kandel, 1997; Cardinali, 1999*).

El reloj endógeno está formado por (*Ibata y cols, 1999*):

❖ Estructuras marcapasos: encargadas de generar la señal circadiana.

En el caso de los roedores (animales objeto de este estudio), los núcleos supraquiasmáticos hipotalámicos son las estructuras encargadas de generar y regular los ritmos biológicos (*Schwartz y Gainer, 1977; Inouye y Kawamura, 1979*). Se trata de dos núcleos simétricos situados en la parte anterior del hipotálamo, a ambos lados de las paredes inferiores del tercer ventrículo y dorsalmente al quiasma óptico. En cada núcleo se distinguen dos zonas: la dorsomedial, que recibe información visual fundamentalmente, a través del haz retino-hipotalámico, y la ventrolateral, a donde llega información procedente de áreas cerebrales y/o periféricas (*Van deer Pool y Tsujimoto, 1985*).

❖ Vías aferentes: La vía aferente más importante que alcanza los núcleos supraquiasmáticos procede de la retina y constituye el tracto retino-hipotalámico. Gracias a ellas los núcleos supraquiasmáticos reciben información directa sobre cambios en el fotoperiodo externo. Además, a los núcleos supraquiasmáticos llegan también otras aferencias procedentes de otras regiones del Sistema Nervioso Central.

❖ Vías eferentes: Formadas por proyecciones neuronales que salen desde los núcleos supraquiasmáticos. Se dirigen fundamentalmente hacia tres zonas del hipotálamo: Núcleo paraventricular, posible responsable de la generación de ritmos endocrinológicos y de funciones del sistema nervioso autónomo; área preóptica, involucrada en la regulación de la temperatura y conducta sexual; y área retroquiasmática, que es zona de relevo. Esta última permite enviar información procedente de los núcleos supraquiasmáticos hacia los hemisferios cerebrales, donde se produce la integración neocortical y se regula la conducta. Asimismo,



emite proyecciones al tronco cerebral, encargado de la regulación de las funciones vegetativas, y finalmente, a la médula espinal desde donde se regulan funciones sensoriales y motoras periféricas. Además, desde el ganglio cervical superior se envían proyecciones hacia la glándula pineal, encargada de la medida del fotoperiodo a través de la secreción de una hormona cronobiótica: “la melatonina”.

La ciencia que se encarga de estudiar los ritmos circadianos y su sistema de regulación se denomina cronobiología.

### ***a.1.2.- Ritmos circadianos y envejecimiento***

En 1974, Pittendrigh y Daan describieron por primera vez alteraciones diversas en los ritmos biológicos, asociadas al envejecimiento. Desde entonces, datos cada vez más numerosos indican que durante el envejecimiento los ritmos circadianos cambian su amplitud, su periodo. Además, se desincronizan de las señales procedentes del medio ambiente externo o del medio interno del organismo (*García-Bonacho y cols, 2000; Kolker y Turek, 2001; Cano y cols, 2001*). Por otra parte, la actividad de las vías aferentes y eferentes del reloj endógeno se alteran en el envejecimiento, con el consiguiente deterioro de las funciones fisiológicas circadianas (*Kolker y Turek, 2001*).

## **B) EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS**

El sistema nervioso central recibe la información del medio externo e interno, y elaboran respuestas motoras y neuroendocrinas. El eje hipotálamo-hipófisis es el encargado de llevar a cabo la respuesta endocrinológica.

El hipotálamo modula un gran número de funciones (*Cardinali, 2001*) como son la temperatura, el hambre, la saciedad, la sed, la actividad sexual, la conducta afectiva (emociones) o la actividad del sistema nervioso autónomo (*Diamond y cols, 1996*). Además, algunos núcleos situados en las zonas anterior y mediobasal del hipotálamo forman el área hipofisotropa hipotalámica, encargada de regular la secreción hormonal hipofisaria (*Krey y cols, 1975; Bulter y cols, 1975*).

Para su estudio, el hipotálamo se puede dividir en tres partes que se denominan hipotálamo anterior, mediobasal y posterior. De esta forma se pueden analizar grupos de núcleos:

- ❖ En el hipotálamo anterior quedarían los núcleos paraventricular, supraóptico, supraquiasmáticos, y el núcleo hipotalámico anterior.
- ❖ En el hipotálamo mediobasal o tuberal, se encuentran el núcleo arcuato y los núcleos ventro y dorsomedial. Sus neuronas se proyectan, fundamentalmente, hacia los capilares situados en la eminencia media (*Diamond y cols, 1996*).
- ❖ Finalmente, en el hipotálamo posterior o mamilar estarían los núcleos premamilar dorsal y ventral, mamilares medial y posterior, y el área hipotalámica posterior (*Clark y cols, 1938; Donovan, 1977*).

La hipófisis se encuentra en la silla turca del esfenóide y conecta con el hipotálamo a través del tallo hipofisario. Recibe influencias neuroreguladoras hipotalámicas que modulan la secreción de hormonas de naturaleza proteica (*Guyton, 1988a*). Entre ellas, las mejor conocidas son la hormona del crecimiento (GH), la adrenocorticotropina (ACTH), la tirotrópina (TSH), la hormona folículo-estimulante (FSH), la hormona luteinizante (LH), la hormona melanófora (MSH) y la prolactina. Todas ellas, excepto la GH y la prolactina, actúan principalmente en glándulas periféricas específicas (*Dumont, 1971; Field, 1978; Schally y cols, 1973; Sakuri y cols, 1988; Ben-Jonathan y cols, 1989; Devesa, 1990; Arce y cols, 1997*). Sin embargo, en la actualidad se sabe que la hipófisis produce otras proteínas como la interleukina-6 (*Spangelo y cols, 1990; Arzt y Stalla, 1996*), que también es secretada por células del sistema inmunológico (*Watanabe y cols, 1995*), y podría formar parte de las interacciones bidireccionales entre el sistema inmunitario y el sistema neuroendocrinológico (*Spangelo y Gorospe, 1995; Gaillard, 1998*). Histológicamente y embrionariamente la hipófisis se compone de dos zonas:

- ❖ La adenohipófisis, encargada principalmente de sintetizar y secretar las hormonas anteriormente mencionadas. Se divide en pars distalis, pars tuberalis y pars intermedia. Las dos primeras constituyen el llamado lóbulo anterior.

- ❖ La neurohipófisis, donde se produce la secreción de las hormonas oxitocina y vasopresina, encargadas principalmente de regular la contracción del músculo liso y la presión sanguínea respectivamente. Se divide en pars nervosa y pars infundibularis. Ambas zonas constituyen el llamado lóbulo posterior de la hipófisis (*Pérez-Méndez, 1992; Guyton, 1988b*).

Es importante resaltar que las diferentes zonas adenohipofisarias producen precursores proteicos iguales y que las diferencias se establecen al metabolizarlos de forma específica. Así, por ejemplo a partir de la pro-opiomelanocortina se produce tanto ACTH, como péptidos opioides (*ver revisión en Tresguerres, 2000*).

Las fibras nerviosas procedentes de la mayoría de los núcleos hipotalámicos terminan en los espacios pericapilares de la zona externa de la eminencia media, donde los diferentes neuromoduladores hipotalámicos son secretados en respuesta a estímulos fisiológicos y/o patológicos, hacia el sistema porta hipofisario. Así, el hipotálamo y la hipófisis se comunican a través de este sistema, que recorre el tallo hipofisario hasta llegar al lóbulo anterior (*Popa y Fielding, 1930a; Popa y Fielding, 1930b*). La dirección de la sangre en este sistema portal hipotálamo-hipofisario es de hipotálamo a hipófisis (*Green y Harris, 1947*), aunque, más recientemente se ha demostrado la existencia de un flujo bidireccional (*Spangelo y Gorospe, 1995; Gaillard, 1998*), probablemente relacionado con los mecanismos de regulación ultracortos ejercidos por las hormonas hipofisarias sobre la eminencia media (*Takahama y cols, 1980*). Además, fibras nerviosas procedentes de los núcleos paraventricular y supraóptico alcanzan la eminencia media y forman el tracto hipotálamo-hipofisario, que acaban y constituyen la neurohipófisis.

### **b.1.- La actividad diaria del eje hipotálamo-hipofisario**

El eje hipotálamo-hipofisario muestra variaciones diarias en la actividad de los neuromoduladores hipotalámicos, así como en los niveles circulantes de las hormonas hipofisarias (*Casanueva y cols, 1984; Koulu y cols, 1989; Mai y cols, 1994; Selgas y cols, 1998; Pazo y cols, 2000; García-Bonacho, 2000; Gore y cols, 2000; Arutjungan y cols, 2001*). Estas variaciones circadianas permiten al individuo adaptarse a los cambios cíclicos del medio ambiente.

En el hipotálamo y en la eminencia media, la actividad de las aminas biógenas varía a lo largo del día. Así, se han descrito patrones diarios en el contenido de noradrenalina (NA), dopamina (DA) o de su metabolito, el ácido dihidroxifenilacético (DOPAC), en el hipotálamo completo (*Shioiri y cols, 1991*), en áreas hipotalámicas específicas (*Timmernam y cols, 1995; Selgas y cols, 1997; Selgas y cols, 1998; Pazo y cols, 2000; Lafuente y cols, 2002*) o en núcleos hipotalámicos concretos (*Shioiri y cols, 1991; Cagampang y cols, 1994; Arutjunyan y cols, 2001*). Asimismo, se han descrito patrones diarios en el contenido de estos compuestos en eminencia media (*Koulu y cols, 1989; Shieh y cols, 1997; Arutjunyan y cols, 2001*). Igualmente se conocen variaciones diarias en el contenido de serotonina (5-HT) (*Rozsahegyi y cols, 1973; Hery y cols, 1982; Koulu y cols, 1989; Shioiri y cols, 1991; Poncet y cols, 1999; Lafuente y cols, 2002*), en la concentración de su metabolito de degradación, el ácido 5-hidroxiindol acético (5-HIAA) (*Poncet y cols, 1999; Arujunyang y cols, 2001*) y en su metabolismo, medido como el índice 5-HIAA/5-HT (*Selgas y cols, 1997; Selgas y cols, 1998; Pazo y cols, 2000; Castrillón y cols, 2001*).

Por otro lado, no sólo la actividad de las aminas biógenas varía a lo largo del día en el hipotálamo y en la eminencia media, sino que también se han descrito cambios diarios en el contenido en aminoácidos neurotransmisores. La literatura muestra que la concentración de GABA varía a lo largo del día en el hipotálamo completo (*Cattaberi y cols, 1978*), en áreas hipotalámicas (*Duvilanski y cols, 1998; Duvilanski y cols, 2002*), en núcleos hipotalámicos específicos (*Aguilar-Robledo y cols, 1993*) y en eminencia media (*Casanueva y cols, 1984; Duvilanski y cols, 2002*). Igualmente, el contenido de taurina varía a lo largo del día en áreas hipotalámicas específicas (*Duvilanski y cols, 1998; Duvilanski y cols, 2002*). Por último, ciertos neuropéptidos hipotalámicos como la somatostatina muestran variaciones diarias en el hipotálamo (*Berelowitz y cols, 1982a; Nicholson y cols, 1983; Gardi y cols, 1999*), en áreas hipotalámicas y en la eminencia media (*Esquifino y cols, 1999a*).

Todo ello indica que las moléculas hipotalámicas que forman parte del mecanismo regulador de la actividad diaria del eje hipotálamo-hipófisis muestran una organización temporal determinada.

## **b.2.-Envejecimiento y la actividad diaria del eje hipotálamo-hipófisis**

La actividad diaria del eje hipotálamo-hipofisario cambia con la edad. Estas alteraciones pueden llegar a producir patologías diversas.

Durante el envejecimiento se ha descrito una disminución de la enzima hipotalámica, tirosina hidroxilasa (TH), enzima clave en la ruta biosintética de catecolaminas (NA, DA y adrenalina), junto con un incremento de la enzima monoamina oxidasa (MAO), involucrada en la ruta de degradación de estas catecolaminas (*Meites, 1991*). Estos cambios podrían modificar la concentración de sus productos en las regiones del cerebro donde varía la actividad catalítica de estas enzimas. En relación con este hecho se ha descrito que, en el hipotálamo, la concentración de NA basal (medida en un único punto) disminuye con la edad (*Simpkins y cols, 1977; Meites, 1982; Rodríguez-Gómez y cols, 1995*), mientras que no se modifica su contenido en la eminencia media (*Rodríguez-Gómez y cols, 1995*). Sin embargo, la concentración basal de DA y de DOPAC disminuye tanto en el hipotálamo como en la eminencia media (*Simpkins y cols, 1977; Demarest y cols, 1980; Simpkins, 1984; Raymond y cols, 1984*). Además, se han descrito alteraciones morfológicas con la edad en el sistema tuberoinfundibular dopaminérgico, que llevan a una disminución basal de la concentración de DA y de DOPAC en la eminencia media (*Demarest y cols, 1980; Simpkins, 1984*) y de la secreción de DA a los vasos porta-hipofisarios (*Gudelsky y cols, 1980*). Paradójicamente, en la adenohipófisis, el contenido basal en DA en las células lactotropas aumenta durante el envejecimiento (*Demarest y cols, 1985*), lo cual no se correlaciona con el incremento de los niveles circulantes de prolactina, si tenemos en cuenta su papel inhibitor (*Meites y cols, 1978; Demarest y cols, 1985; García-Bonacho y cols, 2000*).

El contenido en 5-HT en el hipotálamo disminuye (*Gozlan y cols, 1990*) o no se modifica (*Simpkins y cols, 1977; Simpkins, 1984*), según estudios puntuales. Asimismo, se han descrito efectos discrepantes en la capacidad de recaptación de 5-HT durante el envejecimiento, donde se observa que disminuye o no cambia (*Brunello y cols, 1988; Pradhan, 1980*). Paralelamente, se han observado cambios morfológicos en las neuronas 5-HTérgicas, durante el envejecimiento en el hipotálamo y en la eminencia media, que podría explicar un aumento en su metabolismo (*Gozlan y cols, 1990; Rodríguez-Gómez, 1995*) para compensar la pérdida de neuronas.

Además, se ha observado que los aminoácidos también se modifican durante el envejecimiento. La actividad basal del sistema GABAérgico cambia de forma específica según el área hipotalámica estudiada (*Jarry y cols, 1999*). Paralelamente se han descrito resultados controvertidos sobre cambios en el porcentaje de receptores neuronales para el GABA con la edad. Hay autores que describen que el porcentaje de receptores, puede aumentar (*Hadjiivanova y cols, 1992*) o disminuir (*Govoni y cols, 1980*). Además, se han realizado estudios puntuales donde se ha observado que la concentración basal de GABA disminuye, aumenta o no varía con la edad, según el núcleo hipotalámico estudiado (*Banay-Schwartz y cols, 1989a*). Igualmente se describen cambios diferenciales en el contenido en taurina durante el envejecimiento (*Banay-Schwartz y cols, 1989b*).

Finalmente, datos de la literatura muestran que los neuropéptidos pueden modificarse con la edad. En el hipotálamo, hay una disminución de la expresión del gen precursor de somatostatina, mientras que la secreción y la actividad de este neuropéptido aumentan durante el envejecimiento (*Müller y cols, 1995*). Sin embargo, los resultados sobre el contenido en somatostatina con la edad son controvertidos, con aumentos (*Forman y cols, 1985*) y/o disminuciones (*Sonntag y cols, 1980; Wang y cols, 1993*). Podría ser que estas diferencias quedasen explicadas cuando se lleven a cabo estudios cronobiológicos y circaestacionales, como ha ocurrido para algunas hormonas hipofisarias (*Esquifino y cols, 1999c*).

Estas modificaciones de los ritmos diarios de la actividad del eje hipotálamo hipofisario durante el envejecimiento, podrían explicar cambios descritos en la secreción de algunas hormonas hipofisarias como son la disminución de los niveles circulantes de la GH y el aumento de prolactina (*Simpkins y cols, 1977; García-Bonacho y cols, 2000*).

## **C) HORMONAS ADENOHIPOFISARIAS: Prolactina y GH.**

### **c.1.- Prolactina**

La prolactina es una hormona polipeptídica constituida por 199 aminoácidos, con un peso molecular de 24.000 Daltons aproximadamente. Está codificada por un gen ancestral,

el cual, a lo largo del tiempo ha sufrido mutaciones diversas que condujeron a la aparición de otros genes diferentes, aunque estructuralmente relacionados, en lo que se denomina, evolución divergente, que codifican para hormonas diferentes. Es el caso de los genes que codifican para prolactina, para GH y para el lactógeno placentario. A este grupo de hormonas se las denomina hormonas lactogénicas.

### ***c.1.1. – Síntesis y secreción de prolactina: ritmos circadiano***

La síntesis y secreción de la prolactina se produce fundamentalmente en la glándula hipofisaria (*Herlant, 1964*), aunque también se sintetiza en el cerebro (*Emanuele y cols, 1987*), en las células epiteliales de la glándula mamaria (*Lkholder y cols, 1996*), en células del sistema inmunitario (*Gala y Shevach, 1994*) y en otros tejidos periféricos como la próstata donde juega un papel fundamental en el desarrollo de tumores (*Nevalainen y cols, 1997*). La hipótesis de trabajo más actual sobre este tema mantiene que la prolactina se produce en todos los tejidos periféricos. Esta prolactina periférica constituiría un circuito local específico, que sería fundamental en la regulación de la renovación celular y que debería estar en equilibrio con la prolactina circulante, procedente de la secreción central.

En la hipófisis, la síntesis y secreción de prolactina se produce en las células mamotropas o lactotropas de la adenohipófisis. Se trata de células eosinófilas, que suponen entre un 20 y un 50% de la población celular hipofisaria dependiendo del sexo y el estado fisiológico del individuo. Se localizan básicamente en la zona lateroventral y central de la pars distalis (*Nakane, 1970; Tougard y Tixier-Vidal, 1994*), formando una banda adyacente al lóbulo intermedio de la hipófisis (*Nakane, 1970*). La población de estas células no es homogénea ni en su morfología, ni en su distribución ni tampoco en su función (*Freeman y cols, 2000*). Se pueden clasificar según su forma celular (*De Paul y cols, 1997*), el tamaño y contenido de sus gránulos secretores (*Snyder y cols, 1976*) o la concentración de prolactina y de su ARNm (*Velkeniers y cols, 1988*). Las células situadas en la zona externa del lóbulo anterior son más sensibles a la hormona secretora de tirotrópina (TRH) (*Boockfor y Frawley, 1987*). Mientras que las células situadas en la zona interna del lóbulo anterior de la hipófisis serían más sensibles a DA (*Arita y cols, 1991*).

La síntesis de prolactina se produce en el retículo endoplasmático rugoso de las células lactotropas. Posteriormente, se transfiere al aparato Golgi, donde se termina su síntesis y se empaqueta para su secreción. Los gránulos secretores migran hacia la periferia celular donde quedan almacenados hasta la llegada del estímulo apropiado. Finalmente, la prolactina se secreta por exocitosis y alcanza la circulación sanguínea, quien la reparte a todo el organismo.

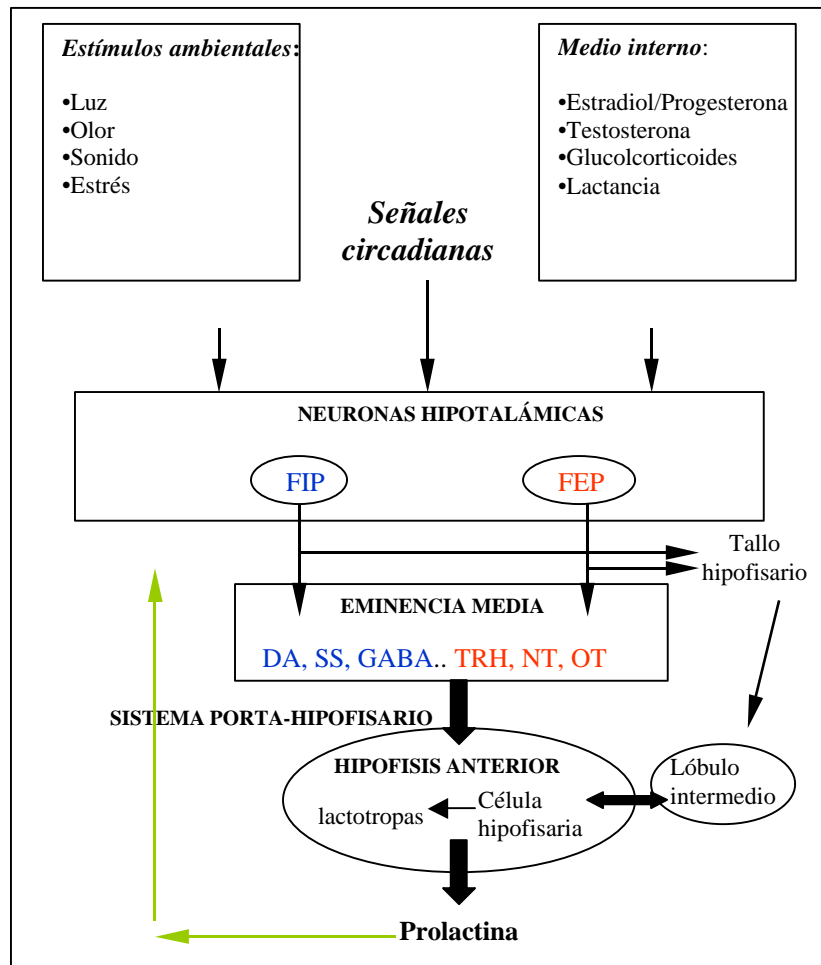
Las células secretoras de prolactina muestran un patrón endógeno de secreción pulsátil característico (*López y cols, 1989; Lafuente y cols, 1993; Lafuente y cols, 1994*), que se refleja en cambios bruscos de los niveles circulantes de la hormona. Esta característica es una propiedad específica e inherente ya que permanece incluso cuando las células se mantienen *in vitro* (*Shin y Reifel, 1981*). Además, a estos cambios bruscos secretores se les superpone una secreción circadiana específica de prolactina (*Kizer y cols, 1975; Esquifino y cols, 1997; García-Bonacho y cols, 2000; Castrillón y cols, 2001*). Esta organización circadiana de la secreción de prolactina se mantiene en condiciones ambientales constantes, y se pierde cuando se lesionan los núcleos supraquiasmáticos (*Bethea y Nelly, 1979; Bethea y Nelly, 1980*). Es importante resaltar que cada vez más datos apuntan que este patrón se modifica siguiendo una variación estacional (*Isakov y cols, 1986; Chang y cols, 1999; Esquifino y cols, 1999c*), lo cual podría formar parte del mecanismo estacional de reproducción que aparece en los mamíferos en libertad (*Ben-Jonathan y cols, 1989; Dutt y cols, 1994; Freeman y cols, 2000*). Estos patrones circadianos y circaestacionales están codificados genéticamente, ya que en animales sometidos a un fotoperiodo y condiciones de vida constantes se mantienen estas variaciones estacionales (*Cohen y Mann, 1979; Wong y cols, 1983; Esquifino y cols, 1999c*). En mamíferos superiores se produce, además, un pico secretor asociado al sueño independientemente del horario en el que el sujeto se duerma (*Parker y cols, 1974; Frantz, 1979*), y que estaría superpuesto siempre a su secreción circadiana o pulsátil. Esta secreción asociada al sueño podría estar relacionada con la secreción de GH y la de melatonina, y formaría parte del mecanismo homeostático reparador que se produce en esta etapa (*Copinschi y Van Cauter, 1995; Luboshitzky, 2000*). El ritmo circadiano de prolactina se modifica en situaciones de estrés, durante la gestación y la lactancia, así como en situaciones patológicas tales como el desarrollo de tumores productores de prolactina (*Noel y cols, 1974; Tolis, 1977*).



### ***c.1.2.- Regulación neuroendocrina de la secreción de prolactina***

La regulación de la secreción de prolactina se produce a través de un mecanismo muy complejo, en el que intervienen un número importante de factores hipotalámicos (*Lu y Meites, 1973; Chen y Meites, 1975; Kato y cols, 1976; Bataille y cols, 1979; Vijayan y McCann, 1979; Yen y cols, 1980; Ben-Jonathan, 1985; Nidolics y cols, 1985; Loeffler y cols, 1986*) como extra hipotalámicos (*Chen y Meites, 1979; Stelle y cols, 1980; Tresguerres y cols, 1981a; Tresguerres y cols, 1981b; Babu y Vijayan, 1983; Grossmann y Rees, 1983; Esquifino y cols, 1989a; Wiersma y Kastelijn, 1990*), y ambientales (*Steger y cols, 1982*). Este mecanismo se observa esquemáticamente en la figura 2.

La prolactina se caracteriza por depender de una regulación hipotalámica fundamentalmente inhibitoria, en la que el componente mejor conocido es la DA sintetizada en el sistema tuberoinfundibular dopaminérgico del núcleo arcuato del hipotálamo (*Leong y cols, 1983*). Además, existen evidencias que apuntan que el GABA sería otro componente hipotalámico inhibitorio de la secreción de esta hormona (*Apud y cols, 1984; Apud y cols, 1989*). Se conoce que en la regulación participan también factores estimuladores como la hormona secretora de tirotropina (TRH) (*Eskay y cols, 1975; Kawano y Daikoku, 1987*) sintetizada por las neuronas parvocelulares del núcleo paraventricular del hipotálamo (*Schally y cols, 1966*). Todos estos neuromoduladores deberían seguir un patrón diario de concentración que permita explicar el ritmo circadiano de la prolactina circulante. De hecho, se ha demostrado que los patrones diarios de concentración de DA y GABA en el hipotálamo y en eminencia media se adaptan a ese ritmo secretor de la hormona (*Casnueva y cols, 1984; Koulu y cols, 1989; Shieh y cols, 1997; Duvilanski y cols, 1998*). Igualmente, otros neuromoduladores siguen patrones diarios tanto en hipotálamo (*Berelowitz y cols, 1982a; Selgas y cols, 1998*), en eminencia media (*Duvilanski y cols, 1998; Arutjunyan y cols, 2001*) y en la adenohipófisis (*Cano y cols, 2001*). Todos ellos se podrían sincronizar, a través del VIP proveniente de los núcleos supraquiasmáticos para conformar el ritmo secretor de prolactina, y tendrían un papel específico no bien establecido en la actualidad con efectos tanto a nivel hipotalámico como adenohipofisario (*Freeman y cols, 2000*).



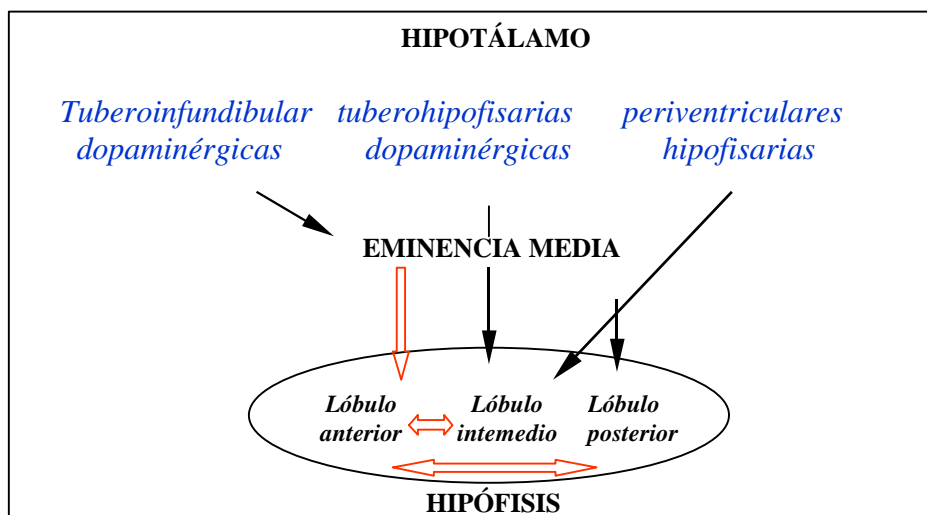
**Figura 2.-** Los niveles circulantes de prolactina muestran un patrón pulsátil y circadiano regulado por factores hipotálamicos inhibidores (FIP) como la DA, somatostatina (SS) y el GABA, ó estimuladores (FEP) como TRH, oxitocina (OT) o neurotensina (NT). La secreción de estos factores se produce en la eminencia media y/o en el lóbulo intermedio, desde donde se dirigen hacia las células lactotropas. Además, la actividad de las células lactotropas puede estar modulada por factores inhibidores o estimuladores secretados por células próximas (regulación paracrina) o por las propias células lactotropas (regulación autocrina) de la adenohipófisis.

### c.1.2.1.- DA

Como ya se ha mencionado, la DA es el factor hipotálamico inhibitorio más importante del mecanismo regulador de la secreción de prolactina (*MacLeod, 1969; MacLeod y cols, 1970*). Actualmente se conocen tres sistemas dopaminérgicos, anatómica y funcionalmente, diferentes que actúan sobre la secreción hipofisaria de prolactina (*Freeman y cols, 2000*):

- a) Neuronas tuberoinfundibulares dopaminérgicas, situadas en la parte dorsomedial del núcleo arcuato. Sus axones se proyectan a la zona externa de la eminencia media, donde la DA es secretada al espacio perivascular, próximo a los capilares sanguíneos del sistema porta hipofisario. De esta forma la DA alcanza la adenohipófisis (*Leong y cols, 1983; Mai y cols, 1994*).
- b) Neuronas tuberohipofisarias dopaminérgicas, situadas en la zona rostral del núcleo arcuato. Sus axones proyectan a los lóbulos neural e intermedio de la glándula pituitaria.
- c) Neuronas periventriculares hipofisarias dopaminérgicas, situadas en el núcleo periventricular hipotalámico. Sus axones terminan en el lóbulo intermedio de la hipófisis.

Esquemáticamente:



**Figura 3.-** Poblaciones de neuronas dopaminérgicas en el hipotálamo de rata, cuyos axones se dirigen hacia la eminencia media o hacia la hipófisis.

La actividad del sistema tuberoinfundibular dopaminérgico está regulada por neurotransmisores, neuromoduladores y hormonas. El principal regulador de estas neuronas tuberoinfundibulares dopaminérgicas es la prolactina mediante un mecanismo de retroalimentación corto (*Arbogast y Voogt, 1997; Lerant y Freeman, 1998*). Esta regulación se superpondría al mecanismo de retroalimentación que se ejercería directamente sobre las propias células lactotropas (*Kadowaki y cols, 1984; Bentley y Wallis, 1987*). Además, se

han descrito señales inhibitorias de este sistema hipotalámico, como 5-HT y NA, que disminuyen la actividad de las neuronas dopaminérgicas, y por lo tanto, reducen la secreción de DA. La NA incrementa la secreción de prolactina a través de cambios en la actividad del sistema dopaminérgico (*Fernández-Ruíz y cols, 1987; Lin y Pan, 1993*) principalmente en situaciones de estrés, donde aumentan los niveles circulantes de prolactina (*Langelier y McCann, 1977*), aunque, también ejerce efectos inhibitorios (*Lawson y Gala, 1975*), a través de receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos (*De Castro y cols, 1989*). También se han definido señales estimuladoras, como el ácido glutámico o la acetilcolina, que aumentan la actividad del sistema tuberoinfundibular dopaminérgico, produciendo un decremento de la secreción de prolactina. Aunque, en el caso del ácido glutámico se ha descrito que puede también ejerce efectos contrarios a los descritos anteriormente (*Login, 1990*). Estos y otros componentes indirectos del sistema regulador de prolactina pueden actuar en diferentes niveles de este mecanismo e incluso pueden tener efectos biológicos opuestos dependiendo de la concentración a la que estén actuando (*Freeman y cols, 2000*).

#### **c.1.2.2.- GABA**

El GABA es un factor fundamentalmente inhibitor de la secreción de prolactina. Como para la DA se ha descrito la existencia de un sistema GABAérgico hipotalámico (*Apud y cols, 1984; Apud y cols, 1989*), cuyos terminales nerviosos alcanzarían la eminencia media (*Vicent y cols, 1982; Tapaz, 1984*) donde el GABA es secretado. Desde ahí, el neurotransmisor llegaría a la adenohipófisis a través del sistema porta-hipofisario y ejercería un efecto directo (*Tapaz y cols, 1983*). En condiciones basales, la secreción de prolactina está regulada fundamentalmente por la DA. Sin embargo, en situaciones patofisiológicas especiales, como la hiperprolactinemia, el GABA también participa en la regulación, inhibiendo la producción de prolactina (*Apud y cols, 1989; Duvilanski y cols, 1983; Duvilanski y cols, 1986*). Paradójicamente se ha descrito que el GABA puede aumentar la secreción de prolactina, inhibiendo la actividad del sistema tuberoinfundibular dopaminérgico hipotalámico (*Casanueva y cols, 1981; Makinen y cols, 1993*). La repercusión exacta del mecanismo regulador ejercido por el GABA sobre la secreción de esta hormona hipofisaria está aún por investigar. Como en el caso de la DA, niveles circulantes elevados de prolactina actúan a nivel hipotalámico activando las neuronas GABAérgicas (*Duvilanski y cols, 1987*). Este efecto se refuerza con un mecanismo mediado a través de sustancia P y de 5-HT (*Afilone y cols, 1990a; Afilone y cols, 1990b*).

### ***c.1.2.3.- Somatostatina***

La somatostatina es un factor inhibidor no solo de la secreción de prolactina (*Vale y cols, 1974; Patel y cols, 1986*), sino también de GH (*Tannenbaum y Ling, 1984; Plotsky y Vale, 1985; Müller y cols, 1999*) y TSH (*Vale y cols, 1974*). Se ha caracterizado un efecto inhibidor de la somatostatina sobre la secreción de prolactina (*Reichlin, 1983; Patel y Srikant, 1986*) que ejercería a dos niveles: 1) a nivel hipotalámico, por sus interacciones con el sistema tuberoinfundibular dopaminérgico (*Kaneda y cols, 1991*), y 2) a nivel hipofisario, donde modula la secreción de galanina, péptido sintetizado y secretado por las células lactotropas, que actúa autocrina o paracrinamente modulando la secreción de prolactina (*Wynick y cols, 1993; Cai y cols, 1998; Hyde y cols, 1998*).

Es importante destacar que el efecto de este neuropéptido sobre la secreción de prolactina es dependiente de estrógeno (*Howard y cols, 1997; Cai y cols, 1998*), aunque el mecanismo fisiológico de esta interacción no se conoce. Sin embargo, esto indica que el estado estrogénico es determinante en los efectos de este neuropéptido sobre la secreción de prolactina (*Cooper y Shin, 1981; Lee y Shin, 1996*). Así se explicaría la diferente efectividad de la somatostatina en el animal intacto, donde su eficacia es menor, que en animales castrados y tratados con estradiol (*Cooper y Shin, 1981; Goth y cols, 1996; Lee y Shin, 1996*). Por otra parte, aunque ejerce un efecto importante sobre la secreción de prolactina, cuando se compara con la GH la eficacia del péptido es menor (*Patel y Srikant, 1986*).

### ***c.1.2.4.- Factores estimuladores de la secreción de prolactina***

Además de estos factores inhibidores, se han descrito un número elevado de moléculas endógenas que incrementan la secreción de prolactina. Entre ellos destaca la TRH, que estimula la secreción de prolactina directamente sobre las células lactotropas (*Bowers y cols, 1971; Blake, 1974*). Hoy en día se sigue buscando con insistencia el factor secretor estimulador específico para esta hormona.

Se ha descrito que la inyección intracerebroventricular o intravenosa de 5-HT o de su precursor (5-hidroxitriptófano) aumenta los niveles plasmáticos de prolactina en ratas, a través de un mecanismo mediado a nivel hipotalámico (*Lu y Meites, 1973; Lamberts y*

*MacLeod, 1978*), ya que no lo modifica cuando se adiciona a cultivos hipofisarios (*Lamberts y MacLeod, 1978*). Este concepto se apoya en resultados de la literatura que muestran neuronas serotoninérgicas situadas en el núcleo dorsal del rafe, que proyectan hacia núcleos hipotalámicos relacionados con la regulación de prolactina (*Fessler y cols, 1984*), y parece que responden con un incremento en los niveles circulantes de prolactina en situaciones de estrés, durante la lactancia y el embarazo (*Freeman y cols, 2000*).

Además de este neurotransmisor, se ha descrito recientemente que la taurina modula la secreción hipofisaria, como se ha observado para otros aminoácidos como el GABA o el ácido glutámico (*Apud y cols, 1984; Login, 1990*). Se ha sugerido que estimula la secreción de prolactina, probablemente modulando la producción de neurotransmisores hipotalámicos que controlan la actividad de las células lactotropas, ya que no afecta la secreción de la hormona *in vitro* (*Scheibel y cols, 1980*). Los péptidos opiodes podrían mediar los efectos de taurina sobre prolactina (*Shoichiro y cols, 1988*). Sin embargo, las concentraciones de taurina son elevadas tanto en hipotálamo como en hipófisis (*Lombardini, 1976*), por lo que los efectos moduladores de este neurotransmisor que están por definir. No obstante, la taurina ha sido involucrada en los mecanismos hipotálamo-hipofisarios reguladores de otras hormonas, como la LH (*Price y cols, 1978*).

### ***c.1.3. – Funciones fisiológicas de prolactina***

Desde su descubrimiento, la prolactina se conoce principalmente por su acción lactogénica (*Nelson y Gaunt, 1936*). Sin embargo, años más tarde comienza a describirse su papel modulador de la función reproductora (*Meites, 1967; Ben-Jonathan y cols, 1989*). Además, interviene en la osmorregulación (*Burstyn, 1978; Klibanski y cols, 1988*), en el control de la biosíntesis de esteroides (*Mazzocchi y cols, 1986; Arafah y cols, 1990*), en el crecimiento de células tumorales (*Arafah y cols, 1982; Arafah y cols, 1984*), en la modulación del sistema inmune (*Said y Porter, 1979; Sakurai y cols, 1988; Arce, 1994; Arce y cols, 1997*) y en la regulación de la presión sanguínea (*Arafah y cols, 1990; Mills y Ward, 1986*). Hasta ahora se han descrito más de 300 funciones para esta hormona a lo largo de la escala filogenética (*Bole-Feysot y cols, 1998*).

Las acciones fisiológicas de prolactina se llevan a cabo a través de receptores específicos, presentes en células de glándula mamaria, de gónadas y cerebrales (*Bakowska y Morrel, 1997*), como de tejidos periféricos diversos (*Horrobin, 1977; Clevenguer y cols, 1990; Nagano y Kelly, 1994*). Ello está de acuerdo con su versatilidad para modular funciones fisiológicas aparentemente no relacionadas. El receptor para prolactina es una proteína de membrana que pertenece a la clase I de la superfamilia de citocinas (*Bazan, 1990; Lai y cols, 1997*).

#### ***c.1.4.- Prolactina y envejecimiento***

Los niveles basales circulantes de prolactina aumentan progresivamente con la edad (*Meites y cols, 1978; Demarest y cols, 1985; García-Bonacho y cols, 2000*), siendo este incremento más marcado en las hembras debido a su componente estrogénico (*Meites, 1982*). Este efecto de la edad sobre esta hormona se produce acompañado de un declive en la secreción de estrógenos en el ovario o una reducción de los niveles de testosterona en el testículo (*Meites, 1982*).

#### **c.2.- La GH**

La GH es una molécula polipeptídica, formado por 191 aminoácidos, en la que existen dos puentes disulfuro. Esta estructura, con un peso molecular de 22650 daltons, se conoce como la forma 22 K, forma principal de secreción de la hormona por la hipófisis anterior y la más abundante, tanto en plasma como en las propias células somatotropas. Existen una serie de variantes cuyo significado fisiológico no se conoce en la actualidad (*Chen y cols, 1989*). La GH está estructuralmente relacionada con la prolactina, ya que son proteínas codificadas por genes divergentes, como se ha mencionado anteriormente.

##### ***c.2.1.- Síntesis y secreción de GH: ritmo circadiano***

La síntesis de la hormona se produce en el retículo endoplasmático rugoso de las células somatotropas (células acidófilas) presentes en la hipófisis. Tras su paso por el aparato Golgi, es empaquetada dentro de gránulos secretores. Finalmente, la GH es

secretada al espacio perivascular por exocitosis. Es importante destacar la existencia de células acidófilas mixtas que secretan tanto GH como prolactina, denominadas mamosomatotropas (Neil y Frawley, 1983; Frawley y cols, 1985), aunque su función fisiológica exacta no se conoce en la actualidad.

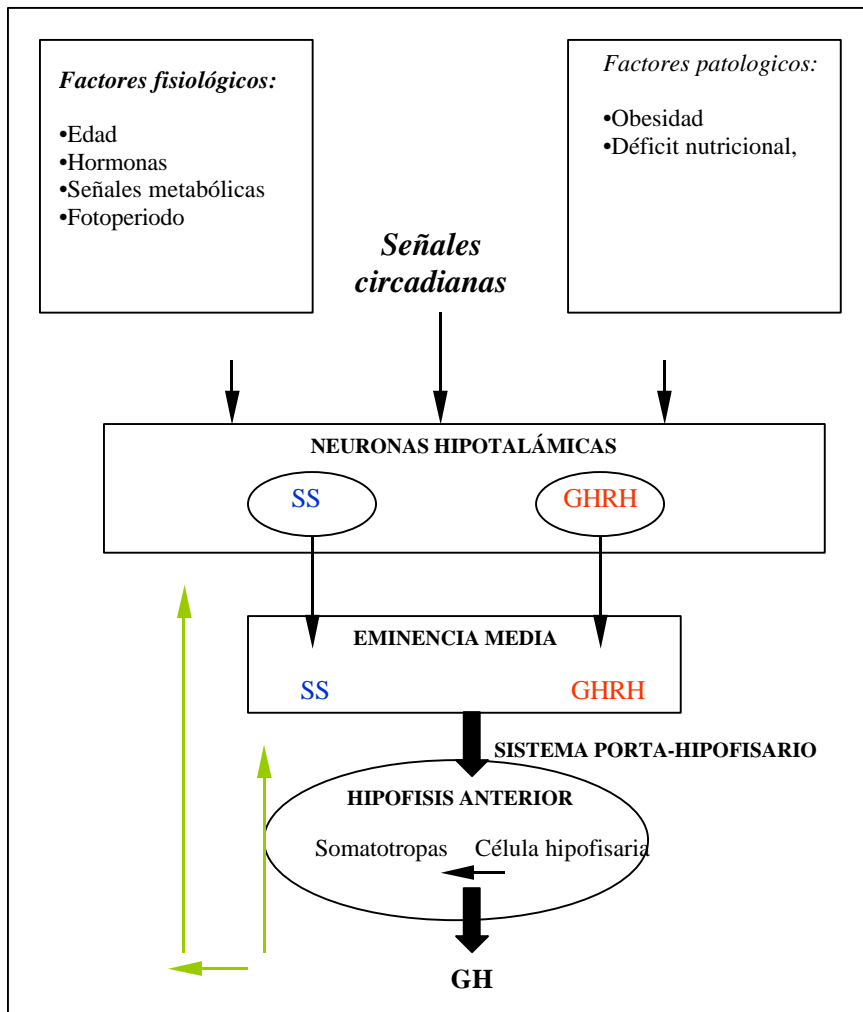
La secreción de GH es pulsátil en todas las especies estudiadas (Tannenbaum y Martín, 1976; Müller y cols, 1999), es decir, con fases de secreción brusca, separadas entre sí por períodos largos (horas) en los que no existe apenas secreción de la hormona. Se diferencia del patrón pulsátil descrito para prolactina en que los lapsos temporales son más cortos. Esta secreción pulsátil de GH se origina por la secreción rítmica y alternante de GHRH (Hormona liberadora de la GH) y de somatostatina a la circulación portal (Plotsky y Vale, 1985), de forma que cada pico de secreción de la GH se corresponde con un aumento de la secreción de GHRH y una disminución de la secreción de somatostatina (Tannenbaum y Ling, 1984; Plotsky y Vale, 1985). En condiciones normales, los picos secretores máximos de GH se producen durante el sueño, principalmente asociados a la primera fase del sueño lento, con picos de menor amplitud en fases tardías de esta etapa del sueño (Holl y cols, 1991).

### ***c.2.2.- Regulación neuroendocrina de la secreción de GH.***

La secreción de GH está regulada por un control neuroendocrino complejo, ejercido principalmente por la acción alternativa de dos hormonas hipotalámicas, la GHRH y la somatostatina, como se ha mencionado con anterioridad, que ejercen sobre las células somatotropas influencias estimuladoras o inhibidoras respectivamente (Tannenbaum y Ling, 1984; Plotsky y Vale, 1985; Müller y cols, 1999). Además, otros neurotransmisores, neuropéptidos y neuromoduladores están implicados en la regulación de esta hormona, tanto modulando factores hipotalámicos como de forma directa sobre las células somatotropas (Cutler, 1996).

Esquemáticamente se muestra a continuación:





**Figura 4.-** La secreción de GH es pulsátil, regulada por la interacción entre GHRH y somatostatina (SS), que inhibe o estimula las células somatotropas respectivamente. La actividad de estas dos neurohormonas está modulada por la acción de neurotransmisores, principalmente NA, neuropéptidos hipotálamicos, hormonas y señales metabólicas según la información recibida del medio interno del individuo.

### c.2.2.1.-GHRH

La hormona hipotálamica GHRH es sintetizada por neuronas situadas en el núcleo arcuato cuyas terminaciones nerviosas terminan en la eminencia media. La GHRH alcanza la adenohipófisis a través del sistema porta hipofisario (Bloch y cols, 1984), donde se une a receptores específicos localizados en la membrana de las células somatotropas. La GHRH induce la secreción de GH y estimula la proliferación de las células somatotropas (Theill y Karin, 1993; Mayo y cols, 1995).

Neurotransmisores, neuropéptidos, neuromoduladores o señales metabólicas modifican la actividad de las neuronas del núcleo arcuato. Así, estudios *in vitro* realizados en hipotálamo han demostrado que la secreción de GHRH aumenta en respuesta a una bajada de glucosa (Baes y Vales, 1990) o a estímulos  $\alpha_2$ -adrenérgicos (Kabayama y cols, 1986). Sin embargo, la actividad de estas neuronas disminuye por un efecto de IGF-I (Shibasaki y cols, 1986), de somatostatina (Liposits y cols, 1988; Yamauchi y cols, 1991), por la activación del sistema GABAérgico (Baes y Vale, 1989) o por el aumento de los niveles circulantes de GH (Ganzetti y cols, 1986; Müller y cols, 1999).

Se ha descrito que, a niveles fisiológicos, los glucocorticoides amplifican la respuesta y la sensibilidad de las células somatotropas a la GHRH (Seifert y cols, 1984; Tamaki y cols, 1996), mientras que disminuyen el efecto inhibitor de somatostatina (Schonbrunn, 1982). Además, favorecen la diferenciación a este tipo de células (Boockford y cols, 1985), y estimulan la síntesis y secreción de GH (Thakore y Dinan, 1994).

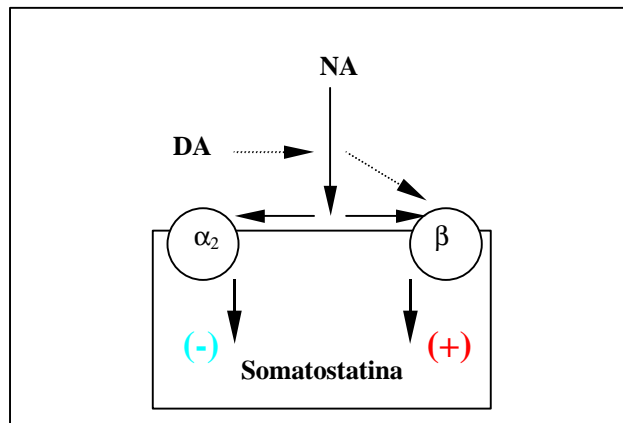
Además de GHRH, se han descrito también otros neuromodulares que aumentan la secreción de GH, como la 5-HT (Arnold y cols, 1981), o el PACAP (Rawlings y Herzareh, 1996).

#### **c.2.2.2.- Somatostatina**

En el hipotálamo, la mayor parte de las neuronas que secretan somatostatina se encuentran en el núcleo periventricular anterior (Fishman y Peake, 1970). Estas neuronas proyectan sus axones principalmente hacia la eminencia media donde forman una banda compacta en la zona externa, aunque una pequeña porción de estas fibras se dirige hacia la neurohipófisis donde modulan la secreción de oxitocina y vasopresina. Otras neuronas del núcleo periventricular anterior proyectan sus axones a otras áreas fuera del hipotálamo como el sistema límbico, o conectan con otros núcleos hipotalámicos como el arcuato, donde modula la secreción de GHRH, o los núcleos supraquiasmáticos, generadores de ritmicidad (Müller y cols, 1999).

El control de la secreción de somatostatina hipotalámica depende principalmente de la tasa de NA en el espacio sináptico. Así, cuando la concentración de NA aumenta, se activan los receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos en la neurona postsináptica y se inhibe la secreción

de este somatostatina. Sin embargo, cuando el contenido en NA disminuye en el espacio sináptico se activan los receptores  $\beta$ -adrenérgicos postsinápticos y se estimula la secreción de somatostatina (Negro-Vilar, 1979; Maeda y Forman, 1980). Además, recientemente se ha descrito que la DA ejerce un papel modulador de los receptores adrenérgicos, ya que actúa disminuyendo la actividad de los receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos y/o aumentando la actividad de los  $\beta$ -adrenérgicos en las neuronas productoras de somatostatina, (Arce y cols, 1991a; Devesa y cols, 1991a).



**Figura 5.-** La secreción de somatostatina depende fundamentalmente de la concentración de NA. Cuando aumenta la concentración de este neurotransmisor se inhibe la secreción de somatostatina.

Además de la NA se conocen otros factores inhibidores de la secreción de somatostatina, como la acetilcolina que incrementa la actividad de los receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos (Devesa y cols, 1991a), o el GABA (Gamse y cols, 1980), que ejerce su acción en el hipotálamo (García-Segura y cols, 1991) e inhibe la secreción de somatostatina (Takahara y cols, 1980). Otros neuromoduladores ejercen efectos estimuladores sobre la secreción de somatostatina. Es el caso de la hormona liberadora de tirotrópina (TRH), la GHRH (Katakami y cols, 1985; Arimura y cols, 1986), la GH (Shepard y cols, 1978; Chihara y cols, 1979), los glucocorticoides (Nakagawa y cols, 1987; Fernández-Vasquez, 1995) y la taurina (Aguilar y McCann, 1985).

Es importante destacar que tanto las variaciones en los niveles circulantes de glucosa como la ingesta de dietas enriquecidas en proteínas modulan la síntesis y secreción de somatostatina en el hipotálamo (Berelowitz y cols, 1982b; Alba-Roth y cols, 1988). Asimismo, los esteroides sexuales regulan la secreción de este neuropéptido en el

hipotálamo, modificando la respuesta de sus receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos (Devesa y cols, 1991b; Devesa y cols, 1993).

### ***c.2.3.- Funciones fisiológicas de la GH***

La GH, somatotropina, u hormona somatotropa recibe su nombre porque ejerce efectos múltiples en todo el organismo. Así, controla el crecimiento corporal armónico y la consecución de una talla adulta normal a través de una acción directa sobre el tejido óseo e indirecta, a través de la síntesis de IGF-1 (factor de crecimiento I como la insulina), fundamental a nivel hepático y óseo (Devesa, 1990). Sin embargo, su efecto biológico más importante se ejerce sobre el metabolismo intermedio, a través de sus acciones lipolítica y diabetogénica, (ver revisión, Tresguerres, 2000). Además, datos crecientes de la literatura muestran otros efectos de la hormona sobre el sistema inmunitario (Berzi 1986; Esquifino y cols, 1999a; Esquifino y cols, 1999b), el sistema cardiovascular (Sacca y col, 1994), la hematopoyesis (Strobl y Thomas, 1994; Devesa, 1996), las gónadas (Rice y cols, 1976; Kaiser y cols, 2001), la glándula mamaria (Caron y cols, 1994) y determinados procesos cognitivos (Thienhaus y cols, 1987). Por otro lado, se ha descrito la existencia de síntesis de una GH idéntica a la hipofisaria en diversos tejidos extrahipotalámicos como el sistema inmunitario (Weigent y cols, 1988; Costoya y cols, 1996; Mol y cols, 1995), cuyo significado fisiológico no está perfectamente establecido. Ello se correlaciona con la existencia del circuito de prolactina periférica ya mencionado.

Las acciones fisiológicas de la hormona se llevan a cabo a través de receptores específicos pertenecientes a la superfamilia de receptores hematopoyéticos implicados en la regulación del crecimiento y diferenciación celular. Tras la unión de la GH al receptor el paso inicial en la transducción de la señal de la hormona puede ser mediante la generación de segundos mensajeros o bien actuando directamente sobre el ADN nuclear (Bolander, 1999; Tresguerres, 1999). Como es de esperar, los receptores de GH y de prolactina presentan rasgos semejantes tanto estructuralmente como funcionalmente (Goffin y Kelly, 1996; Goffin y cols, 1998).

#### ***c.2.4. La GH y el envejecimiento***

A diferencia de lo observado para prolactina, los niveles circulantes de GH disminuyen con la edad (*Meites, 1982; García-Bonacho y cols, 2000*). Los mecanismos responsables del déficit secretor de la hormona no están completamente establecidos, aunque podrían implicar alteraciones tanto a nivel hipofisario como hipotalámico (*Arce y cols, 1991b*). Así en el hipotálamo disminuye la síntesis y secreción de GHRH durante el envejecimiento (*Morimoto y cols, 1988*). Sin embargo, en relación con la somatostatina hay datos que muestran que la concentración de este neuropéptido disminuye, aumenta o no se modifica con la edad (*De Gennaro y cols, 1989; Sonntag y cols, 1990; Deslaurier y cols, 1991*). A nivel hipofisario, parece claro que se produce una disminución de los niveles circulantes de GH con la edad (*Meites, 1982; García-Bonacho y cols, 2000*). Ello se explica por una disminución en el número de células somatotropas y en el número de receptores de GHRH (*Sun y cols, 1984; Parenti y cols, 1987*), junto con una disminución de la respuesta de estas células a GHRH *in vitro* (*Ceda y cols, 1986*). Es importante destacar que el patrón pulsátil de esta hormona no se altera durante el envejecimiento, aunque disminuye significativamente la amplitud de los pulsos de secreción (*Meites, 1982*).

---

## **OBJETIVOS Y DISEÑOS EXPERIMENTALES**

Hoy en día se conoce que casi todas las funciones fisiológicas presentan oscilaciones regulares en el tiempo, coordinadas entre sí, a través del reloj endógeno circadiano. Esto permite separar actividades biológicas incompatibles o simplemente irrealizables conjuntamente. Por lo tanto, cambios en la organización temporal de algunas variables biológicas, pueden tener consecuencias sobre funciones fisiológicas diversas (*Sanvisens, 1989; Rodríguez Castañeda, 2001*). Estas alteraciones, pueden ser producidas por causas diferentes: fisiológicas o patológicas.

Durante el envejecimiento, los ritmos fisiológicos pueden modificar sus parámetros característicos como la amplitud o el periodo (*Pittendrigh y Daan, 1974; Weinert, 2000; Kolker y Turek, 2001; García-Bonacho y cols, 2000; Cano y cols, 2001*). Asimismo, se pueden desincronizar con las señales procedentes del medio ambiente externo o del medio interno (*Pittendrigh y Daan, 1974; Weinert, 2000; Kolker y Turek, 2001*). El propio envejecimiento puede afectar también al reloj endógeno propiamente dicho, en él se ha demostrado una disminución del número de neuronas funcionales con la edad (*Weinert, 2000; Kolker y Turek, 2001*). Además, también se alteran las proyecciones neuronales tanto aferentes como eferentes (*Kolker y Turek, 2001*). Como resultado de ello, la capacidad en los núcleos supraquiasmáticos, para producir ritmos estables y sincronizados, disminuye con la edad (*Weinert, 2000*) y se manifiesta como un desajuste en el funcionamiento del organismo.

Trabajos del grupo y de la literatura han mostrado cambios, durante el envejecimiento, en los patrones diarios de parámetros diversos tanto del sistema neuroendocrinológico como inmunitario (*Scarborough y Wise, 1991; Wise, 1994; Cai y Wise, 1996; Cardinali y cols, 1998a; Cardinali y cols, 1998b; García-Bonacho, 2000; García-Bonacho 2001; Cano y cols, 2001*). Asimismo, se han realizado algunos estudios, sobre el efecto de la edad en la actividad diaria del eje hipotálamo-hipofisario. Así, Wise y cols (1987) y Cohen y cols (1988) han mostrado ritmos específicos de NA y del metabolismo de 5-HT relacionados con el mantenimiento del ciclo estral en la hembra durante el envejecimiento. También, nuestro grupo ha mostrado ritmos diarios de NA y del metabolismo de DA en áreas hipotalámicas específicas, que cambian no sólo durante el envejecimiento sino también durante el desarrollo de la artritis adjuvante (*Cano y cols, 2001*). Estos cambios a nivel hipotalámico podrían explicar alteraciones edad dependiente

de los ritmos secretores de las hormonas hipofisarias (Wise, 1982; Wise, 1987; García-Bonacho, 2000; Gore y cols, 2000).

Sin embargo, a veces, los cambios con la edad en neuromoduladores y en hormonas hipofisarias no se producen en igual sentido. Por ejemplo, se ha descrito que la secreción de prolactina aumenta con la edad (Meites y cols, 1978; Demarest y cols, 1985; García-Bonacho, 2000), e igualmente, también aumenta la concentración de DA en la hipófisis (Demarest y cols, 1985; Cano y cols, 2001), aunque no ejerce acción inhibitor sobre la secreción de la hormona (Arita y cols, 1984).

***El objetivo global de este trabajo es analizar el efecto del envejecimiento sobre los neuromoduladores del eje hipotálamo-hipofisario, y si estos cambios condicionan los patrones diarios de secreción de prolactina y de GH.*** El objetivo global se puede desglosar en los siguientes objetivos específicos:

1. Analizar los efectos de la edad sobre los patrones diarios de concentración de aminas biógenas, GABA, taurina y somatostatina en el hipotálamo anterior, el hipotálamo mediobasal, la eminencia media y en la adenohipófisis de ratas macho.
2. Estudiar las correlaciones entre los neuromoduladores estudiados y la concentración de DA en la eminencia media. Asimismo, se analizará las posibles correlaciones entre las concentraciones de los neuromoduladores estudiados en eminencia media y adenohipófisis con los niveles plasmáticos de prolactina, tanto en ratas adultas jóvenes como envejecidas.
3. Estudiar las correlaciones entre los neuromoduladores estudiados y el contenido de somatostatina en la eminencia media y en el hipotálamo anterior. Asimismo, se analizará las posibles correlaciones entre las concentraciones de los neuromoduladores estudiados en eminencia media y adenohipófisis con los niveles plasmáticos de GH, tanto en ratas adultas jóvenes como envejecidas.

Para la consecución de dichos objetivos se desarrollaron los diseños experimentales que se describen:



## **1.- Caracterización de los patrones diarios de concentración de los neuromoduladores del eje hipotálamo-hipofisario y de las hormonas hipofisarias (prolactina y GH) y sus posibles correlaciones, en animales jóvenes.**

### *Objetivos*

Estudiar las variaciones diarias en el contenido de aminas biógenas, GABA, taurina y somatostatina en el hipotálamo anterior, hipotálamo mediobasal, eminencia media y adenohipófisis, como el patrón secretor de prolactina y GH, en ratas macho jóvenes.

Analizar las posibles correlaciones entre los neuromoduladores estudiados y la concentración de DA en eminencia media o de somatostatina en este tejido y en el hipotálamo anterior, y entre los neuromoduladores de la eminencia media o de la adenohipófisis y los niveles plasmáticos de prolactina y GH, en ratas macho jóvenes.

### *Protocolo de trabajo*

La experimentación animal se ha realizado en ratas macho de la cepa Wistar de 60 días de vida. Estos animales (8 animales por horario) se decapitaron en seis horas diferentes a lo largo del día (09:00, 13:00, 17:00, 21:00, 01:00, 05:00), sin anestesia previa.

Tras la decapitación, se recogieron las cabezas sobre hielo seco e inmediatamente después se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento y análisis posterior de neurotransmisores por HPLC y de somatostatina mediante un radioinmunoanálisis específico, como se explica en materiales y métodos. Asimismo, se recogió la sangre troncular y se separó el plasma, que se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el análisis posterior de hormonas adenohipofisarias (prolactina y GH) mediante radioinmunoanálisis específicos.

Se midió el contenido en NA, DA, DOPAC, 5-HT, 5-HIAA, GABA, taurina y somatostatina en intervalos de 4 horas a lo largo de un ciclo de 24 horas, en el hipotálamo anterior, hipotálamo mediobasal, eminencia media y adenohipófisis. Además, se determinaron los niveles circulantes de prolactina, GH y el contenido en melatonina de la glándula pineal en las mismas condiciones experimentales que se describieron más arriba, a intervalos de 4 horas durante un periodo de 24 horas.

## **2.- Caracterización de los patrones diarios de concentración de los neuromoduladores del eje hipotálamo-hipofisario y de las hormonas hipofisarias (prolactina y GH) y sus posibles correlaciones, en animales envejecidos.**

### *Objetivo*

Estudiar las variaciones diarias en el contenido de aminas biógenas, GABA, taurina y somatostatina en el hipotálamo anterior, hipotálamo mediobasal, eminencia media y adenohipófisis, como el patrón secretor de prolactina y GH, en ratas macho envejecidas

Analizar las posibles correlaciones entre los neuromoduladores estudiados y la concentración de DA en eminencia media o de somatostatina en este tejido y en el hipotálamo anterior, y entre los neuromoduladores de la eminencia media o de la adenohipófisis y los niveles plasmáticos de prolactina y GH, en ratas macho envejecidas.

### *Protocolo de trabajo*

La experimentación animal se ha realizado en ratas macho de la cepa Wistar de 18 meses de vida. Estos animales (8 animales por horario) se decapitaron en seis horas diferentes a lo largo del día (09:00, 13:00, 17:00, 21:00, 01:00, 05:00), sin anestesia previa.

Tras la decapitación, se recogieron las cabezas, sobre hielo seco, e inmediatamente después se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento y análisis posterior de neurotransmisores por HPLC y de somatostatina mediante un radioinmunoanálisis específico, como se explica en materiales y métodos. Asimismo, se recogió la sangre troncular y se separó el plasma, que se almacena a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el análisis posterior de hormonas adenohipofisarias (prolactina y GH) mediante radioinmunoanálisis específicos.

En este grupo experimental medimos el contenido en NA, DA, DOPAC, 5-HT, 5-HIA, GABA, taurina y somatostatina en intervalos de 4 horas a lo largo de un ciclo de 24 horas, en el hipotálamo anterior, hipotálamo mediobasal, eminencia media y adenohipófisis. Además, se determinaron los niveles circulantes de prolactina, GH y el contenido en melatonina en la glándula pineal en las mismas condiciones experimentales, en intervalos de 4 horas durante un periodo de 24 horas.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

## A) INSTALACIONES

El Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid (UCM) cuenta con laboratorios totalmente equipados para el desarrollo de las técnicas necesarias para la realización de esta tesis. Complementariamente, ha sido necesario el uso de otras unidades, de la misma facultad como:

- ❖ Animalario Central (ANUC), que dispone de instalaciones adecuadas para el manejo de animales de experimentación y quirófanos donde llevar a cabo las cirugías, el sacrificio de los animales y la recogida de muestras.
- ❖ Instalación Radiactiva Central, que cuenta con laboratorios equipados para el manejo de isótopos radiactivos, así como una sala central de medición de radioisótopos, con contadores de radiación  $\gamma$  y  $\beta$ .

## B) ANIMALES DE EXPERIMENTACION

Se han utilizado ratas macho de la cepa Wistar de 60 días y de 18 meses de edad, criadas en el ANUC. Todas las camadas se homogenizan el día 3 de vida, dejando 10 animales por madre, de forma que todas las ratas tengan posibilidades similares de crecimiento y desarrollo. El destete de las crías se realiza el día 23 de vida; a partir de ese momento, los animales se alimentan con pienso compuesto (Panlab) y agua ad libitum.

Los animales se alojan en jaulas de metacrilato de 42 x 23 x 14 cm, en grupos de 4 animales por jaula. La luz del animalario es artificial, mediante lámparas fluorescentes que se controlan automáticamente en ciclos de 12 horas luz-12 horas oscuridad (08:00-20:00 h). La ventilación se realiza por extracción continuada, y se dispone de temperatura controlada (entre 22 y 24°C).

## **C) METODOS EXPERIMENTALES**

### ***c.1.- Sacrificio de animales***

Los animales se sacrifican por decapitación, sin anestesia previa. Se utiliza este método ya que la anestesia produce alteraciones neuroendocrinas que podrían modificar los parámetros estudiados. El sacrificio se produce en 6 intervalos distintos a lo largo del día, cada cuatro horas (09:00, 13:00, 17:00, 21:00, 01:00 y 05:00 horas).

### ***c.2.- Recogida de muestras***

Inmediatamente después del sacrificio se recogen las cabezas en hielo seco y quedan almacenadas a -80°C hasta la disección del hipotálamo anterior y mediobasal, eminencia media, adenohipófisis y glándula pineal. La manipulación no duró más de 2 minutos por animal, para evitar que el contenido de GABA aumente postmortem.

La sangre troncular se recoge en tubos de poliestireno con EDTA al 6% como anticoagulante. Se centrifugan a 2500 rpm, 15 minutos a 4°C. El sobrenadante se guarda a -20°C para la medida posterior de las hormonas hipofisarias que se analizan en este trabajo.

## **D) METODOS ANALITICOS**

### ***d.1.- Radioinmunoanálisis***

El radioinmunoanálisis (RIA) fue desarrollado por Berson y Yalow en 1959 para valorar la insulina. Desde entonces se ha ido extendiendo hasta abarcar prácticamente todas las hormonas peptídicas, esteroideas y otros agentes biológicos.

El método se basa en la inhibición competitiva por la unión a su anticuerpo (Ac) específico de una sustancia fría (no marcada radiactivamente), que es el antígeno (Ag), y la

misma sustancia previamente marcada con un isótopo radiactivo, el antígeno marcado (Ag\*). Obtenemos así complejos antígeno-anticuerpo marcados (Ag\*-Ac) y sin marcar (Ag-Ac).

#### *d.1.1. Radioinmunoanálisis de prolactina y de GH*

##### ***d.1.1.1.- Tampones y reactivos***

###### ***Tampones***

- ❖ **Tampón I:** Tampón fosfato 0,5M, pH= 7,6. Se prepara a partir de dos soluciones previas: a) Solución de fosfato monosódico 0,5 M (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) y b) Solución de fosfato monopotásico 0,5M (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>). Se emplea para el marcaje y para preparar el tampón II. Puede guardarse a temperatura ambiente en frasco opaco.
- ❖ **Tampón II:** Tampón fosfato 0,01M. pH= 7,6, 0,15M de NaCl (PBS). Se realiza diluyendo 50 veces el tampón I en agua bidestilada y añadiendo posteriormente 8,8g de NaCl/L. Se utiliza para eluir la columna de marcaje y para preparar los tampones III y IV. Puede guardarse a temperatura ambiente en frasco opaco.
- ❖ **Tampón III:** Tampón fosfato 0,01M, 0,15M de NaCl, 1% de albúmina de suero bovina (BSA) fracción V (Sigma), pH= 7,6. Al tampón II se le añade 1g de albumina por 100mL del tampón (1% peso/volumen). Se emplea para las diluciones de las hormonas de la curva estándar, para completar las alícuotas de los plasmas problema hasta el volumen empleado en la curva estándar del radioinmunoanálisis y para diluir las hormonas marcadas. Se guarda en nevera.
- ❖ **Tampón IV:** Tampón fosfato 0,01M, 0,15M de NaCl, ácido etilén-diamino tetracético (EDTA) (Sigma) 0,025M y Titriplex (Merck) 0,025 M, pH= 7,6. Se hace a partir del tampón II añadiendo 0,95g de EDTA y 0,84 g de Titriplex, ajustándose de nuevo el pH a 7,6. Se emplea para eluir el primer Ac. Se guarda en nevera.

## **Reactivos**

Las hormonas puras para la curva patrón y para yodar, así como los anticuerpos específicos de las hormonas han sido generosamente suministrados por el National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (NIDDK) y el Prof. P.A. Parlow (Harbor UCLA Medical Center, 1000 West Carson Street, Torrance, CA 90509). Estas hormonas se presentan liofilizadas, siendo necesario reconstituirlas para su utilización, según las instrucciones del NIDDK:

- ❖ Prolactina y GH para yodar (NIDDK-rprolactina-I-6 y NIDDK-rGH-I-6). Ambas hormonas se reconstituyen en una solución de bicarbonato sódico ( $\text{NaHCO}_3$ ) 0,01M a una concentración de 100 g/mL distribuyéndose en alícuotas de 25 L, que se almacenan a  $-80^\circ\text{C}$ .
- ❖ Prolactina y GH para la curva (NIDDK-r-prolactina-RP3 y NIDDK-r-GH-RP2). Ambas hormonas se reconstituyen añadiendo 1mL de agua bidestilada, distribuyéndose en alícuotas de 25 L con una concentración final de 250ng/25 L.
- ❖ Los anticuerpos NIDDK-anti-r-prolactina-S-9 y NIDDK-anti-r-GH-S-5 se reconstituyen con agua bidestilada, diluyéndose 1/10 en PBS y almacenándose en alícuotas a  $-80^\circ\text{C}$  hasta su utilización.
- ❖ Proteína A extraída de cultivos de *Staphylococcus aureus* obtenida en el Departamento de Fisiología Vegetal, de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Madrid. Se utiliza para la precipitación de los complejos antígeno-anticuerpo (Ag-Ac) y antígeno marcado-anticuerpo (Ag\*-Ac).

### **d.1.1.2.- Marcaje de la hormona**

Como marcador para las hormonas peptídicas se ha utilizado el  $^{125}\text{I}$ , ya que este radioisótopo presenta como ventajas una actividad específica mayor que el  $^3\text{H}$  y un conteo de emisión más sencillo que el de un emisor  $\beta$  que requiere líquido de centelleo. De los

radioisótopos del yodo se ha utilizado el  $^{125}\text{I}$  porque presenta una vida media mayor que la del  $^{131}\text{I}$  (60 días frente a 8).

El marcaje se lleva a cabo mediante el método de la lactoperoxidasa, técnica descrita por Marchalonis (1969) y modificada por Esquifino (1976), para la prolactina y GH. Con este método se consigue, por medio de una reacción enzimática, que el ión yoduro radiactivo pase a yodo molecular, que es capaz de desplazar al hidrógeno del anillo fenólico de la tirosina, que forma parte de la estructura molecular de las proteínas. Aunque se han descrito otros métodos para la radioyodación de las hormonas proteicas, se eligió el de la lactoperoxidasa porque produce un daño menor en la estructura de la molécula, dando un rendimiento del proceso, una actividad específica y una capacidad de unión de la hormona yodada mayor que la obtenida con otros métodos (*Esquifino, 1976*).

Para ello, sobre una alícuota de la hormona, que contiene  $2,5\mu\text{g}$  de la misma en 25 L de  $\text{NaHCO}_3$  (Merck), se añaden:

- a)  $25\mu\text{L}$  de tampón I para tamponar la solución a pH 7,6.
- b)  $0,5\text{ mCi}$  de  $^{125}\text{I}$ .
- c)  $0,5\mu\text{g}$  de lactoperoxidasa (Sigma)/  $10\mu\text{L}$  de agua destilada. Se deja reaccionar durante cuatro minutos, en agitación constante.
- d) La reacción se detiene por la adición de  $100\mu\text{L}$  de tampón III, que permite separar la hormona marcada del  $^{125}\text{I}$  que no ha reaccionado.

Una vez terminada la reacción, se purifica el producto de la radioyodación mediante una cromatografía en columna con gel de Sephadex G-50 fino (Farmacia LKB), con el fin de separar la hormona marcada del yodo libre. La mezcla del marcaje eluye con tampón II, recogándose fracciones de  $0,5\text{mL}$ . Se mide la radiactividad contenida en  $10\mu\text{L}$  de cada fracción en un contador  $\gamma$  (Packard mod. Cobra autogamma, Pacisa) y se representa gráficamente (*Esquifino, 1976*). El primer pico de radiactividad corresponde a la hormona marcada, y el segundo al  $^{125}\text{I}$  libre. Se mezclan las fracciones correspondientes a la zona descendente del primer pico, repartiéndose en alícuotas, que se almacenan a  $-20^\circ\text{C}$  hasta su uso en el RIA.



#### ***d.1.1.3.- Titulación del anticuerpo***

Consiste en ajustar la dilución del anticuerpo específico de la hormona para determinar la concentración a la que se da la máxima unión con la hormona marcada, sin que exista pérdida de sensibilidad.

#### ***d.1.1.4.- Curva patrón***

La curva patrón se utiliza para calcular la relación entre la hormona yodada ligada al anticuerpo y la concentración de hormona fría. Para ello, preparamos diluciones sucesivas de una solución de hormona fría de concentración conocida. Cada punto de la curva patrón se pipetea por triplicado y se utilizan al menos dos curvas patrón, una al principio y otra al final del ensayo, para controlar las posibles variaciones debidas a los diferentes tiempos de incubación entre las primeras y las últimas muestras. También se utilizan los siguientes puntos de referencia (todos por triplicado):

- ❖ Controles de la actividad total añadida, expresados en cuentas por minuto (cpm). Contienen únicamente hormona yodada en la misma cantidad que el resto de los tubos del ensayo.
- ❖ Controles de unión máxima, que miden la unión máxima de la hormona marcada con el Ac en ausencia de hormona fría.
- ❖ Controles de unión no específica, que miden la radiactividad residual como consecuencia de la unión de la hormona marcada a la pared del tubo en el que se realiza el ensayo. No contiene ni anticuerpo ni hormona fría.

#### ***d.1.1.5.- Representación gráfica de la curva patrón***

De cada punto de la curva patrón se determina las cpm, procedentes de los complejos Ag\*-Ac. Cada punto de la curva se valora por triplicado, obteniéndose las cpm medias de cada uno de ellos. La captación se determina mediante la fórmula:

$$\frac{Bc - Ne}{Bo - Ne} \times 100$$

Donde Bc mide la unión de la hormona marcada con el Ac en presencia de concentraciones conocidas de la hormona sin marcar, Bo mide la unión máxima de la hormona marcada con el Ac en ausencia de la hormona sin marcar y Ne mide la radiactividad residual o no específica. Para su representación utilizamos un papel semilogarítmico, con el eje de ordenadas dividido de forma lineal y el eje de abcisas logarítmicamente. En el primero expresamos el porcentaje de captación específica de cada punto y en el segundo la concentración de Ag (hormona) sin marcar que se ha añadido a cada punto. De este modo, y uniendo todos los puntos, obtenemos un trazo sinusoidal. La concentración de Ag presente en la muestra se determina por la radiactividad presente en el complejo Ag\*-Ac correspondiente, interpolándolo en la curva que se construye con las soluciones patrón.

#### ***d.1.1.6.- Protocolo de experimentación para PRL y GH***

Los RIAs de prolactina y GH se realizan siguiendo el protocolo detallado a continuación:

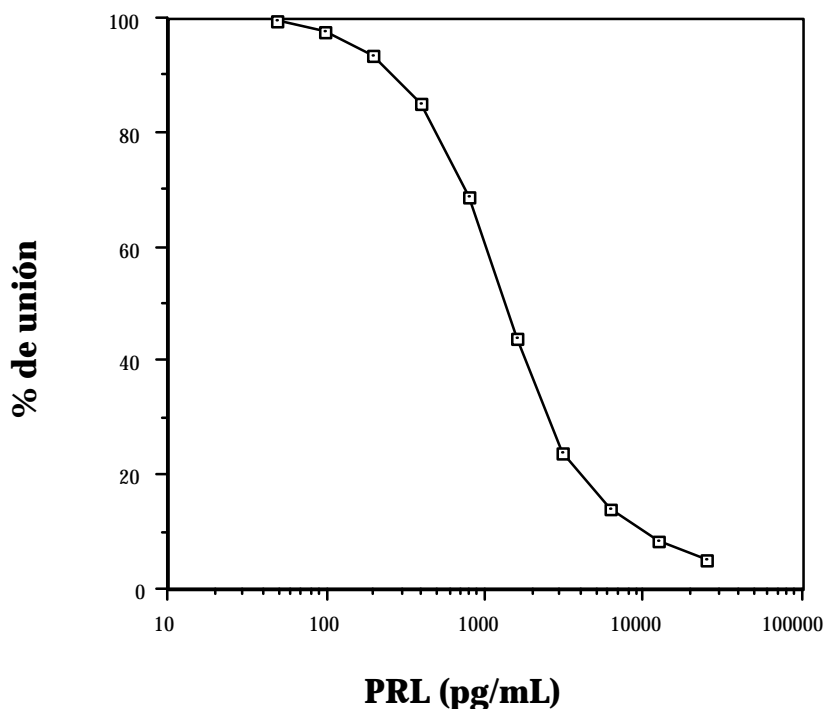
- a) Se pipetea alícuotas de la dilución patrón de prolactina rPRL-RP-3 o de hormona de crecimiento rGH-RP-2 (concentraciones conocidas descendentes a partir de 25 ng/mL) en 200µL de tampón III. Se pipetea 25µL de cada uno de los plasmas problema, completándose hasta 200µL con tampón III.
- b) Se pipetea 200µL del anticuerpo anti-r-PRL-S-9 y anti-r-GH-S-5 a una dilución final por tubo de 1:437.500 y 1:1.000.000 para prolactina y GH respectivamente en tampón IV. Agitar.
- c) Se preincuba 24 horas a 4°C.
- d) Se añaden 200µL de rPRL-<sup>125</sup>I o rGH-<sup>125</sup>I en tampón III (10.000 cpm/tubo) y se agitan los tubos.
- e) Se incuba 72 horas a 4°C.
- f) Se añade *Staphylococcus aureus*, (10% p/v en 0,5% de Triton X-100 en Tampón IV), en un volumen igual al de plasma usado en el análisis. Agitar.

- g) Se incubaba 20 minutos a 4°C.
- h) Una vez transcurridos los 20 minutos de incubación, se centrifuga a 3.000 rpm, 15 minutos a 4°C, y se aspira el sobrenadante. Posteriormente, se mide la radiactividad del precipitado en un contador de radiación  $\gamma$  (Packard mod. Cobra autogamma, PACISA).

Con este método de separación tenemos en el precipitado los complejos Ag-Ac y Ag\*-Ac, fracción en la que mediremos la radiactividad y en el sobrenadante los Ag, Ag\* y Ac libres, que descartamos.

La sensibilidad de la curva patrón de prolactina es de 0,04ng/mL según se describe en la figura 6. La precisión ínter ensayo se valoró analizando una misma mezcla de plasmas en 5 ensayos distintos, encontrándose un coeficiente de variación del 9%. El coeficiente de variación intra ensayo de 8 medidas de un mismo plasma fue del 7%. El RIA de prolactina se puso a punto en nuestro laboratorio en 1976 (*Esquifino*), y se ha venido usando en distintos trabajos del grupo hasta el momento *presente* (*Esquifino y cols, 1999b; Esquifino y cols, 1999c; García-Bonacho y cols, 2000*).

La figura 6 representa una curva patrón tipo de prolactina, obtenida en las condiciones anteriormente mencionadas.

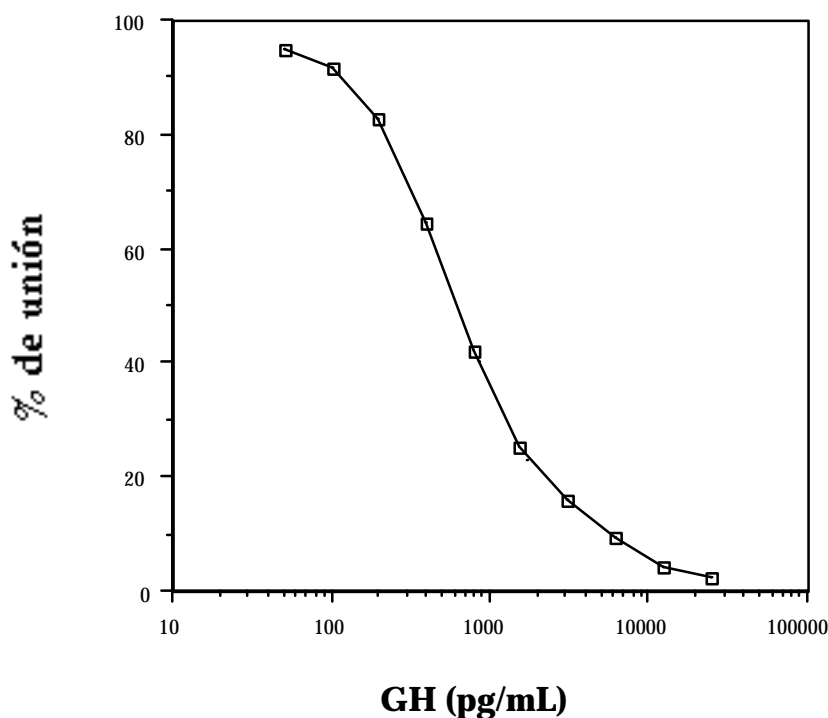


**Figura 6.-** Curva patrón de prolactina.

La sensibilidad de la curva patrón de GH es de 0,04ng/mL según se describe en la figura 7. La precisión ínter ensayo se valoró analizando una misma mezcla de plasmas en 5 ensayos distintos, encontrando un coeficiente de variación del 10%. El coeficiente de variación intra ensayo de 8 medidas de un mismo plasma fue del 7,4%.

El RIA de GH se puso a punto en nuestro laboratorio en 1987 (*Esquifino y cols, 1987a*), y se ha venido usando en distintos trabajos del grupo hasta la actualidad (*Esquifino y cols, 1999b; Castrillón y cols, 2001*).

En la figura 7 se representa una curva patrón tipo de GH, obtenida en las condiciones anteriormente mencionadas.



**Figura 7.-** Curva patrón de GH.

#### *d.1.2.- Radioinmunoanálisis de somatostatina*

La determinación de la concentración de somatostatina en hipotálamo anterior y mediobasal, en eminencia media y en adenohipófisis, se ha realizado mediante un radioinmunoanálisis.

##### *d.1.2.1.- Preparación de las muestras*

La disección del hipotálamo anterior y mediobasal se ha efectuado según la técnica descrita en Esquifino y cols, 1999a. Posteriormente, estas áreas hipotalámicas, la eminencia media y la adenohipófisis, se sumerge en ácido acético 2 N frío, ya que el ácido lleva a cabo la desnaturalización enzimática, con lo que se bloquean las reacciones catalizadas por enzimas, disminuyéndose al máximo la pérdida de moléculas de la muestra, asociadas al catabolismo y no al experimento.

Las muestras se sonicán para conseguir una rotura tisular y celular completa con la consiguiente liberación de las moléculas presentes en el interior celular. A continuación se procede a su centrifugación a 11000 rpm. 10 minutos a 4°C, para que precipiten los restos celulares y quede en el sobrenadante las moléculas de menor peso molecular, entre ellas las catecolaminas, indolaminas y sus productos de degradación, que posteriormente son medidas por el sistema de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detector electroquímico.

Parte de este sobrenadante se congela a -80°C hasta el momento de realizar la determinación del contenido de las aminas citadas mediante HPLC acoplado a un detector electroquímico. Mientras que el resto del sobrenadante hierve 10 minutos y se centrifuga a 17000 rpm 30 minutos a 4°C, separando sobrenadante y precipitado. El sobrenadante se guarda a -80°C para medir GABA y taurina por HPLC asociado a un detector de fluorescencia o para medir somatostatina mediante un radioinmunoanálisis.

#### ***d.1.2.2.- Tampones y reactivos***

- ❖ Tampón I: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,04mol/l, NaCl 0,14mol/l y EDTA 0,025mol/l, albúmina bovina 0,25%, pH= 7,4.
- ❖ Suspensión de carbón-dextrano (0,25% carbón y 0,025% dextrano) en tampón fosfato que contiene 0,9% de NaCl.

#### ***d.1.2.3.- Marcaje de somatostatina***

La radioyodación de Tyr<sup>1</sup>-somatostatina se realizó según el método de la lactoperoxidasa descrito por Thorell y Johansson en 1971. Está basado en la oxidación por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en presencia de lactoperoxidasa, del yoduro radiactivo a yodo atómico, que se introduce en uno de los carbonos del grupo tirosilo de la hormona. La acción de la lactoperoxidasa se detiene al cabo de 4 minutos por dilución con una solución de albúmina bovina al 1%.

La purificación del neuropéptido radio yodado de los demás productos de la reacción se realizó con un gradiente lineal de acetato amónico por cromatografía de intercambio iónico en celulosa CM-52.

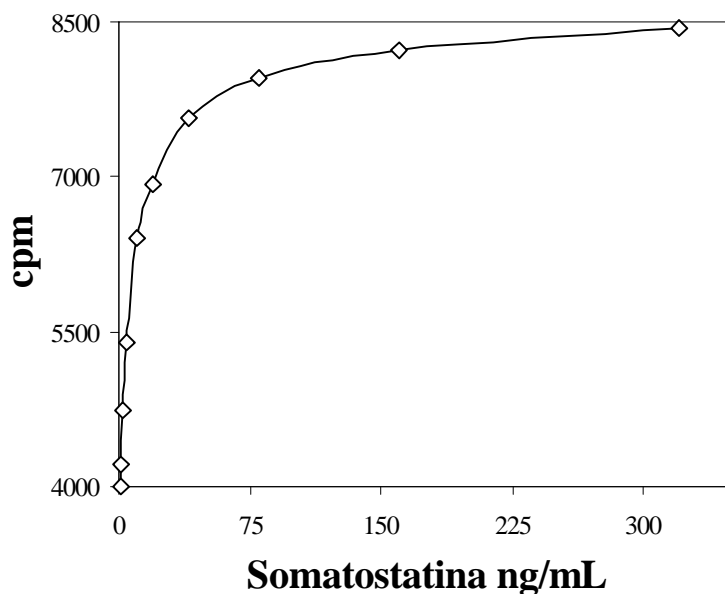
#### *d.1.2.4.- Protocolo de experimentación para somatostatina*

El RIA de somatostatina se realizan siguiendo el protocolo detallado a continuación:

- a) Se pipetea 100µL de anticuerpo específico para somatostatina diluido, 500µL de somatostatina marcada con Na<sup>125</sup>I, y 100µL de muestra o bien de las soluciones estándar de somatostatina en tubos de 4 mL. Asimismo, se utilizaron tubos que contenían 500µL de somatostatina marcada, indicadores de la actividad total. Se incuban 48 horas a 4°C.
- b) A continuación se añade 1 mL de la suspensión carbón-dextrano en tampón fosfato, que contiene 0,9% de NaCl, a todos los tubos excepto a los que sólo contuvieron la actividad total.
- c) Tras incubación 45 minutos a 4°C, los tubos se centrifugan a 3000 rpm 10 minutos; Después se aspira el sobrenadante y finalmente se mide la radiactividad del precipitado en un contador de partículas gamma (cuentas por minutos=cpm).

La sensibilidad del radioinmunoensayo fue de 0,625 ng/mL como aparece en la figura 8. La precisión interensayo se valoró analizando una misma mezcla de plasmas en 5 ensayos distintos, encontrando un coeficiente de variación del 2,5%. El coeficiente de variación intraensayo de 8 medidas de un mismo plasma fue de 3,79%.

El RIA de somatostatina se puso a punto en nuestro laboratorio en 1999 (*Esquifino y cols, 1999a*), y se ha venido usando en distintos trabajos del grupo hasta la actualidad.



**Figura 8.-** Curva patrón de somatostatina.

**d.2.- Determinación de aminas biógenas y melatonina por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), con detector electroquímico**

La determinación de las concentraciones de aminas biógenas en hipotálamo anterior y mediobasal, en eminencia media y en adenohipófisis, y de melatonina en glándula pineal, se realiza por HPLC con detección electroquímica.

Este método fue introducido por Kissinger y cols. (1973) y se basa en las reacciones electroquímicas que tienen lugar en la superficie de un electrodo, trabajando con moléculas intactas.

***d.2.1.- Determinación de aminas biógenas***

En este estudio se han determinados la concentración de las siguientes aminas biógenas: NA, DA, DOPAC, 5-HT y 5-HIAA en el hipotálamo anterior, mediobasal, eminencia media y adenohipófisis.



#### ***d.2.1.1.- Preparación de las muestras***

La preparación de las muestras se ha descrito en el apartado d.1.2.1. Durante el proceso de extracción y procesamiento, se mantuvieron aisladas de la luz con papel de aluminio, ya que la concentración de catecolaminas e indolaminas presentes puede verse afectada por efecto de la luz (*Eriksson y Persson, 1982*).

#### ***d.2.1.2.- Tampones y reactivos***

- ❖ Fase móvil: compuesta por un tampón acetato 0,1M/citrato 0,1M con EDTA 0,57 mM, octil sulfato sódico (SOS) 0,7 mM como contra ión y 10% de metanol como modificador orgánico. El pH se ajusta a 4 con NaOH 5 N antes de añadir el metanol y se desgasifica en un baño de ultrasonidos.

#### ***d.2.1.3.- Componentes del sistema cromatográfico***

El sistema cromatográfico empleado en nuestro laboratorio para la medida de aminas biógenas está compuesto por:

- ❖ Bomba (Kontron 422 MASTER, Massachusetts, EE.UU.) que impulsa la fase móvil a lo largo del sistema a un flujo constante.
- ❖ Inyector automático (232 XL GILSON, Viliers-le-Bel, Francia) con una válvula de dos posiciones (Rheodyne 7125, EE.UU.) y un cargador de 20µL.
- ❖ Columna con relleno de nucleosil 100 C18, con un diámetro de poro de 5µm, un diámetro interno de 4,6 mm y una longitud de 150 mm (Teknokroma, Barcelona, España).
- ❖ Las células electroquímicas se encuentran situadas en serie a la salida de la columna, y permiten la reducción y oxidación de los distintos componentes de la muestra:
  - a) La primera célula de acondicionamiento posee un filtro con un tamaño de poro de dos micras que evita la entrada de partículas sólidas al sistema. Esta célula

cuenta, además, con un electrodo de trabajo coulométrico (modelo 5021, Kontron instruments, ESA. Inc., Bedford, Massachusetts, EE.UU.).

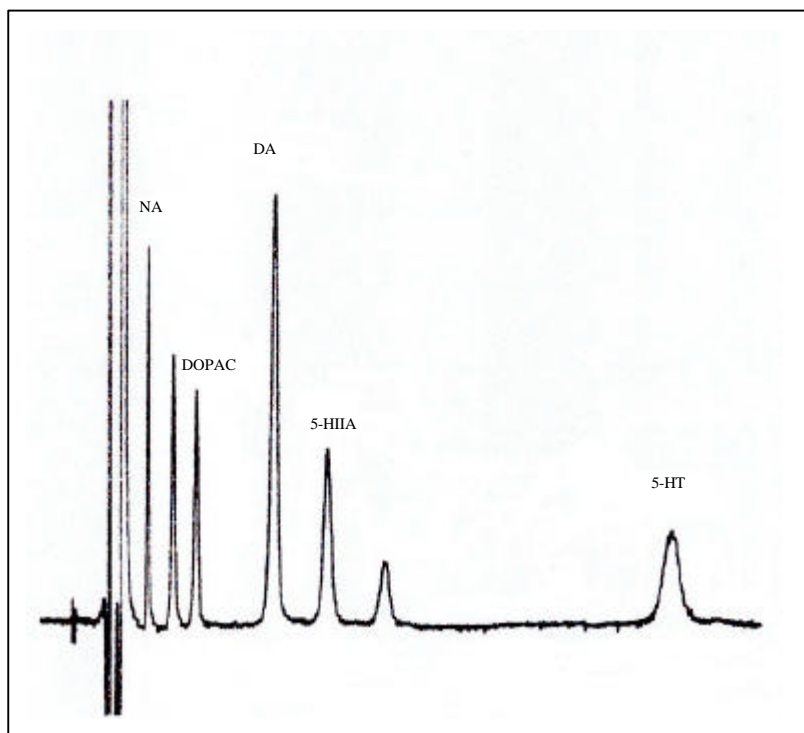
- b) La segunda es una célula analítica con un primer electrodo coulométrico y un segundo electrodo amperométrico, situado en serie con el primero, cada uno con su correspondiente electrodo de referencia (modelo 5011, Kontron instruments, ESA. Inc., Bedford, Massachusetts, EE.UU.). Los electrodos coulométricos tienen mayor superficie que los amperométricos, lo cual permite que la reacción redox tenga lugar sobre el 95-100% de la sustancia circulante, frente al 1-5% que experimenta la reacción en los electrodos amperométricos, lo cual proporciona mayor estabilidad de la respuesta con el tiempo, aunque disminuye la sensibilidad debido al aumento del ruido. Cada electrodo de trabajo lleva asociado un electrodo de referencia, que en nuestro caso son electrodos normales de hidrógeno.

- ❖ Detector Coulochem II (Kontron instruments, ESA. Inc., Bedford, Massachusetts, USA), capaz de reconocer la señal producida en las células. Así, al oxidarse las moléculas se produce un paso de electrones que induce un paso de corriente cuya intensidad es medida por el detector y que es proporcional a la concentración de sustancia que experimenta el proceso redox.
- ❖ Integrador (Spectra-physics 4600, San Jose, California), que comunica con el detector.

#### ***d.2.1.4.- Condiciones de estudio***

Para poder llevar a cabo esta técnica es necesario que el sistema cromatográfico se mantenga a temperatura controlada entre 18 y 20°C, con un flujo constante (1 mL/minuto) que nos permita la separación adecuada de los componentes de la muestra que eluyen en la fase móvil de catecolaminas. Además, se seleccionan los potenciales, que fueron de -0,40 V en la célula de acondicionamiento, de +0,10 V en el primer electrodo de la célula analítica y de +0,35 V en el segundo. Este último electrodo es el que está conectado con el detector, por lo que su potencial debe de ser el adecuado para oxidar las distintas moléculas que queremos analizar. Los dos electrodos precedentes actúan como filtros, disminuyendo las posibles interferencias.

Una vez establecidas las condiciones indicadas, las muestras se inyectan automáticamente en el sistema cromatográfico incluyendo un estándar externo cada 4 muestras (concentraciones conocidas de NA, DA, DOPAC, 5-HT y 5-HIA). Ello permite comprobar tanto las variaciones importantes en la señal recibida por el detector y como los tiempos de retención de las aminas biógenas y las concentraciones a que se encuentran en las muestras analizadas.



**Figura 9.-** Ejemplo de un cromatograma de aminas biógenas partir de concentraciones conocidas, obtenido con las condiciones cromatográficas descritas anteriormente.

Además, se ha comprobado si la respuesta del detector de aminas biógenas es lineal dentro de los rangos de concentración en que se ha trabajado.

Los resultados obtenidos se estudian con relación a la concentración de proteínas de cada muestra y se expresan en pg de amina biógena/ $\mu$ g de proteína.

### *d.2.2.- Determinación de melatonina*

#### ***d.2.2.1.- Preparación de las muestras***

Para la determinación de melatonina por HPLC es necesario realizar un procesamiento de la muestra distinto al utilizado para las aminas biógenas, a pesar de que su sistema de detección sea el mismo. La glándula pineal se homogeniza en 300µL de tampón sódico-fostato 0,1M, con un pH 6,5. A continuación se realiza la extracción de la muestra. Para ello se añade 3mL de cloroformo y se centrifuga a 2500 rpm, 3 minutos a 4°C. Tras descartar el sobrenadante el exceso de cloroformo se evaporó mediante una corriente de N<sub>2</sub>. Las muestras se reconstituyen en 100µL de fase móvil y se lavan con 500µL de pentano. A continuación se centrifuga de nuevo, 2 minutos a 2500 rpm y se retira la fase de pentano con una pipeta. La solución que queda tras la evaporación se inyecta en el sistema de HPLC para la cuantificación de melatonina.

#### ***d.2.2.2.- Tampones y soluciones***

- ❖ Fase móvil: Tampón fosfato 50mM con 20% de acetonitrilo, pH 3,5. Se desgasifica con un baño de ultrasonidos.

#### ***d.2.2.3.- Componentes del sistema cromatográfico***

Los componentes del sistema cromatográfico empleado en la determinación de melatonina es semejante al empleado para la detección de aminas biógenas descrito en el apartado d.2.1.3. En este caso la columna empleada es similar a la utilizada en la detección de aminas biógenas, sólo que con longitud de 100mm (Teknokroma, Barcelona, España).

#### ***d.2.2.4.- Condiciones de estudio***

Para poder llevar a cabo esta técnica es necesario que el sistema cromatográfico se mantenga a temperatura controlada entre 18°C y 20°C, con un flujo constante de 1mL/minuto. Además, se seleccionan los potenciales, de acuerdo con el potencial de reducción/oxidación de la melatonina. En concreto fueron de 0 V en la célula de acondicionamiento, +0,10 V en el primer electrodo de la célula analítica y de + 0,60 V en el segundo.

Una vez establecidas las condiciones señaladas, las muestras se inyectan automáticamente en el sistema cromatográfico incluyendo un estándar externo cada 4 muestras (concentraciones conocidas de melatonina). Ello permite comprobar que no existen variaciones importantes en la señal recibida por el detector y conocer los tiempos de retención de melatonina y las concentraciones a que se encuentran en las muestras analizadas.

Además, se ha comprobado si la respuesta del detector de aminas biógenas es lineal dentro de los rangos de concentración en que se ha trabajado.

Los resultados obtenidos se estudian con relación a la concentración de proteínas de cada muestra y se expresan en ng/pineal

### **d.3.- Determinación de aminoácidos por HPLC con detección de fluorescencia**

Los aminoácidos (taurina y GABA) fueron analizados mediante HPLC con detección de fluorescencia. Para ello previamente se realiza la reacción de derivatización con o-phthalaldehído (OPA), que produce un compuesto que emite fluorescencia.

#### ***d.3.1.- Preparación de las muestras***

La preparación de las muestras en las que se va a analizar la concentración de aminoácidos se ha descrito d.1.2.1.

#### ***d.3.2.- Tampones y reactivos***

##### ***Tampones***

- ❖ Fase móvil A: Tampón acetato 0,1 N y 35% metanol con un pH=6,75. Se pesan 8,203g de acetato sódico al cual se añade aproximadamente 650mL de agua bidestilada; se ajusta el pH a 6,75 con acético 2N; se añade 35 mL de metanol. Se desgasifica con un baño de ultrasonidos.

- ❖ Fase móvil B: agua-metanol 70%. Se preparan 700mL de metanol y se añaden 300mL de agua bidestilada. Se desgasifica con un baño de ultrasonidos.

### ***Reactivos***

- ❖ OPA: 32 mg O-phytaldehido, 800µL de metanol (para disolver la OPA), 7140µL borato potásico (pH= 9,5) formado a partir de 9,9g de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> y 5,2 g de KOH en 100 mL de agua bidestilada, y 55µL β-Mercaptoetanol.
- ❖ L- homoserina: 8,4mg de L-homoserina en 1mL de agua bidestilada. Después se realizan diluciones 1:100 y 1:50, obteniendo una concentración final de 1,6µg/mL.
- ❖ Acido acético 5%.
- ❖ Sosa 4N.

### *d.3.3.- Componentes del sistema cromatográfico*

En el sistema cromatográfico podemos distinguir varios componentes:

- ❖ Bomba (Kontron 422 MASTER, Massachussets, USA) para impulsar dos fases móviles diferentes a través del sistema con un flujo previamente fijado de un 1mL/minuto:
  1. Fase móvil A: Tampón acetato 0,1 N y 35% de metanol con un pH=6,75.
  2. Fase móvil B: Agua-metanol 70%.
- ❖ Jeringa de 200 microlitros (Unimetrics, Illinois, USA) para introducir la muestra en el sistema a través de un puerto de inyección (Reodyne 7125, USA), con un cargador de 20 µL
- ❖ Columna, a través de la cual pasa la muestra y se separan los componentes. La columna elegida tiene 150 mm de longitud y 4,6 mm de diámetro interno. Está rellena de nucleosil 100 C18 5 µm (Teknokroma, S. Coop. C. Ltda.).

- ❖ Detector de fluorescencia (FluoroMonitor™ 4100, Programmable Fluorescence Detector, Micron Analítica S.A. La fluorescencia se produce cuando las muestras son sometidas a una reacción de derivatización en presencia de OPA, antes de introducirlas en el sistema. El uso de este reactivo para la determinación de aminoácidos fue establecido por Roth en 1971.
  
- ❖ Registrador.

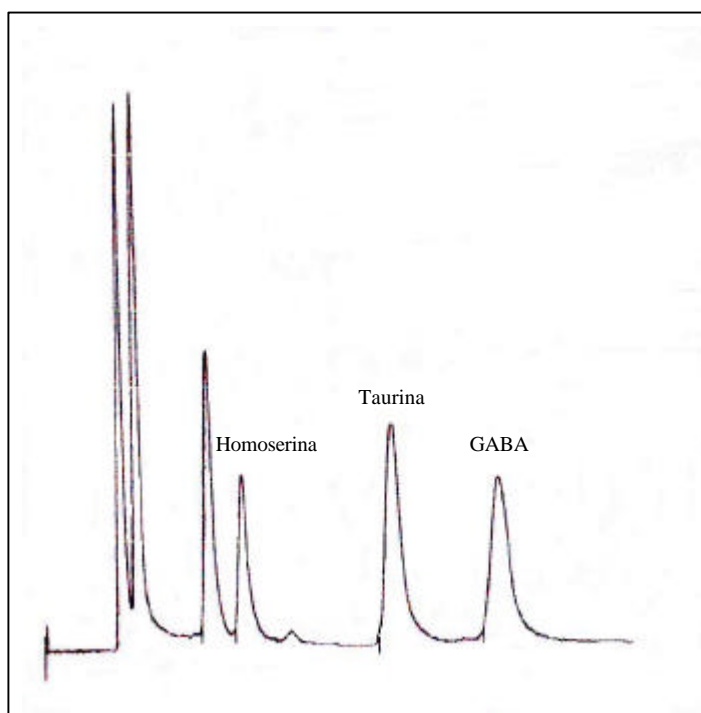
#### *d.3.4.- Condiciones de estudio*

Para poder llevar a cabo esta técnica es necesario que el sistema cromatográfico se mantenga a temperatura controlada entre 18 y 20°C, con un flujo constante (1 mL/minuto) que nos permite la separación adecuada de los componentes de la muestra que eluyen en la fase móvil A. La técnica consiste en:

- a) Reacción de derivatización, que consiste en añadir sucesivamente y en el orden indicado:
  - a.1.- 20µL de homoserina (estándar interno)
  - a.2.- 15µL de NaOH, para alcalinizar y facilitar la reacción.
  - a.3.- 40µL de OPA, se agita en el vortex y se deja reaccionar un minuto
  - a.4.- Por último se añaden 20µL de acético 5% para la reacción.
- b) Inyectar la muestra en el sistema mediante una válvula de dos posiciones (Reodyne). El tiempo que tarda la muestra en eluir a lo largo del sistema es de 15 minutos.
- c) Limpieza del inyector para lo que ponemos el sistema en fase B 8 minutos como mínimo.
- d) Estabilización del sistema. Para ello cambiamos la fase B por la fase A. Antes de volver a inyectar otra muestra deberá circular la fase A al menos 5 minutos.

La recta patrón se realiza para determinar la linealidad entre las concentraciones conocidas decrecientes de los aminoácidos objetos de estudio (1,46ng/µL, 0,72ng/µL, 0,36ng/µL y 0,182ng/µL) y la relación área de GABA o de Taurina/ área de homoserina (estándar interno).

Esta relación permite comprobar si la respuesta del detector de aminoácidos es lineal dentro de los rangos de concentración anteriormente mencionados, y obtener los tiempos de retención para los aminoácidos de la muestra y la concentración a que se encuentran en las muestras analizadas.



**Figura 10.-** Ejemplo de un cromatograma de aminoácidos partir de concentraciones conocidas, obtenido con las condiciones cromatográficas descritas anteriormente.

Por último, los resultados obtenidos se estudian con relación a la concentración de proteínas de cada muestra y se expresan como ng de aminoácido/ $\mu$ g de proteína.

#### **d.4.- Cuantificación de proteínas**

Para la cuantificación de proteínas se utiliza el método descrito por Bradford (1976), el cual presenta más ventajas que el descrito por Lowry y cols. (1951), ya que es más sencillo, la absorbancia del complejo coloreado es más estable y presenta menos interferencias.

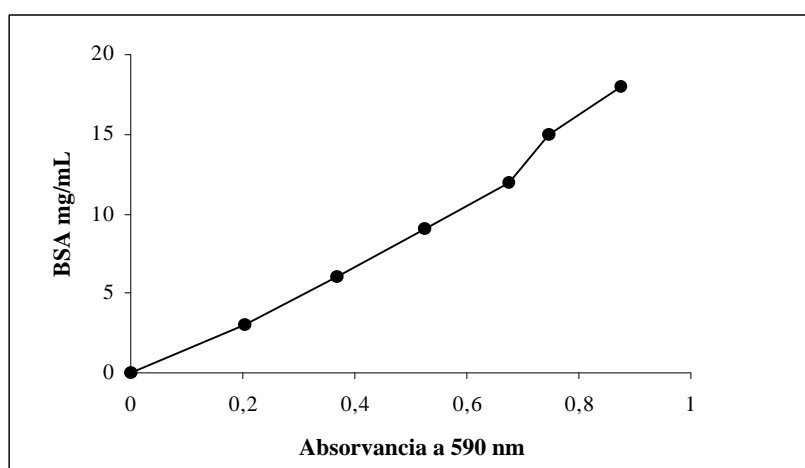


#### d.4.1.- Soluciones

- ❖ Reactivo Bradford: 0,01% (p/v) de Coomassie Brilliant Blue G-250; 4,7% (p/v) de etanol absoluto; y 8,5% (p/v) de ácido fosfórico. Este reactivo se compra ya preparado (Bio-Rad).
- ❖ Solución de proteína patrón: Se prepara una solución madre de BSA (Sigma) a una concentración 1 mg/mL. Se mantiene a -20°C en alícuotas de 1 mL.

#### d.4.2.- Preparación de la recta patrón

A partir de la solución madre de BSA congelada se obtiene los distintos puntos de la recta en tubos de poliestireno, para obtener las concentraciones de 0, 3, 6, 9, 12, 15 y 18  $\mu\text{g/mL}$ . Para ello se pipetea la cantidad necesaria de la solución madre (que se desecha tras su descongelación), un volumen acético 2N igual a la cantidad de muestra que se considera adecuada, y se completa hasta 800 $\mu\text{L}$  con agua bidestilada.



**Figura 11.-** Curva patrón de BSA.

#### *d.4.3.- Ensayo colorimétrico*

- a) Se pipetea la cantidad de muestra adecuada en tubos de poliestireno, y se completa el volumen hasta 800 $\mu$ L con agua bidestilada. El tubo "blanco" lleva una cantidad del medio en el que van las muestras (para anular las posibles interferencias que presente aquél), y agua bidestilada hasta un volumen de 800 $\mu$ L.
- b) Se añaden 0,2 mL del reactivo Bradford a todos los tubos y agitamos, evitando en lo posible la formación de espuma. Podemos medir entonces la absorbancia a 595nm (DO595), en un espectrofotómetro (Perkin-Elmer, mod. Lambda Bio UV/VIS Spectrometer), en un periodo de cinco minutos a una hora desde que se añade el reactivo Bradford.
- c) Se representa entonces la DO595 con respecto a la concentración de proteína. En esta recta interpolamos los valores de absorbancia a 595 nm de las muestras problema, y calculamos así su concentración.

#### **d.5.- Análisis estadístico de los datos**

Los datos se han estudiado mediante análisis de la varianza (ANOVA) seguido de un ANOVA factorial para muestras apareadas y de un análisis de regresión lineal y polinómica realizados con el programa Statview<sup>TM</sup> SE + Graphics de Macintosh. Los valores de las figuras se expresan como la media  $\pm$  el error estándar de la media (e.e.m.). El nivel de confianza a partir del cual las diferencias entre las medias fueron consideradas significativas fue mayor o igual al 95% ( $p < 0,05$ ); por debajo de ese nivel la hipótesis fue rechazada.

---

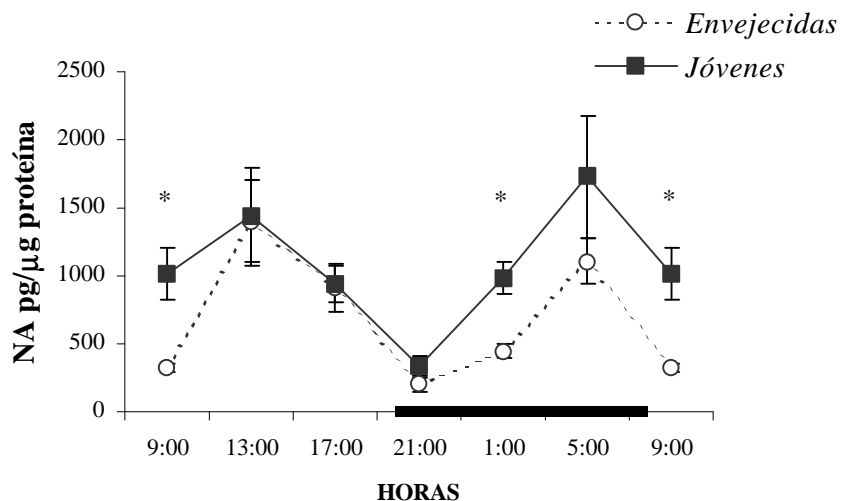
**RESULTADOS**

## A) ENVEJECIMIENTO EN EL HIPOTÁLAMO, EN LA EMINENCIA MEDIA Y EN LA ADENOHIPÓFISIS

### a.1.- Hipotálamo anterior

#### a.1.1.- Patrón diario de concentración de NA en animales jóvenes y envejecidos.

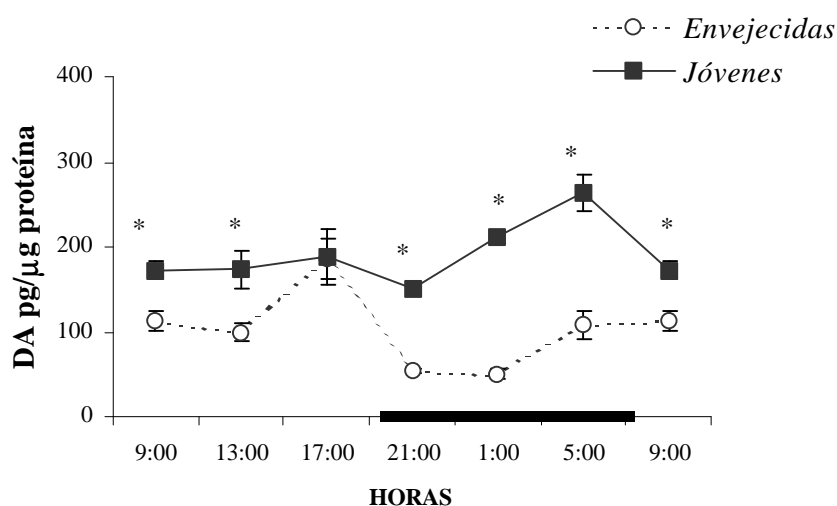
El patrón diario de concentración de NA en el hipotálamo anterior en ratas macho adultas jóvenes y envejecidas, se representa en la figura 12. En las ratas jóvenes, el contenido de este neurotransmisor presenta variaciones diarias estadísticamente significativas ( $F=2,79$   $p=0,0386$ ), con dos máximos de concentración, uno a las 13:00 horas, durante el periodo luminoso, y otro a las 05:00 horas durante la fase oscura del fotoperiodo. En los animales envejecidos, el contenido diario de NA en esta área del hipotálamo disminuye significativamente ( $F=6,2001$   $p=0,0171$ ) al compararlo con el valor obtenido en animales jóvenes. Sin embargo, el patrón diario de este neurotransmisor con dos picos de contenido, que ha sido previamente descrito para los animales jóvenes, no se modifica ( $F=6,699$   $p=0,009$ ).



**Figura 12.-** Patrón diario de contenido de NA de ratas macho jóvenes y envejecidas, en el hipotálamo anterior. Analizado mediante una ANOVA de una vía, la concentración de este neurotransmisor disminuye significativamente a las 09:00 horas y a las 01:00 horas durante el envejecimiento ( $F=12,97$   $p=0,007$ ;  $F=21,83$   $p=0,0055$ , respectivamente). Los datos se expresan como media  $\pm$  eem. \* $p<0,05$ .

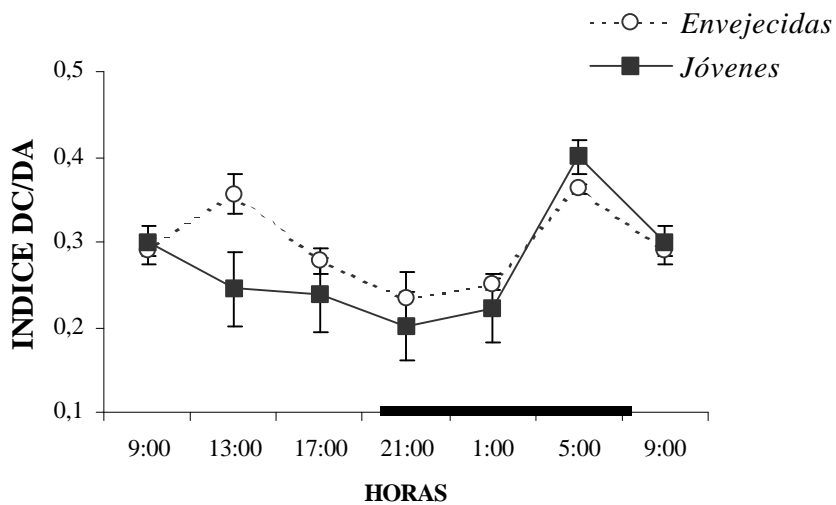
**a.1.2.- Patrones diarios de concentración de DA y del índice DOPAC/DA en animales jóvenes y envejecidos.**

El patrón diario de concentración de DA en el hipotálamo anterior en ratas macho adultas jóvenes y envejecidas se muestra en la figura 13. En animales jóvenes, el contenido de DA presenta cambios diarios significativos ( $F=3,76$   $p=0,013$ ), con un máximo a las 05:00 horas. En animales envejecidos, se produce un adelanto de fase del pico máximo de contenido hasta las 17:00 horas, al mismo tiempo que se produce una disminución significativa de los niveles diarios de concentración ( $F=6,95$   $p=0,001$ ), al compararlos con los obtenidos en animales jóvenes.



**Figura 13.-** Patrón diario de contenido de DA en ratas macho adultas jóvenes y envejecidas, en el hipotálamo anterior. Analizado mediante una ANOVA de una vía, el contenido de este neurotransmisor en animales envejecidos en el hipotálamo anterior disminuye significativamente a las 09:00 horas ( $F=14,02$   $p=0,0057$ ), a las 13:00 horas ( $F=8,83$ ,  $p=0,0178$ ), a las 21:00 horas ( $F=249,8$   $p=0,0001$ ), a las 01:00 horas ( $F=279,2$   $p=0,0001$ ) y a las 05:00 horas ( $F=34,86$   $p=0,001$ ), con respecto a los datos obtenidos en las ratas jóvenes. Los datos se expresan como media  $\pm$  eem. \* $p<0,05$ .

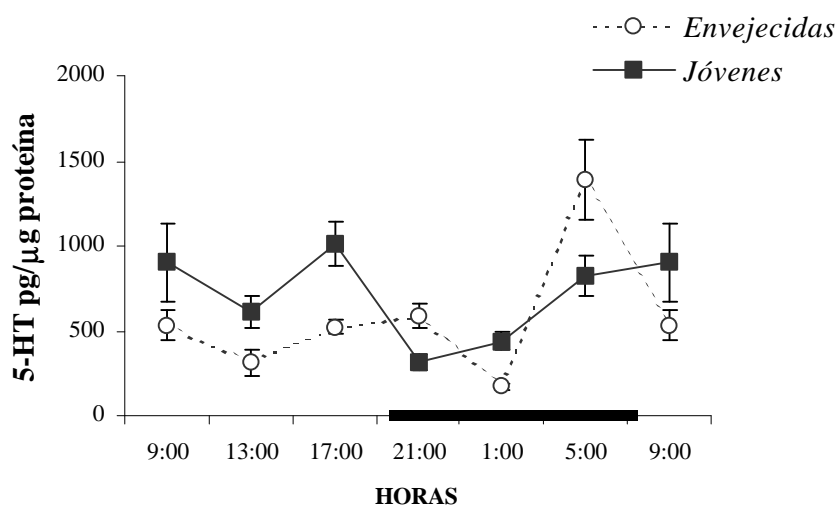
El metabolismo de DA, expresado como el índice DOPAC/DA en ratas macho adultas jóvenes y envejecidas, se observa en la figura 14. En animales jóvenes, la tasa de recambio de DA muestra variaciones diarias significativas ( $F=3,48$   $p=0,0224$ ), con valores máximos a las 05:00 horas. En animales envejecidos se observa un patrón diario en la tasa de recambio de DA similar al descrito en animales jóvenes, con el máximo a la misma hora ( $F=8,11$   $p=0,0005$ ).



**Figura 14.-** Patrón diario del metabolismo de DA de ratas adultas jóvenes y envejecidas, en el hipotálamo anterior. Analizado mediante una ANOVA de una vía, se encontraron variaciones significativas en el índice DOPAC/DA a lo largo del ciclo de luz-oscuridad 12:12 en los dos grupos de animales estudiados ( $F=3,48$   $p=0,0224$ ;  $F=8,11$   $p=0,0005$  respectivamente). Los datos se expresan como media  $\pm$  eem.

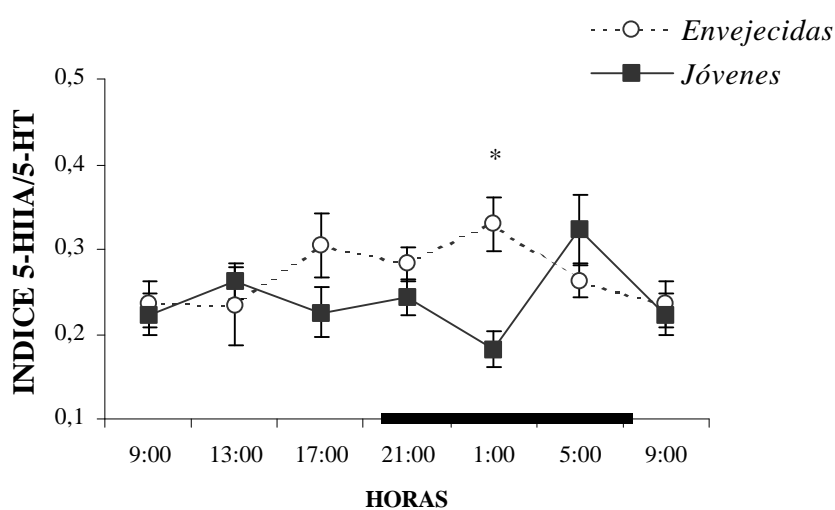
**a.1.3.- Patrones diarios de concentración de 5-HT y del índice 5-HIA/5-HT en animales jóvenes y envejecidos**

Los cambios diarios en la concentración de 5-HT en el hipotálamo anterior, de ratas macho adultas jóvenes y envejecidas, se observan en la figura 15. Los resultados muestran que el contenido de este neurotransmisor en animales jóvenes presenta variaciones diarias significativas ( $F=4,45$   $p=0,0059$ ), con el máximo de concentración a las 17:00 horas, durante el periodo luminoso del fotoperiodo. En los animales envejecidos se observan variaciones diarias significativas en el contenido de 5-HT ( $F=12,26$   $p=0,0001$ ), aunque el máximo de concentración presenta un retraso de fase hasta las 05:00 horas, al compararlo con el patrón previamente descrito en animales jóvenes.



**Figura 15.-** Patrón diario de contenido de 5-HT en el hipotálamo anterior de ratas macho adultas jóvenes y envejecidas. Analizado mediante una ANOVA de una vía, se observan variaciones significativas en el contenido de este neurotransmisor a lo largo del día en los animales jóvenes y envejecidos ( $F=4,45$   $p=0,0059$ ;  $F=12,26$   $p=0,0001$  respectivamente). Los datos se expresan como media  $\pm$  eem.

El metabolismo de 5-HT, expresado como el índice 5-HIAA/5-HT, en ratas macho jóvenes y envejecidas en el hipotálamo anterior, se observa en la figura 16. En los animales jóvenes, la tasa de recambio de 5-HT no varía significativamente a lo largo del día. Asimismo, en los animales envejecidos, el patrón diario del índice 5-HT/5-HIAA tampoco presenta variaciones significativas a lo largo del día. Sin embargo el metabolismo de 5-HT aumenta significativamente en los animales envejecidos con respecto a las ratas jóvenes a las 01:00 horas ( $F=13,26$   $p=0,0083$ ).

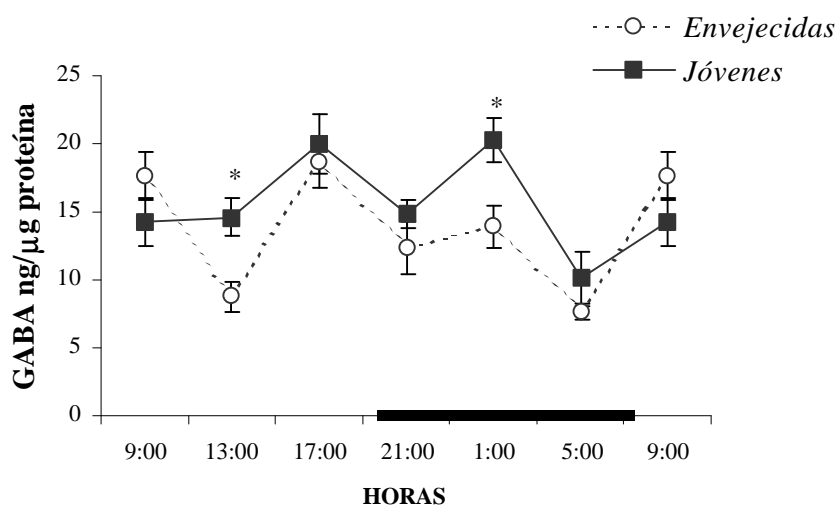


**Figura 16.-** Patrón diario del metabolismo de 5-HT en el hipotálamo anterior en ratas macho adultas jóvenes y envejecidas. Analizado mediante una ANOVA de una vía, el contenido de este neurotransmisor en animales envejecidos aumenta significativamente a las 01:00 horas ( $F=13,26$   $p=0,0083$ ), con respecto a los valores obtenidos en las ratas jóvenes. Los datos se expresan como media  $\pm$  eem. \* $p<0,05$ .



#### a.1.4.- Patrón diario de concentración de GABA en animales jóvenes y envejecidos

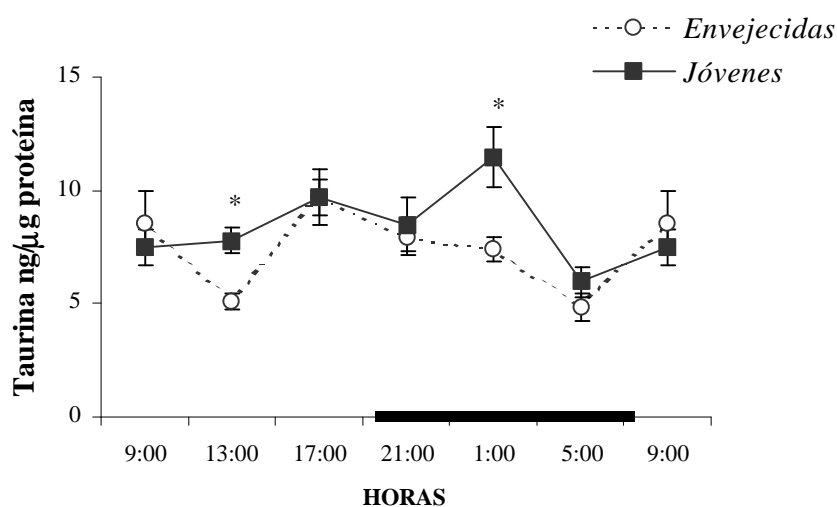
El patrón diario de concentración de GABA en el hipotálamo anterior en ratas macho adultas jóvenes y envejecidas, se muestra en la figura 17. En los animales jóvenes, el contenido de este neurotransmisor varía significativamente a lo largo del día ( $F=4,66$   $p=0,0047$ ) con dos máximos de concentración, uno a las 17:00 horas durante el periodo luminoso del fotoperiodo y otro a las 01:00 horas, durante la fase oscura del fotoperiodo. En los animales envejecidos, también se observan variaciones significativas a lo largo del día ( $F=6,01$   $p=0,0013$ ) con dos mínimos de contenido del neurotransmisor, uno a las 13:00 horas, durante la fase luminosa del fotoperiodo y el otro a las 05:00 horas, durante la fase oscura del fotoperiodo. Se muestra una disminución significativa en el contenido del neurotransmisor a las 13:00 horas y a las 01:00 horas ( $F=10,36$   $p=0,0123$ ;  $F=7,396$   $p=0,0347$  respectivamente), con respecto a los resultados obtenidos en los animales jóvenes adultos a esas mismas horas.



**Figura 17.-** Patrón diario de contenido de GABA en el hipotálamo anterior en ratas macho adultas jóvenes y envejecidas. Analizado mediante una ANOVA de una vía, la concentración de este neurotransmisor en los animales envejecidos disminuye significativamente a las 13:00 horas y a las 01:00 horas, con respecto a los resultados obtenidos en las ratas jóvenes ( $F=10,36$   $p=0,0123$ ;  $F=7,396$   $p=0,0347$  respectivamente). Los datos se expresan como media  $\pm$  eem. \* $p<0,05$ .

### a.1.5.- Patrón diario de concentración de taurina en animales jóvenes y envejecidos

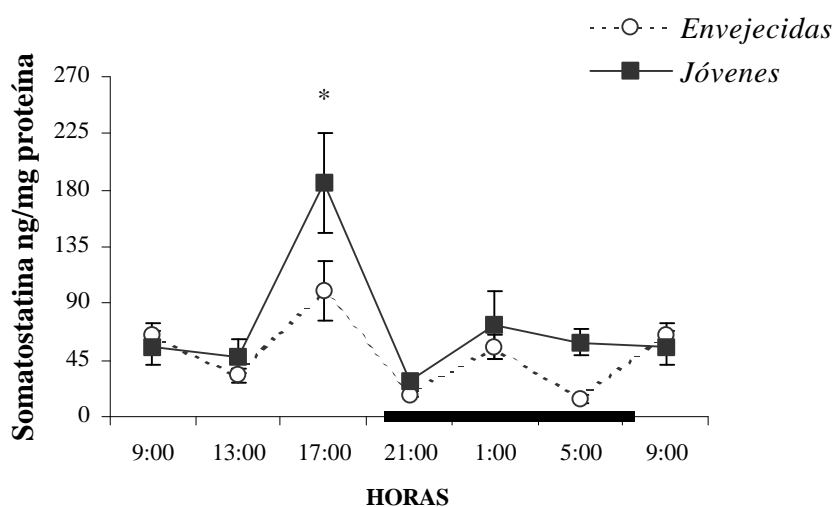
En la figura 18, se observa el patrón diario de concentración de taurina en el hipotálamo anterior de ratas macho adultas jóvenes y envejecidas. En animales jóvenes, el contenido de taurina muestra cambios diarios significativos a lo largo del día ( $F=3,189$   $p=0,0258$ ), observándose el máximo a las 01:00 horas. En las ratas envejecidas, la concentración de taurina presenta variaciones significativas a lo largo del día ( $F=4,57$   $p=0,0052$ ), con un mínimo de contenido del neurotransmisor a las 13:00 horas durante la fase luminosa del fotoperiodo y otro a las 05:00 horas, durante la fase oscura del fotoperiodo. Asimismo, se encuentran diferencias significativas en el contenido de taurina a las 13:00 horas ( $F=16,54$   $p=0,0036$ ) y a las 01:00 horas ( $F=11,53$   $p=0,0146$ ), cuando se comparan con los resultados obtenidos en el grupo de ratas jóvenes adultas.



**Figura 18.-** Patrón diario de contenido de taurina en el hipotálamo anterior de ratas macho adultas jóvenes y envejecidas. Analizado mediante una ANOVA de una vía, la concentración de este neurotransmisor disminuye significativamente a las 13:00 horas y a las 01:00 horas con la edad ( $F=16,54$   $p=0,0036$ ;  $F=11,53$   $p=0,0146$  respectivamente). Los datos se expresan como media  $\pm$  eem. \* $p<0,05$ .

### a.1.6.- Patrón diario de concentración de somatostatina en animales jóvenes y envejecidos

La figura 19, muestra el patrón diario de concentración de somatostatina en el hipotálamo anterior de ratas macho adultas jóvenes y envejecidas. En los animales jóvenes, el contenido de somatostatina muestra cambios significativos a lo largo del día ( $F=8,98$   $p=0,0002$ ), alcanzando su valor máximo a las 17:00 horas durante la fase luminosa del fotoperiodo. En los animales envejecidos, la concentración de este neuropéptido también muestra variaciones diarias significativas ( $F=5,71$   $p=0,0022$ ), con un patrón semejante al descrito previamente en los animales jóvenes. Sin embargo, los valores medios diarios de contenido de somatostatina disminuyen significativamente ( $F=9,015$   $p=0,0048$ ), al compararlos con los resultados obtenidos en el grupo de los animales jóvenes. En animales envejecidos se observa una disminución significativa de la amplitud del máximo de concentración observada en animales jóvenes a las 17:00 horas ( $F=12,18$   $p=0,0175$ ), tal como aparece en la figura 19.

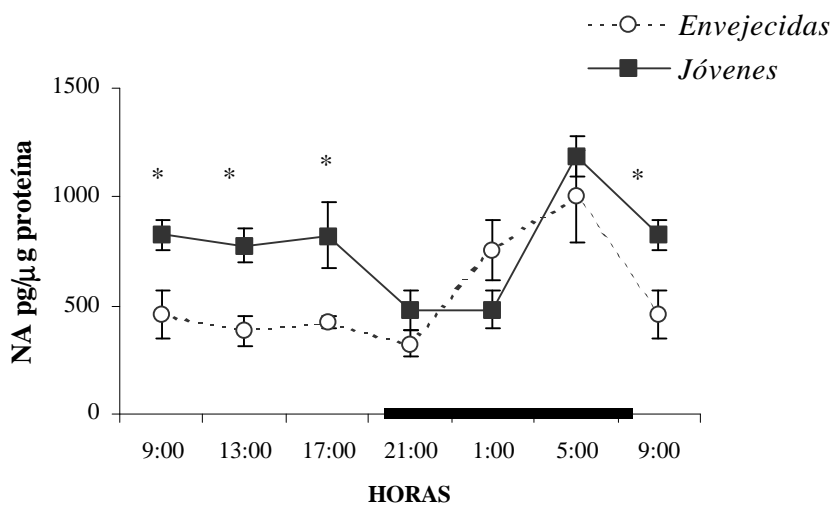


**Figura 19.-** Patrón diario de contenido de somatostatina en el hipotálamo anterior de ratas macho adultas jóvenes y envejecidas. Analizado mediante una ANOVA de una vía, el contenido de este neurotransmisor en los animales envejecidos disminuye significativamente a las 17:00 horas, con respecto a los datos obtenidos en las ratas jóvenes ( $F=12,18$   $p=0,0175$ ). Los datos se expresan como media  $\pm$  eem. \* $p<0,05$ .

## a.2.- Hipotálamo mediobasal

### a.2.1.- Patrón diario de concentración de NA en animales jóvenes y envejecidos

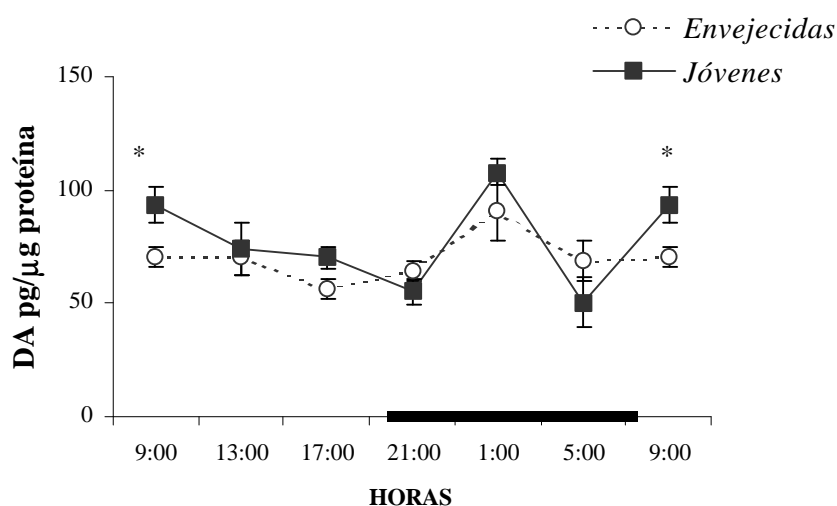
La figura 20 muestra el patrón de concentración de NA en el hipotálamo mediobasal en ratas macho adultas jóvenes y envejecidas. En los animales jóvenes, el contenido de este neurotransmisor muestra variaciones significativas a lo largo del día ( $F=6,033$   $p=0,035$ ), con un máximo a las 05:00 horas, durante la fase oscura del fotoperiodo. En los animales envejecidos se observa una disminución significativamente en el contenido diario de NA ( $F=7,86$   $p=0,0083$ ), fundamentalmente basándose en un descenso de la concentración de este neurotransmisor en los tiempos estudiados durante el periodo luminoso del fotoperiodo, a las 09:00 horas, a las 13:00 horas y a las 17:00 horas ( $F=7,9067$   $p=0,0307$ ;  $F=13,35$   $p=0,0147$ ;  $F=9,37$   $p=0,028$  respectivamente). Sin embargo, el patrón de concentración de NA descrito previamente en los animales jóvenes, no se modifica con la edad ( $F=4,33$   $p=0,0078$ ), como muestra la figura 20.



**Figura 20.-** Patrón diario de contenido de NA en el hipotálamo mediobasal en ratas macho jóvenes y envejecidas. Analizado mediante una ANOVA de una vía, el contenido de este neurotransmisor en los animales envejecidos disminuye significativamente a lo largo de la fase luminosa del fotoperiodo de luz-oscuridad, a las 09:00 horas ( $F=7,90$   $p=0,0307$ ), a las 13:00 horas ( $F=13,35$   $p=0,0147$ ) y a las 17:00 horas ( $F=9,37$   $p=0,028$ ), con respecto a los datos obtenidos en las ratas jóvenes. Los datos se expresan como media  $\pm$  eem. \* $p<0,05$ .

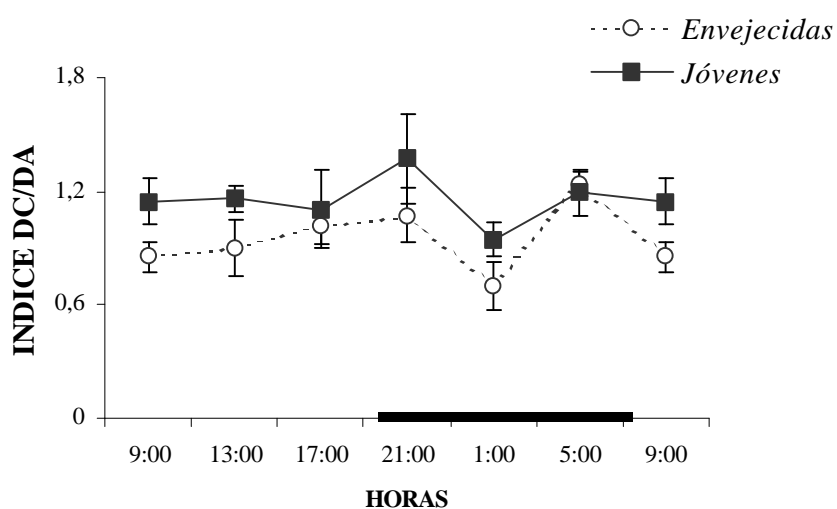
### a.2.2.- Patrones diarios de concentración de DA y del índice DOPAC/DA en animales jóvenes y envejecidos

El efecto de la edad, sobre el patrón diario de concentración de DA en el hipotálamo mediobasal de rata macho, se observa en la figura 21. En los animales jóvenes, el contenido de DA muestra variaciones significativas a lo largo de día ( $F=6,71$   $p=0,0007$ ), alcanzando el máximo de concentración a las 01:00 horas durante el periodo oscuro del fotoperiodo. Sin embargo, en los animales envejecidos, el contenido de este neurotransmisor no modifica su concentración en los tiempos estudiados a lo largo del día. Además, los niveles diarios muestran una tendencia a disminuir con la edad, principalmente por un descenso significativo del contenido de este neurotransmisor a las 09:00 horas, durante el periodo luminoso del fotoperiodo ( $F=6,44$   $p=0,0348$ ).



**Figura 21.-** Patrón diario de contenido de DA en el hipotálamo mediobasal de ratas macho adultas jóvenes y envejecidas. Analizado mediante una ANOVA de una vía, el contenido de este neurotransmisor en los animales envejecidos disminuye significativamente a las 09:00 horas, con respecto a los datos obtenidos en las ratas jóvenes ( $F=6,44$   $p=0,0348$ ). Los datos se expresan como media  $\pm$  eem. \* $p<0,05$ .

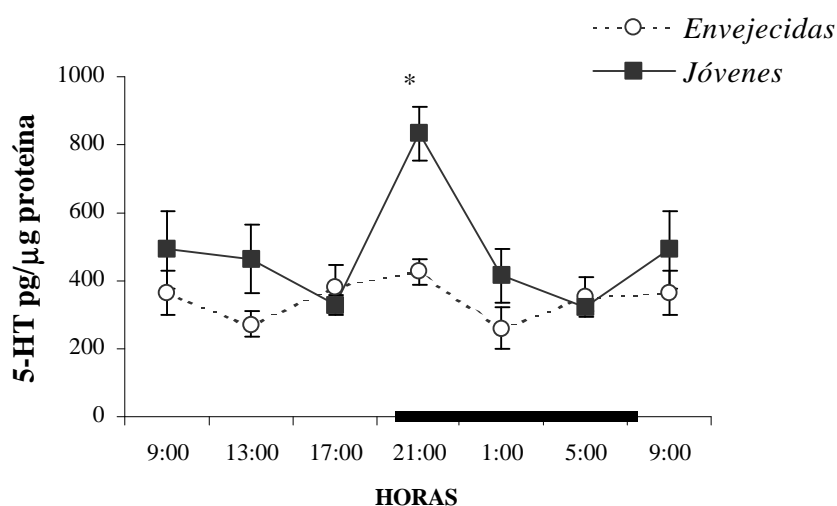
El efecto del envejecimiento sobre el metabolismo de DA en el hipotálamo mediobasal, expresado mediante el índice DOPAC/DA, se muestra en la figura 22. En los animales jóvenes, la tasa de recambio de DA no muestra variaciones significativas a lo largo del día, en los tiempos estudiados. En los animales envejecidos, el metabolismo diario de DA disminuye significativamente ( $F=5,15$   $p=0,0291$ ), sin mostrar variaciones a lo largo del día como ocurría en los animales jóvenes.



**Figura 22.-** Patrón diario del metabolismo de DA en el hipotálamo mediobasal en ratas macho adultas jóvenes y envejecidas. Analizado mediante una ANOVA de una vía, los niveles medios del índice DOPAC/DA en los animales envejecidos disminuye significativamente a lo largo del día, con respecto a los valores obtenidos en el grupo de ratas jóvenes ( $F=5,15$   $p=0,0291$ ). Los datos se expresan como media  $\pm$  eem.

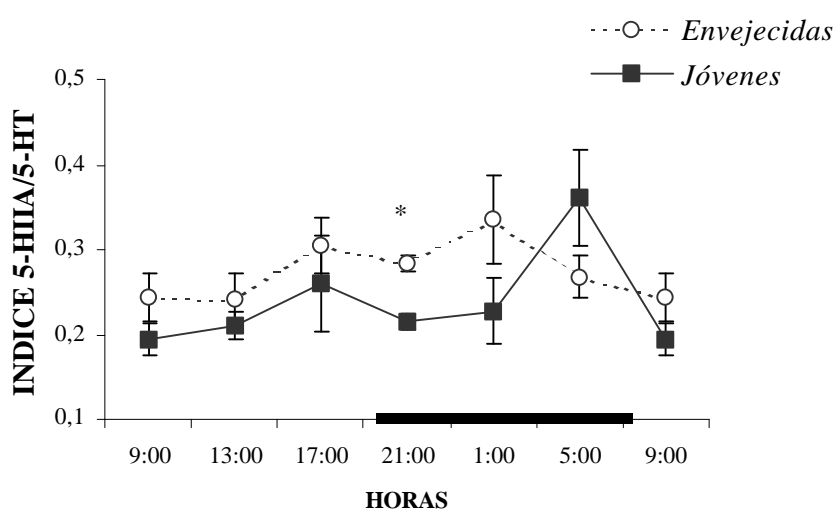
### a.2.3.- Patrones diarios de concentración de 5-HT y del índice 5HIA/5HT de animales jóvenes y envejecidos

El efecto de la edad sobre el patrón diario de 5-HT en el hipotálamo mediobasal, se observa en la figura 23. En los animales jóvenes, la concentración de este neurotransmisor varía significativamente a lo largo del día ( $F=4,10$   $p=0,0125$ ), alcanzando el valor máximo a las 21:00 horas durante la fase oscura del fotoperiodo. En los animales envejecidos, el pico de concentración observado en los jóvenes desaparece, mostrando valores similares en todos los tiempos estudiados a lo largo del día. El contenido diario de 5-HT disminuye significativamente ( $F=9,79$   $p=0,0033$ ), principalmente por la pérdida del pico máximo de contenido de 5-HT observado en los animales jóvenes a las 21:00 horas ( $F=24,94$   $p=0,0016$ ), tal como se observa en la figura 23.



**Figura 23.-** Patrón diario de contenido de 5-HT en el hipotálamo mediobasal en ratas macho adultas jóvenes y envejecidas. Analizado mediante una ANOVA de una vía, el contenido de este neurotransmisor en los animales envejecidos disminuye significativamente a las 21:00 horas, con respecto a los valores obtenidos en las ratas jóvenes ( $F=24,94$   $p=0,0016$ ). Los datos se expresan como media  $\pm$  eem. \* $p<0,05$ .

El metabolismo de 5-HT, expresado como el índice 5-HIA/5-HT en el hipotálamo mediobasal en ratas macho adultas jóvenes y envejecidas, se muestra en la figura 24. En los animales jóvenes, la tasa de recambio de este neurotransmisor presenta valores similares a lo largo del día. Asimismo, tampoco se encuentran modificaciones significativas en el metabolismo de este neurotransmisor en animales envejecidos a lo largo del día. Sin embargo, el metabolismo de este neurotransmisor aumenta significativamente a las 21:00 horas ( $F=23,27$   $p=0,0029$ ), al comparar estos resultados con los obtenidos en el grupo de ratas jóvenes.

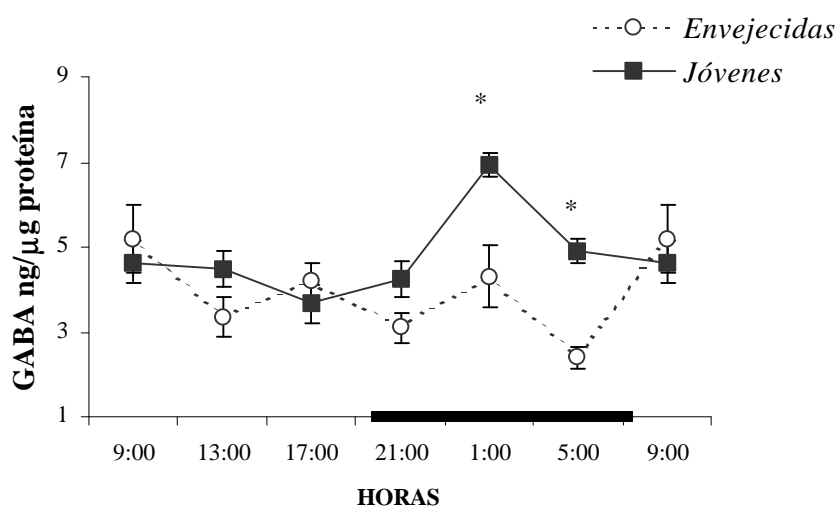


**Figura 24.-** Patrón diario del metabolismo de 5-HT en el hipotálamo mediobasal en ratas macho adultas jóvenes y envejecidas. Analizado mediante una ANOVA de una vía, el índice 5-HIA/5-HT en los animales envejecidos aumenta significativamente a las 21:00 horas, con respecto a los valores obtenidos en las ratas jóvenes ( $F=23,27$   $p=0,0029$ ). Los datos se expresan como media  $\pm$  eem. \* $p<0,05$ .



#### a.2.4.- Patrón diario de concentración de GABA en animales jóvenes y envejecidos

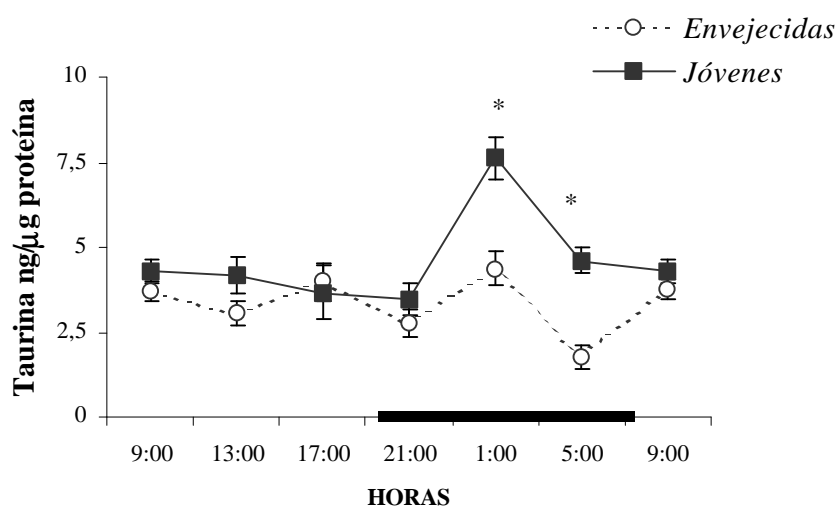
El efecto de la edad sobre el patrón diario de contenido de GABA en el hipotálamo mediobasal, se observa en la figura 25. En los animales jóvenes, la concentración de este neurotransmisor muestra un pico de contenido a las 01:00 horas durante la fase oscura del fotoperiodo ( $F=4,51$   $p=0,0084$ ). En los animales envejecidos el contenido diario de GABA disminuye significativamente ( $F=11,85$   $p=0,0015$ ), principalmente durante la fase oscura del fotoperiodo, a las 01:00 horas ( $F=8,92$   $p=0,0337$ ) y a las 05:00 horas ( $F=10,12$   $p=0,0245$ ), al compararlo con los resultados obtenidos en los animales jóvenes. En los animales envejecidos el patrón diario de contenido de GABA muestra un mínimo de contenido a las 05:00 horas, durante la fase oscura del fotoperiodo ( $F=3,02$   $p=0,0355$ ), mostrando, por tanto, características diferenciales a las descritas en animales jóvenes.



**Figura 25.-** Patrón diario de contenido de GABA en el hipotálamo mediobasal en ratas macho adultas jóvenes y envejecidas. Analizado mediante una ANOVA de una vía, el contenido de este neurotransmisor en los animales envejecidos disminuye significativamente a las 01:00 horas y a las 05:00 horas, con respecto a los valores obtenidos en las ratas jóvenes ( $F=8,92$   $p=0,0337$ ;  $F=10,12$   $p=0,0245$  respectivamente). Los datos se expresan como media  $\pm$  eem. \* $p<0,05$ .

### a.2.5.- Patrón diario de concentración de taurina en animales jóvenes y envejecidos.

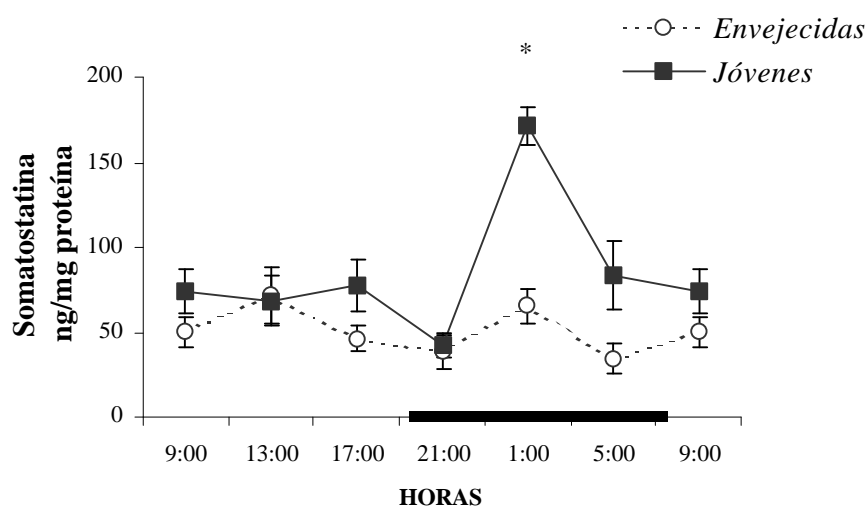
El patrón diario de concentración de taurina en el hipotálamo mediobasal de ratas macho adultas jóvenes y envejecidas, se representa en la figura 26. En los animales jóvenes, el contenido de este neurotransmisor varía significativamente a lo largo del día ( $F=7,48$   $p=0,0007$ ), alcanzando el valor máximo a las 01:00 horas durante la fase oscura del fotoperiodo. En los animales envejecidos, el patrón de contenido de taurina también muestra variaciones significativas a lo largo del día ( $F=3,72$   $p=0,0173$ ), aunque este patrón muestra características diferenciales al observado en los animales jóvenes, con un mínimo de concentración a las 05:00 horas, durante la fase oscura del fotoperiodo. Además, el contenido de este neurotransmisor durante el periodo oscuro disminuye significativamente a las 01:00 horas ( $F=17$   $p=0,0091$ ) y a las 05:00 horas ( $F=28,04$   $p=0,0032$ ), cuando se compara con los resultados obtenidos en los animales jóvenes.



**Figura 26.-** Patrón diario de contenido de taurina en el hipotálamo mediobasal en ratas macho adultas jóvenes y envejecidas. Analizado mediante una ANOVA de una vía, el contenido de este neurotransmisor en los animales envejecidos disminuye significativamente a las 01:00 horas y a las 05:00 horas, con respecto a los valores obtenidos en las ratas jóvenes ( $F=17$   $p=0,0091$ ;  $F=28,04$   $p=0,0032$  respectivamente). Los datos se expresan como media  $\pm$  eem. \* $p<0,05$ .

### a.2.6.- Patrón diario de concentración de somatostatina en animales jóvenes y envejecidos

El patrón diario de contenido de somatostatina del hipotálamo mediobasal en ratas macho jóvenes y envejecidas, se representa en la figura 27. En los animales jóvenes, la concentración de somatostatina varía significativamente a lo largo del día ( $F=7,17$   $p=0,006$ ), observándose el máximo a las 01:00 horas, durante la fase oscura del fotoperiodo. Sin embargo, en las ratas envejecidas, el contenido de somatostatina, a lo largo del ciclo de luz-oscuridad, no muestra variaciones significativas, desapareciendo el valor máximo que se observa en los animales jóvenes ( $F=46,73$   $p=0,0005$ ). El contenido diario de somatostatina, a lo largo del día disminuye ( $F=21,40$   $p=0,0001$ ) al compararlo con los valores obtenidos en el grupo de ratas jóvenes.

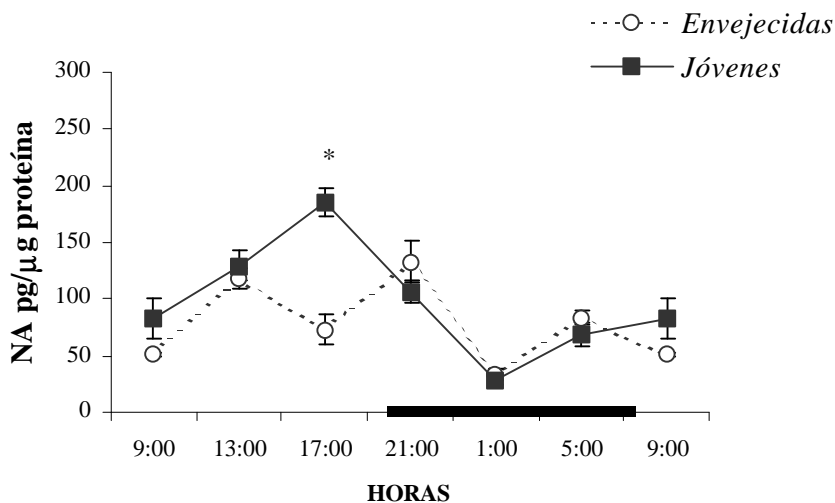


**Figura 27.-** Patrón diario de contenido de somatostatina en el hipotálamo mediobasal en ratas macho adultas jóvenes y envejecidas. Analizado mediante una ANOVA de una vía, la concentración de somatostatina en los animales envejecidos disminuye significativamente a las 01:00 horas, con respecto a los valores obtenidos en las ratas jóvenes ( $F=46,73$   $p=0,0005$ ). Los datos se expresan como media  $\pm$  eem. \* $p<0,05$ .

### a.3.- Eminencia media

#### a.3.1.- Patrón diario de concentración de NA en animales jóvenes y envejecidos

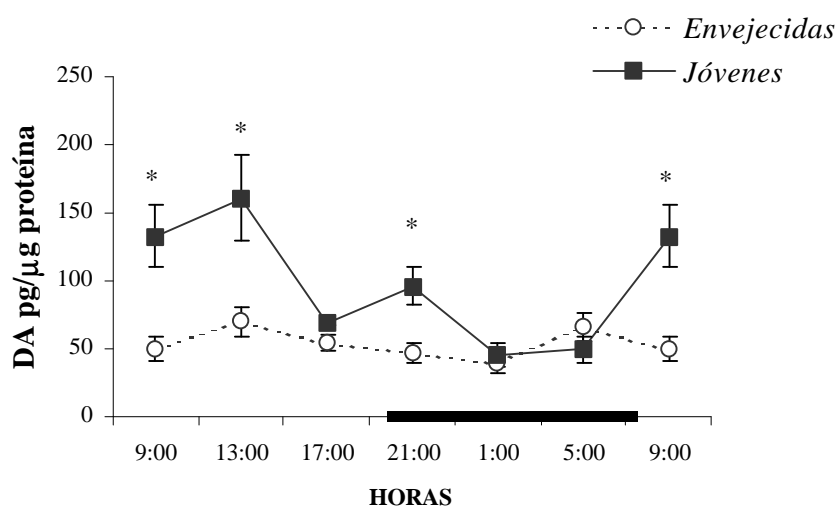
El efecto de la edad sobre los patrones diarios de concentración de NA en la eminencia media en ratas macho, se representa en la figura 28. En los animales jóvenes, el contenido de este neurotransmisor muestra cambios significativos a lo largo del día ( $F=16,80$   $p=0,0001$ ), con un máximo a las 17:00 horas durante la fase luminosa del fotoperiodo. En los animales envejecidos la concentración de NA también muestra variaciones diarias significativas ( $F=9,597$   $p=0,0002$ ) con máximos observables a las 13:00 horas durante la fase luminosa del fotoperiodo, y a las 21 horas durante la fase oscura del fotoperiodo. Al comparar los dos patrones diarios de contenido de NA se observa un desdoblamiento del pico máximo de concentración, encontrado en animales jóvenes. Por ello, se produce una disminución significativa en el contenido de este neurotransmisor a las 17:00 horas ( $F=34,39$   $p=0,002$ ).



**Figura 28.-** Patrón diario de contenido de NA en la eminencia media en ratas macho adultas jóvenes y envejecidas. Analizado mediante una ANOVA de una vía, la concentración de este neurotransmisor en los animales envejecidos disminuye significativamente a las 17:00 horas, con respecto a los valores obtenidos en las ratas jóvenes ( $F=34,39$   $p=0,002$ ). Los datos se expresan como media  $\pm$  eem. \* $p<0,05$ .

### a.3.2.- Patrón diario de concentración de DA en animales jóvenes y envejecidos

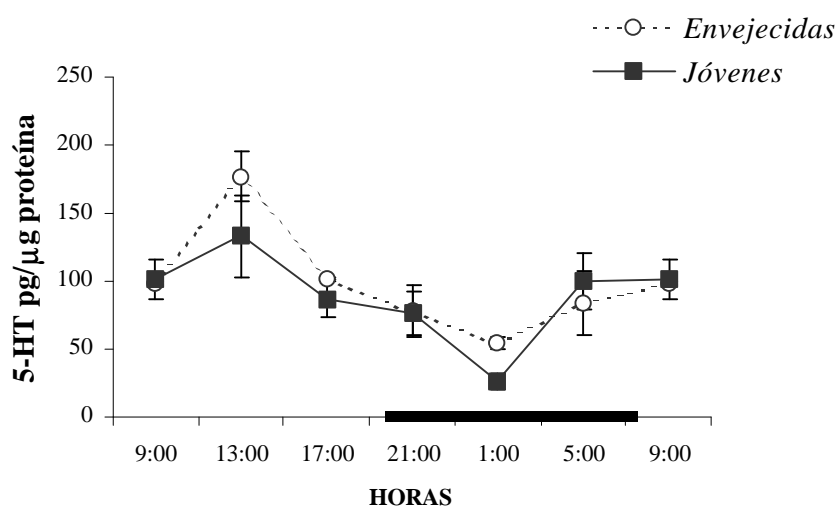
El efecto de la edad sobre el patrón diario de la concentración de DA en la eminencia media de ratas macho, se observa en la figura 29. En los animales jóvenes, el contenido de este neurotransmisor varía significativamente a lo largo del día ( $F=5,81$   $p=0,0023$ ), observándose los valores máximos durante las primeras horas de la fase luminosa del fotoperiodo (a las 09:00 horas y a las 13:00 horas). En las ratas envejecidas, la concentración de DA no muestra cambios a lo largo del ciclo de luz-oscuridad. Se detecta una disminución significativa en el contenido diario de este neurotransmisor ( $F=15,62$   $p=0,0004$ ). Se observa una disminución significativa de la concentración de DA a las 09:00 horas ( $F=6,89$   $p=0,0392$ ), a las 13:00 horas ( $F=5,60$   $p=0,0041$ ) y a las 21:00 horas ( $F=9,47$   $p=0,024$ ) al compararla con la obtenida en los animales jóvenes.



**Figura 29.-** Patrón diario de contenido de DA en la eminencia media en ratas macho adultas jóvenes y envejecidas. Analizado mediante una ANOVA de una vía, la concentración de este neurotransmisor en los animales envejecidos disminuye significativamente a las 09:00 horas, a las 13:00 horas y a las 21:00 horas, con respecto a los valores obtenidos en las ratas jóvenes ( $F=6,89$   $p=0,0392$ ;  $F=5,60$   $p=0,0041$ ;  $F=9,47$   $p=0,024$  respectivamente). Los datos se expresan como media  $\pm$  eem. \* $p<0,05$ .

### a.3.3.- Patrón diario de concentración de 5-HT en animales jóvenes y envejecidos.

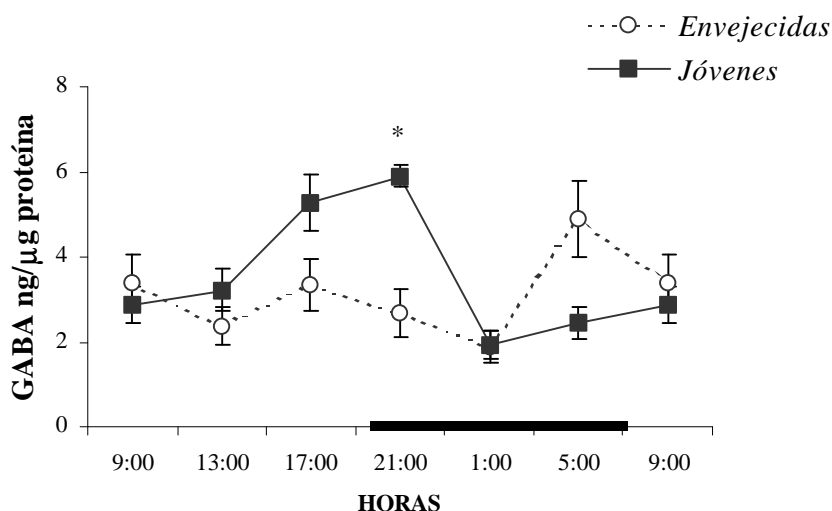
El patrón de contenido de 5-HT en la eminencia media en ratas macho adultas jóvenes y envejecidas, se representa en la figura 30. En los animales jóvenes, la concentración de este neurotransmisor presenta variaciones significativas a lo largo del día ( $F=2,83$   $p=0,046$ ), con un mínimo a las 01:00 horas, durante la fase oscura del fotoperiodo. En los animales envejecidos este patrón diario del contenido de 5-HT también muestra variaciones significativas a lo largo del día ( $F=8,4375$   $p=0,0013$ ), con un máximo de contenido a las 13:00 horas, durante la fase luminosa del fotoperiodo. El envejecimiento produce una inversión en el patrón diario de 5-HT .



**Figura 30.-** Patrón diario de contenido de 5-HT en la eminencia media en ratas macho adultas jóvenes y envejecidas. Analizado mediante una ANOVA de una vía, se observan variaciones significativas de la concentración de este neurotransmisor a lo largo del día en los animales jóvenes y envejecidos ( $F=2,83$   $p=0,046$ ;  $F=8,4375$   $p=0,0013$  respectivamente). Los datos se expresan como media  $\pm$  eem. \* $p<0,05$ .

### a.3.4.- Patrón diario de concentración de GABA en animales jóvenes y envejecidos

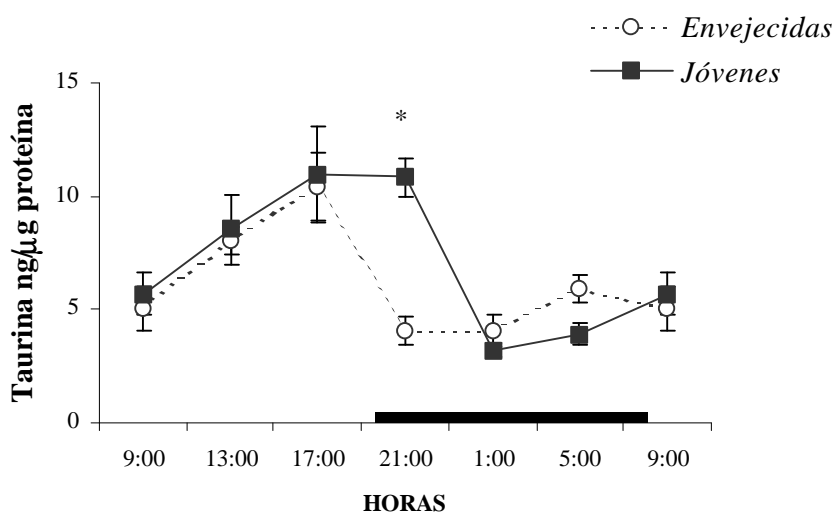
El patrón de concentración de GABA en la eminencia media en ratas macho jóvenes y envejecidas, se representa en la figura 31. En los animales jóvenes, el contenido de este neurotransmisor varía significativamente a lo largo del día ( $F=11,54$   $p=0,0003$ ), alcanzando el valor máximo a las 21:00 horas, durante la fase oscura del fotoperiodo. Sin embargo, aunque en las ratas envejecidas los valores obtenidos para el GABA presentan cambios diarios significativos ( $F=2,82$   $p=0,049$ ), se produce un retraso del valor máximo de concentración desde las 21:00 horas hasta las 05:00 horas, durante la fase oscura del fotoperiodo.



**Figura 31.-** Patrón diario de contenido de GABA en la eminencia media en ratas macho adultas jóvenes y envejecidas. Analizado mediante una ANOVA de una vía, la concentración de este neurotransmisor en los animales envejecidos disminuye significativamente a las 21:00 horas, con respecto a los valores obtenidos en las ratas jóvenes ( $F=26,01$   $p=0,007$ ). Los datos se expresan como media  $\pm$  eem. \* $p<0,05$ .

### a.3.5.- Patrón diario de concentración de taurina en animales jóvenes y envejecidos.

El patrón diario de contenido de taurina en la eminencia media en ratas macho jóvenes y envejecidas, se observa en la figura 32. En los animales jóvenes, la concentración de este neurotransmisor varía significativamente a lo largo del día ( $F=6,23$   $p=0,0037$ ), alcanzando el valor máximo entre las 17:00-21:00 horas, durante la fase luminosa del fotoperiodo y principio de su fase oscura. En los animales envejecidos, el contenido de taurina también presenta variaciones diarias significativas ( $F=7,36$   $p=0,0023$ ), con un máximo de contenido a las 17:00 horas, durante la fase luminosa del fotoperiodo. Sin embargo, los valores máximos de taurina encontrados en los animales jóvenes a las 21:00 horas no se mantienen en los animales envejecidos ( $F=43,77$   $p=0,007$ ).

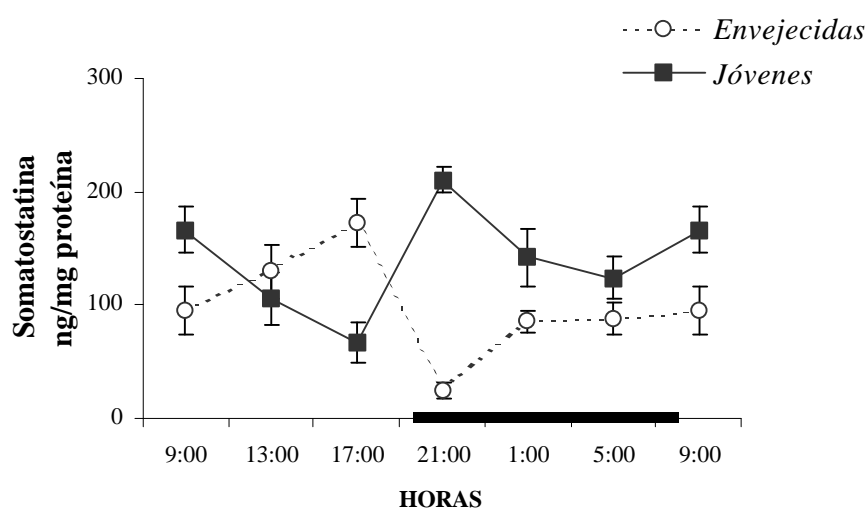


**Figura 32.-** Patrón diario de contenido de taurina en la eminencia media en ratas macho adultas jóvenes y envejecidas. Analizado mediante una ANOVA de una vía, la concentración de este neurotransmisor en los animales envejecidos disminuye significativamente a las 21:00 horas, con respecto a los valores obtenidos en las ratas jóvenes ( $F=43,77$   $p=0,007$ ). Los datos se expresan como media  $\pm$  eem. \* $p<0,05$ .



### a.3.6.- Patrón diario de concentración de somatostatina en animales jóvenes y envejecidos

El efecto de la edad sobre la concentración de somatostatina en la eminencia media en ratas macho, se observa en la figura 33. En los animales jóvenes, el contenido de somatostatina varía significativamente a lo largo del día ( $F=5,033$   $p=0,0042$ ), con un máximo de concentración a las 21:00 horas, durante la fase oscura del fotoperiodo. En las ratas envejecidas, los niveles diarios de concentración de somatostatina disminuyen significativamente ( $F=9,60$   $p=0,0038$ ). Como en los animales jóvenes, el contenido de este neuropéptido presenta cambios significativos a lo largo del día ( $F=6,93$   $p=0,0011$ ), aunque el máximo de concentración presenta un adelanto de fase a las 17:00 horas, durante la fase luminosa del fotoperiodo.

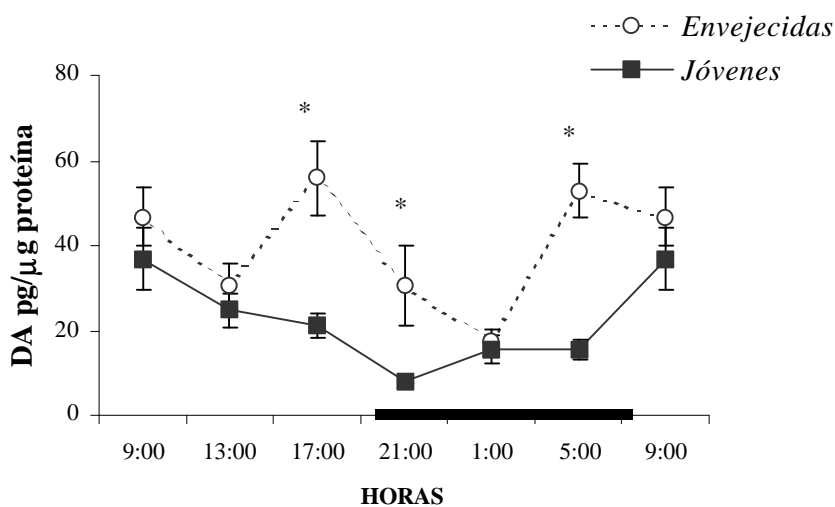


**Figura 33.-** Patrón diario de contenido de somatostatina en la eminencia media en ratas macho adultas jóvenes y envejecidas. Analizado mediante una ANOVA de una vía, la concentración de este neurotransmisor en los animales envejecidos y en los animales jóvenes varía significativamente a lo largo del día ( $F=5,033$   $p=0,0042$ ;  $F=6,93$   $p=0,0011$  respectivamente). Los datos se expresan como media  $\pm$  eem.

#### a.4.- Adenohipófisis

##### a.4.1.- Patrón diario de concentración de DA en animales jóvenes y envejecidos

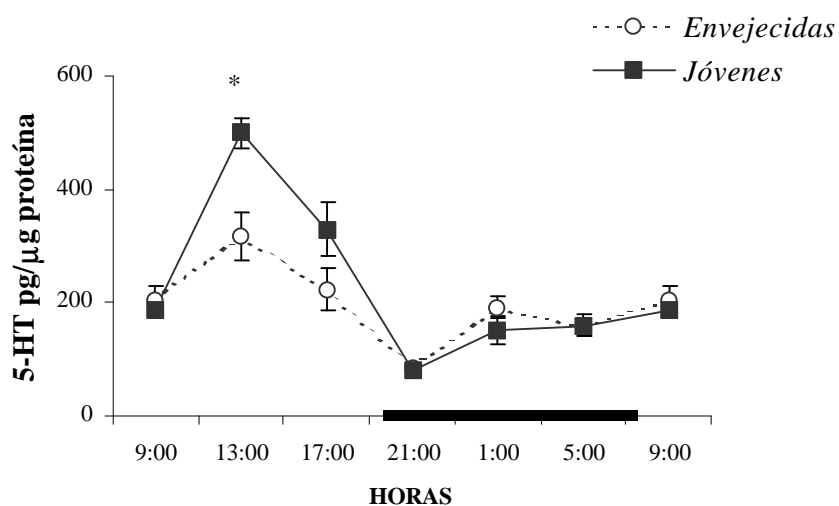
El patrón diario de contenido de DA en la adenohipófisis de animales jóvenes y envejecidos se representa en la figura 34. En los animales jóvenes la concentración de este neurotransmisor muestra variaciones diarias significativas, alcanzando el máximo a las 09:00 horas ( $F=7,49$   $p=0,0007$ ). En los animales envejecidos, el contenido diario de DA aumenta significativamente con la edad ( $F=38,91$   $p=0,0001$ ). Asimismo, se observan cambios significativos a lo largo del día ( $F=5,81$   $p=0,0026$ ), con dos máximos, uno a las 17:00 horas, durante la fase luminosa del fotoperiodo y otro a las 05:00 horas, durante la fase oscura del fotoperiodo. Se produce un cambio en el patrón de contenido de DA con el envejecimiento.



**Figura 34.-** Patrón diario de contenido de DA en la adenohipófisis en ratas macho adultas jóvenes y envejecidas. Analizado mediante una ANOVA de una vía, la concentración de este neurotransmisor en los animales envejecidos aumentan significativamente a las 17:00 horas ( $F=19$   $p=0,0073$ ), a las 21:00 horas ( $F=8,17$   $p=0,0354$ ) y a las 05:00 horas ( $F=46,94$   $p=0,0005$ ). Los datos se expresan como media  $\pm$  eem. \* $p<0,05$ .

#### a.4.2.- Patrón de concentración de 5-HT en animales jóvenes y envejecidos.

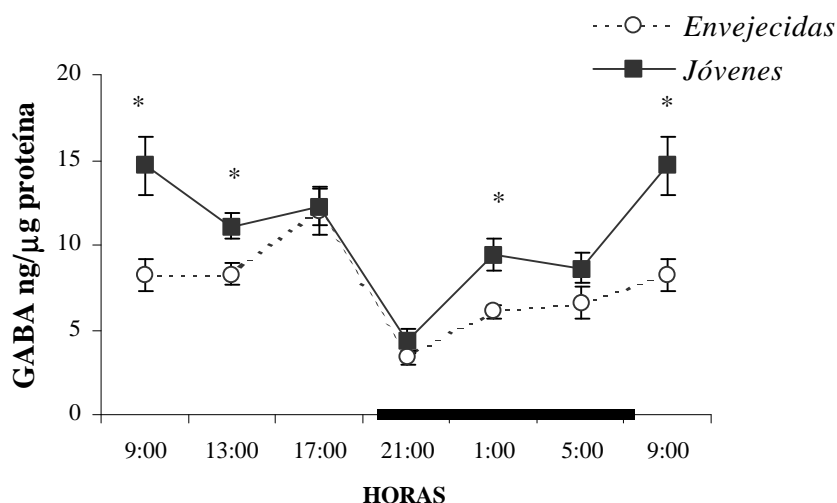
El efecto de la edad sobre el contenido diario de 5-HT en la adenohipófisis se observa en la figura 35. En los animales jóvenes la concentración de 5-HT varía significativamente a lo largo del día, observándose el máximo a las 13:00 horas ( $F=29,53$   $p=0,0001$ ). En los animales envejecidos el contenido diario de este neurotransmisor disminuye significativamente con la edad ( $F=4,59$   $p=0,0384$ ). Asimismo, el patrón de concentración sigue presentando variaciones diarias significativas ( $F=6,41$   $p=0,0012$ ), con el máximo en el mismo horario que los animales jóvenes, aunque el pico observado es de menor amplitud que en los animales jóvenes ( $F=11,60$   $p=0,0113$ ).



**Figura 35.-** Patrón diario de contenido de 5-HT en la adenohipófisis en ratas macho adultas jóvenes y envejecidas. Analizado mediante una ANOVA de una vía, la concentración de este neurotransmisor en los animales envejecidos disminuye significativamente a las 13:00 horas con respecto a los resultados obtenidos en las ratas jóvenes ( $F=11,60$   $p=0,0113$ ). Los datos se expresan como media  $\pm$  eem. \* $p<0,05$ .

#### a.4.3.- Patrón diario de concentración de GABA en animales jóvenes y envejecidos

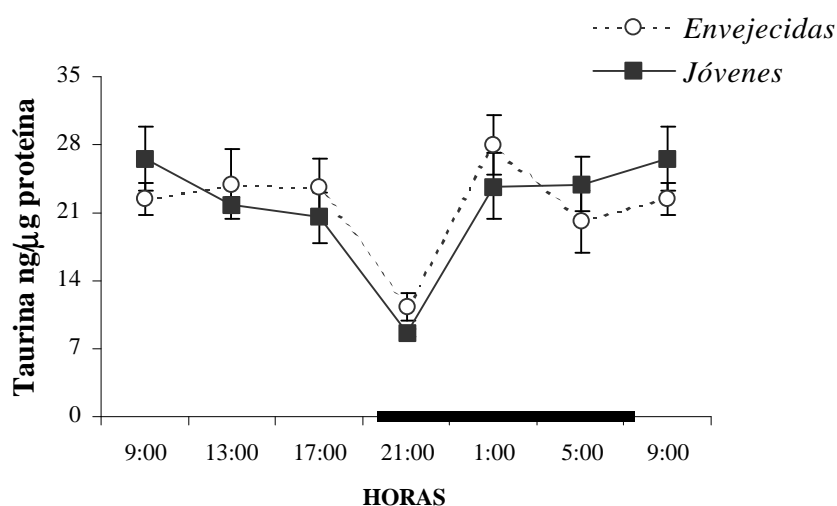
El efecto de la edad sobre el contenido diario de GABA en la adenohipófisis se observa en la figura 36. En los animales jóvenes, la concentración de este neurotransmisor muestra cambios diarios significativos, con un mínimo a las 21:00 horas ( $F=12,44$   $p=0,0001$ ), durante la fase oscura del fotoperiodo. En los animales envejecidos el contenido diario de GABA disminuye significativamente al compararlos con los resultados obtenidos en las ratas adultas jóvenes ( $F=19,64$   $p=0,0002$ ). Sin embargo, el patrón no se modifica, observándose variaciones diarias significativas ( $F=9,24$   $p=0,0002$ ) con el mínimo a las 21:00 horas como ocurría en los animales jóvenes.



**Figura 36.-** Patrón diario de contenido de GABA en la adenohipófisis en ratas macho adultas jóvenes y envejecidas. Analizado mediante una ANOVA de una vía, la concentración de este neurotransmisor disminuye significativamente con la edad, a las 09:00 horas ( $F=11,27$ ,  $p=0,0153$ ) a las 13:00 horas ( $F=13,29$ ,  $p=0,0108$ ) y a las 01:00 horas ( $F=7,14$ ,  $p=0,0316$ ). Los datos se expresan como media  $\pm$  eem. \* $p<0,05$ .

#### a.4.4.- Patrón de concentración de taurina en animales jóvenes y envejecidos

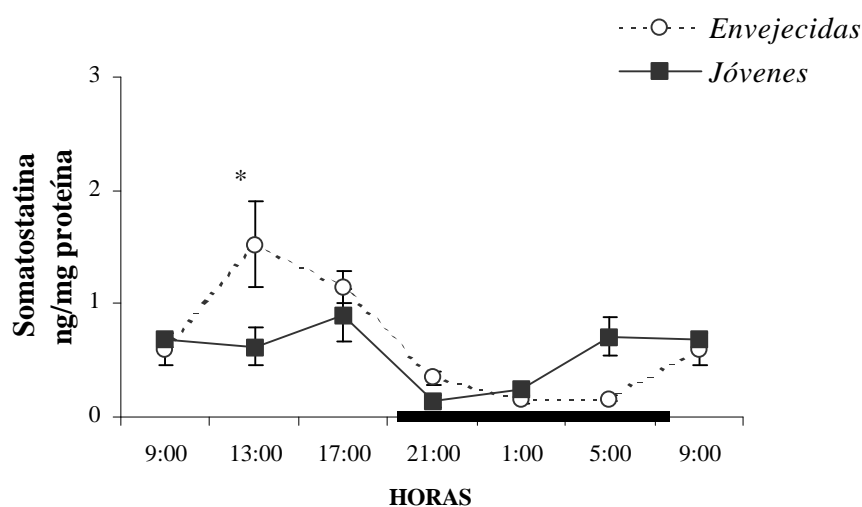
El patrón diario de contenido de taurina en la adenohipófisis de animales jóvenes y envejecidos se observa en la figura 37. En los animales jóvenes, el contenido de taurina muestra variaciones diarias significativas, con un mínimo a las 21:00 horas ( $F=7,22$   $p=0,001$ ), durante la fase oscura del fotoperiodo. Asimismo, en los animales envejecidos la concentración de este neurotransmisor también varía significativamente a lo largo del día ( $F=3,36$   $p=0,0271$ ), observándose un patrón similar al descrito anteriormente en el grupo de animales jóvenes.



**Figura 37.-** Patrón diario de contenido de taurina en la adenohipófisis en ratas macho adultas jóvenes y envejecidas. Analizado mediante una ANOVA de una vía, la concentración de este neurotransmisor varía a lo largo del día en los animales jóvenes y envejecidos ( $F=7,22$   $p=0,001$ ;  $F=3,36$   $p=0,0271$ ). Los datos se expresan como media  $\pm$  eem.

#### a.4.5.- Patrón de concentración de somatostatina en animales jóvenes y envejecidos

El efecto de la edad sobre el contenido de somatostatina a lo largo del día en la adenohipófisis de ratas macho, se observa en la figura 38. En los animales jóvenes, la concentración de este neuropéptido varía a lo largo del día ( $F=3,68$   $p=0,0207$ ), con un mínimo observable entre las 21:00-01:00 horas, durante la fase oscura del fotoperiodo. Asimismo, en los animales envejecidos se muestran variaciones diarias en el contenido de somatostatina ( $F=7,54$   $p=0,0006$ ) con un máximo de concentración a las 13:00 horas, durante la fase luminosa del fotoperiodo. En las ratas envejecidas, el contenido de somatostatina se encuentra incrementado significativamente a las 13:00 horas ( $F=6,41$   $p=0,0351$ ), con respecto a los resultados mostrados en el grupo de ratas jóvenes. El envejecimiento cambia el patrón diario de contenido de somatostatina en la adenohipófisis.

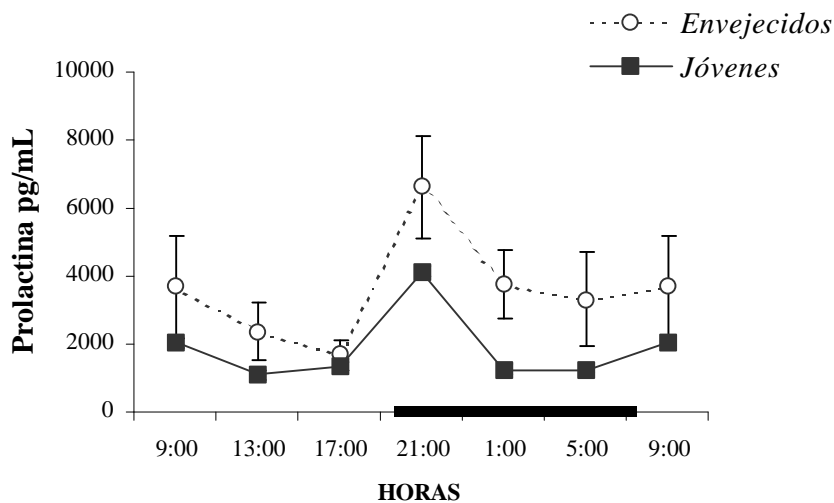


**Figura 38.-** Patrón diario de contenido de somatostatina en la adenohipófisis en ratas macho adultas jóvenes y envejecidas. Analizado mediante una ANOVA de una vía, la concentración de este neurotransmisor aumenta significativamente a las 13:00 horas con la edad ( $F=6,41$   $p=0,0351$ ). Los datos se expresan como media  $\pm$  eem. \* $p<0,05$ .

**a.5- Niveles circulantes de prolactina, GH y contenido de melatonina en la glándula pineal.**

***a.5.1.- Efecto de la edad sobre los niveles circulantes de la prolactina a lo largo del día***

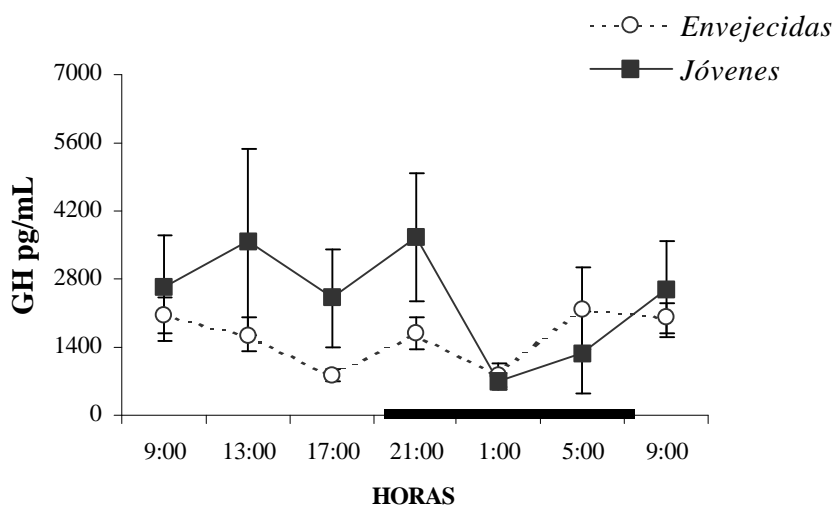
El efecto de la edad sobre el patrón de secreción de prolactina a lo largo del día, se observa en la figura 39. En los animales jóvenes, los niveles circulantes de prolactina presentan cambios diarios significativos ( $F=2,34$   $p=0,04$ ) con un máximo a las 21:00 horas, durante la fase oscura del fotoperiodo. En los animales envejecidos, el patrón secretor de prolactina también varía significativamente a lo largo del ciclo de luz-oscuridad ( $F=4,18$   $p=0,008$ ), observándose un patrón semejante al descrito previamente en los animales jóvenes. Sin embargo, los niveles diarios de esta hormona aumentan significativamente ( $F=36,33$   $p=0,0001$ ), cuando los comparamos a los valores obtenidos en el grupo de ratas jóvenes.



**Figura 39.-** Patrón diario de secreción de prolactina en ratas macho adultas jóvenes y envejecidas. Analizado mediante un ANOVA de una vía, los resultados muestran variaciones significativas en los niveles circulantes de esta hormona a lo largo del día en los animales jóvenes y envejecidos ( $F=2,34$   $p=0,04$ ;  $F=4,18$   $p=0,005$  respectivamente). Los datos se expresan como media  $\pm$  eem.

### a.5.2.- Efecto de la edad sobre los niveles circulantes de GH a lo largo del día

El efecto de la edad sobre el patrón secretor de la hormona del crecimiento en ratas macho, se observa en la figura 40. En los animales jóvenes, los niveles circulantes de esta hormona no varía significativamente a lo largo del día. En los animales envejecidos se observa en una disminución significativa en los niveles diarios de secreción de esta hormona ( $F=10,21$   $p=0,0019$ ), cuando se compara con los datos obtenidos en los animales jóvenes, manteniéndose los niveles circulantes similares a lo largo del día.

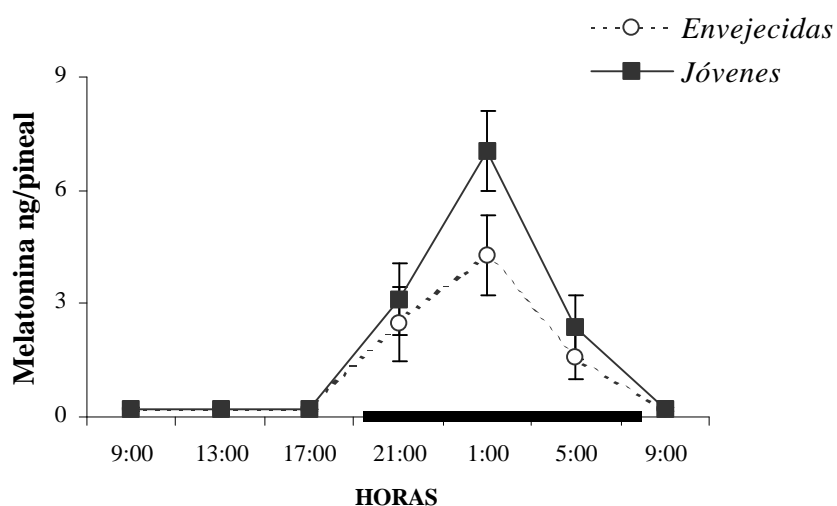


**Figura 40.-** Patrón diario de secreción de la hormona del crecimiento en ratas macho adultas jóvenes y envejecidas. Analizado mediante una ANOVA de una vía, los resultados muestran que los niveles medios circulantes de esta hormona disminuyen significativamente con la edad ( $F=10,21$   $p=0,0019$ ). Los datos se expresan como media  $\pm$  eem.



### a.5.3.- Efecto de la edad sobre el patrón de concentración de melatonina en la glándula pineal a lo largo del día

El efecto de la edad sobre el patrón de concentración de la melatonina en la glándula pineal en ratas macho, se observa en la figura 41. En los animales jóvenes, el contenido de esta hormona presenta cambios significativos a lo largo del día ( $F=11,1$   $p=0,0001$ ) con un máximo a las 01:00 horas, durante la fase oscura del fotoperiodo. Sin embargo, aunque el envejecimiento no altera el patrón de concentración de esta hormona, se observa una disminución de la amplitud del pico máximo de la hormona ( $F=2,78$   $p<0,05$ ).



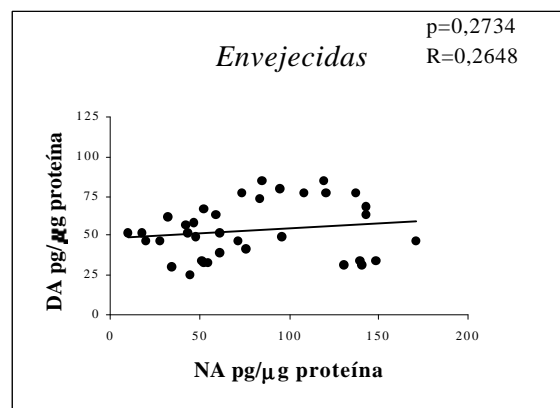
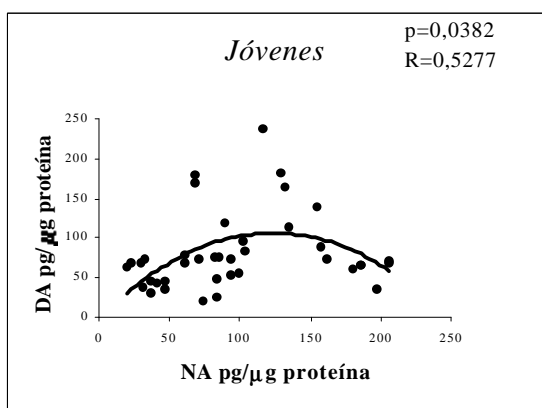
**Figura 41.-** Patrón diario de concentración de la melatonina en la glándula pineal en ratas macho adultas jóvenes y envejecidas. Analizado mediante una ANOVA de una vía, los resultados muestran una disminución significativa en el contenido de melatonina con la edad ( $F=2,78$   $p<0,05$ ). Los datos se expresan como media  $\pm$  eem.

**B) EFECTO DE LA EDAD SOBRE LOS MECANISMOS DE INTERRELACION ENTRE LOS NEUROMODULADORES ESTUDIADOS, IMPLICADOS EN LA REGULACIÓN DE PROLACTINA.**

**b.1.- Correlaciones entre las variaciones diarias de concentración de DA y el resto de los neuromoduladores estudiados, en la eminencia media.**

***b.1.1.- Correlación entre los patrones diarios de concentración de NA y de DA en animales jóvenes y envejecidos.***

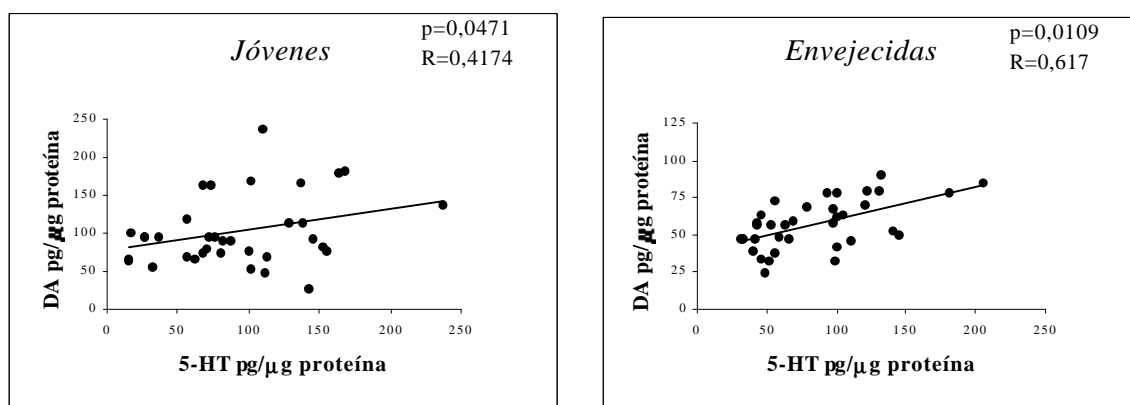
La correlación entre los contenidos de NA y de DA a lo largo del día en ratas macho adultas jóvenes y envejecidas, se representa en las figuras 42a y 42b. En los animales jóvenes, tanto la concentración de NA como de DA presenta variaciones significativas diarias en la eminencia media ( $F=16,80$   $p=0,0001$ ;  $F=5,81$   $p=0,0023$ , respectivamente), descritas en los apartados a.3.1. y a.3.2. Ambos patrones muestran una correlación polinómica significativa ( $F=3,86$   $p=0,0382$ ), como se observa en la figura 42a. Sin embargo, en los animales envejecidos, las variaciones diarias de DA desaparecen, y se mantienen las de NA ( $F=9,5975$   $p=0,0002$ ). Además, desaparece la correlación entre ambos patrones al comparar con lo que ocurría en los animales jóvenes, como se muestra en la figura 42b.



**Figuras 42a y 42b.-** Correlación entre la concentración de NA y DA en la eminencia media en ratas macho jóvenes y envejecidas. Se expresa el factor de correlación y su significado estadístico.

**b.1.2.- Correlación entre los patrones diarios de concentración de 5-HT y de DA en animales jóvenes y envejecidos**

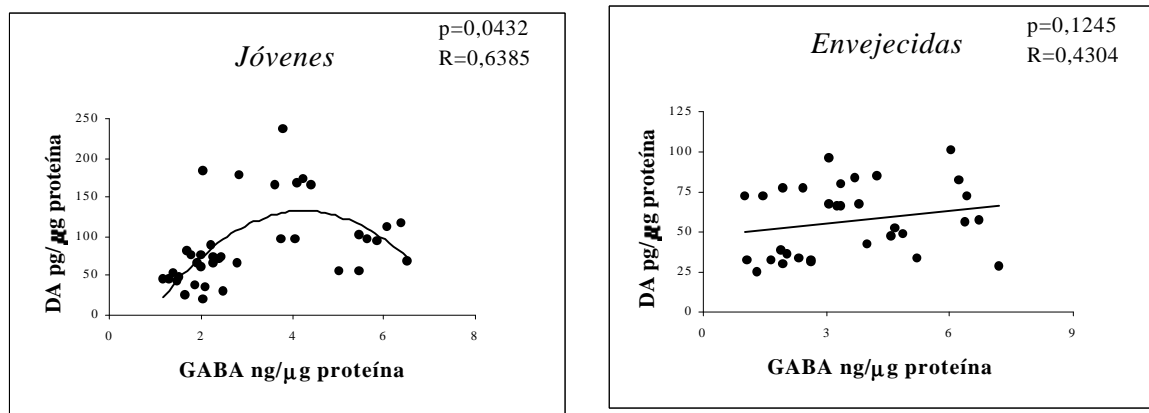
La correlación entre los contenidos de 5-HT y de DA en la eminencia media en ratas macho adultas jóvenes y envejecidas, se representa en las figuras 43a y 43b. En los animales jóvenes, el patrón diario de concentración de 5-HT y DA muestra variaciones significativas a lo largo del día en este tejido ( $F=2,83$   $p=0,046$ ,  $F=5,81$   $p=0,0023$ ; respectivamente), descritas en los apartados a.3.3. y a.3.2. Ambos patrones presentan una interacción positiva en este tejido estudiado ( $F=3,79$   $p=0,0471$ ), como se observa en la figura 43a. En los animales envejecidos, las variaciones diarias de DA desaparecen, mientras que permanecen los cambios significativos a lo largo del día en la concentración de 5-HT ( $F=8,45$   $p=0,0013$ ). A diferencia de lo que ocurría con la NA, se mantiene la correlación positiva entre el contenido de DA y 5-HT en eminencia ( $F=8,60$   $p=0,0109$ ), en los animales envejecidos, como se muestra en la figura 43b.



**Figuras 43a y 43b.-** Correlación entre la concentración de 5-HT y DA en la eminencia media en ratas macho jóvenes y envejecidas. Se expresa el factor de correlación y su significado estadístico.

**b.1.3.- Correlación entre los patrones diarios de concentración de GABA y de DA en animales jóvenes y envejecidos**

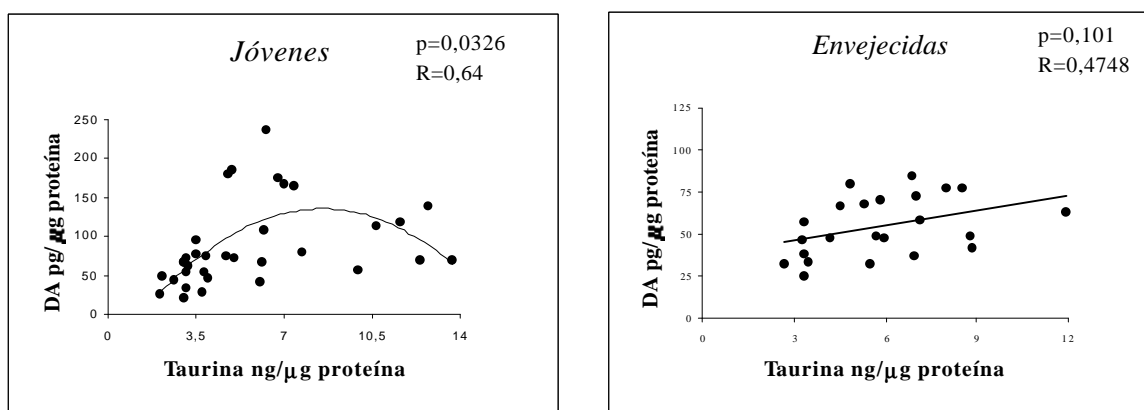
La interacción entre el contenido de GABA y de DA en la eminencia media en ratas macho adultas jóvenes y envejecidas, se representa en las figuras 44a y 44b. En los animales jóvenes, los dos neurotransmisores presentan patrones de concentración, descrito en los apartados a.3.4. y a.3.2., con variaciones diarias estadísticamente significativas en este tejido ( $F=11,54$   $p=0,0003$ ;  $F=5,81$   $p=0,0023$ , respectivamente). Asimismo, los patrones diarios de ambos neurotransmisores muestran una correlación polinómica significativa ( $F=4,13$   $p=0,0432$ ), como se observa en la figura 44a. En los animales envejecidos, se pierde el patrón diario de contenido de DA, al compararlo con las variaciones diarias de este neurotransmisor en animales jóvenes. Sin embargo, permanecen las variaciones diarias en el contenido de GABA ( $F=2,82$   $p=0,049$ ). Además, los resultados muestran una pérdida de la correlación entre los patrones diarios de DA y GABA en animales envejecidos, respecto a lo que ocurre en jóvenes, como se muestra en la figura 44b.



**Figuras 44a y 44b.-** Correlación entre la concentración de GABA y DA en la eminencia media en ratas macho jóvenes y envejecidas. Se expresa el factor de correlación y su significado estadístico.

#### ***b.1.4.- Correlación entre los patrones diarios de concentración de taurina y de DA en animales jóvenes y envejecidos***

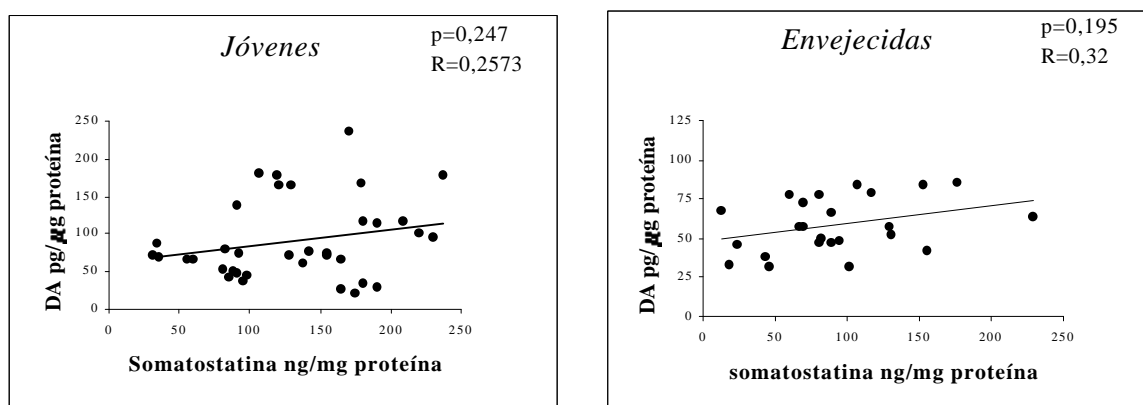
La interacción entre el contenido de taurina y de DA en la eminencia media en ratas macho adultas jóvenes y envejecidas, se representa en las figuras 45a y 45b. En los animales jóvenes, la concentración de taurina y de DA varía a lo largo del día ( $F=6,23$   $p=0,0037$ ;  $F=5,81$   $p=0,0023$  respectivamente), como se ha descrito en los apartados a.3.5. y a.3.2. para este grupo de animales. Se observa una correlación polinómica significativa en el contenido diario de ambos neurotransmisores ( $F=4,50$   $p=0,0326$ ), como se observa en la figura 45a. En los animales envejecidos, las variaciones de concentración diaria de taurina se mantienen ( $F=7,36$   $p=0,0023$ ), mientras que no ocurre este fenómeno en DA. Asimismo, los resultados muestran que la correlación en el contenido de ambos neurotransmisores, observada en los animales jóvenes, desaparece en los animales envejecidos, como se muestra en la figura 45b.



**Figura 45a y 45b.-** Correlación entre la concentración de taurina y DA en la eminencia media en ratas macho jóvenes y envejecidas. Se expresa el factor de correlación y su significado estadístico.

***b.1.5.- Correlación entre los patrones diarios de concentración de somatostatina y de DA en animales jóvenes y envejecidos***

La correlación entre el contenido de somatostatina y de DA en la eminencia media en ratas macho adultas jóvenes y envejecidas, se representa en las figuras 46a y 46b. En los animales jóvenes, la concentración de somatostatina y de DA varían significativamente a lo largo del día ( $F=5,033$ ,  $p=0,0042$ ;  $F=5,81$ ,  $p=0,0023$  respectivamente), como se ha descrito en los apartados a.3.6. y a.3.2. Sin embargo, la concentración de ambos neurotransmisores no muestra una interacción significativa, como se observa en la figura 46a. Además, la concentración diaria de somatostatina mantiene su variación significativa ( $F=6,93$   $p=0,0011$ ) en animales envejecidos, mientras que en el contenido de DA se pierde, al compararlo con los animales jóvenes. Los resultados tampoco muestran una correlación significativa entre los patrones diarios de ambos neurotransmisores en animales envejecidos, como se muestra en la figura 46b.



**Figuras 46a y 46b.-** Correlación entre la concentración de somatostatina y DA en la eminencia media en ratas macho adultas jóvenes. Se expresa el factor de correlación y su significado estadístico.

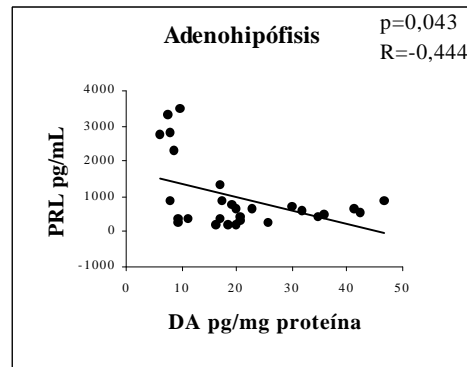
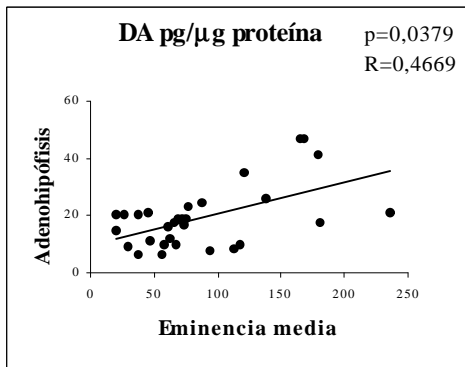
**b.2.- Relaciones entre los patrones de concentración de los neuromoduladores estudiados en la eminencia media y la adenohipófisis en animales jóvenes y envejecidos. Efecto sobre el ritmo secretor de prolactina**

***b.2.1.- Correlación entre los patrones de concentración de DA en la eminencia media y en la adenohipófisis. Efecto sobre el ritmo secretor de prolactina***

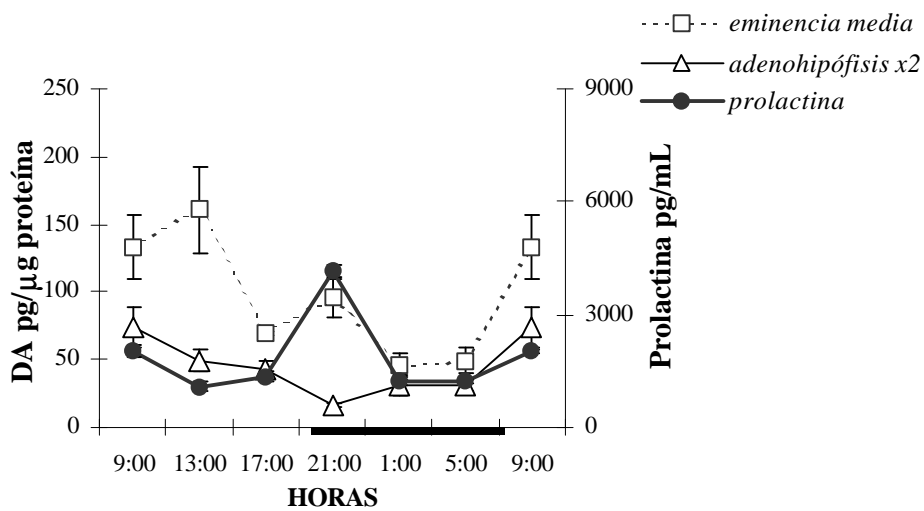
Los niveles circulantes de prolactina y el patrón diario de concentración de DA en la eminencia media y en la adenohipófisis en ratas macho adultas jóvenes y envejecidas, se representan en las figuras 48 y 50.

En los animales jóvenes, la concentración de DA en la eminencia media y en la adenohipófisis varía significativamente a lo largo del día ( $F=5,81$   $p=0,0023$ ;  $F=7,49$   $p=0,0007$  respectivamente), como se observa en los apartados a.3.2 y a.4.1 y en la figura 48. Ambos patrones diarios correlacionan significativamente ( $F=5,01$   $p=0,0379$ ). Globalmente, las variaciones diarias de DA en la adenohipófisis correlacionan negativamente con el ritmo secretor diario de prolactina ( $F=4,67$   $p=0,043$ ), como se muestra en la figura 47b.

En las ratas envejecidas, los niveles de DA en la adenohipófisis varían significativamente a lo largo del día ( $F=5,81$   $p=0,0026$ ), aunque estas variaciones no se observan en la eminencia media, como puede observarse en los apartados a.3.2 y a.4.1. y en la figura 50. Sin embargo, se mantiene una interacción positiva entre ambos tejidos para este neurotransmisor ( $F=6,27$   $p=0,0263$ ). A diferencia de lo que ocurría en el grupo de animales jóvenes, la concentración de DA en la eminencia media sí correlaciona negativamente con los niveles circulantes de prolactina ( $F=4,68$   $p=0,045$ ), como se muestra en la figura 49a. Aunque la correlación entre la DA adenohipofisaria y el patrón secretor de prolactina desaparece en este grupo (no se muestra figura).

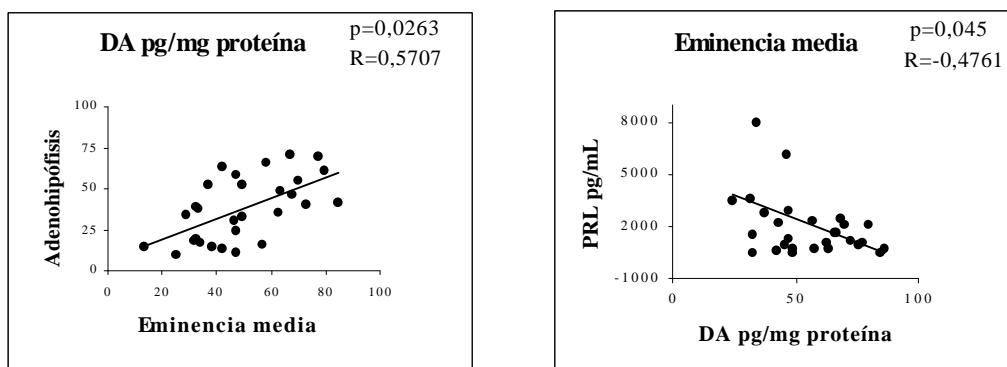


**Figuras 47a y 47b.-** Correlación entre los patrones de concentración de DA en la eminencia media y en la adenohipófisis (figura 47a), y entre el patrón secretor de prolactina y el contenido de DA hipofisaria, en ratas macho adultas jóvenes (figura 47b). Se expresa el factor de correlación y su significado estadístico.

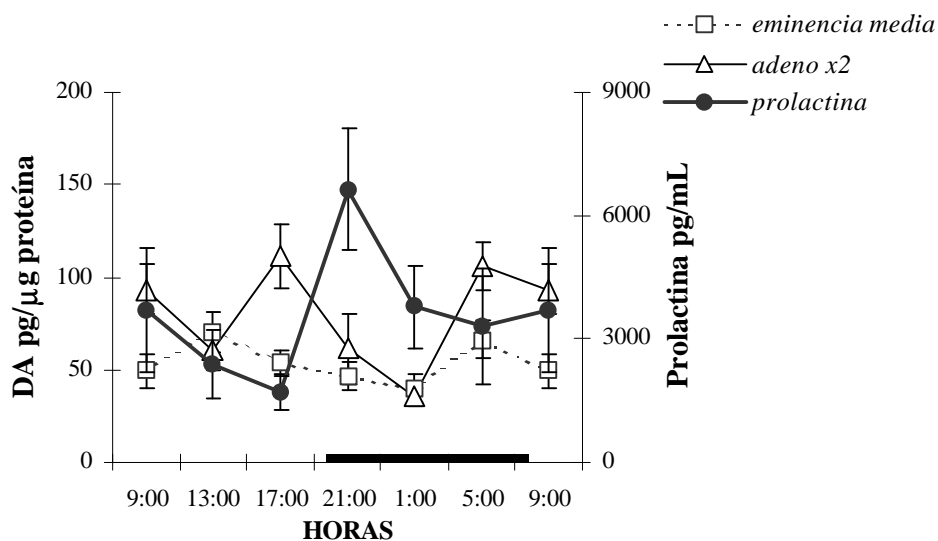


**Figura 48.-** Niveles circulantes de prolactina a lo largo del día y patrones diarios de contenido de DA en la eminencia media y en la adenohipófisis en ratas macho adultas jóvenes. Los datos se expresan como media  $\pm$  eem.





**Figuras 49a y 49b.-** Correlación entre la concentración de DA en la eminencia media y en la adenohipófisis (figura 49a), y entre los niveles circulantes de prolactina y la concentración de DA en la eminencia media, en ratas macho envejecidas (figura 49b). Se expresa el factor de correlación y su significado estadístico.



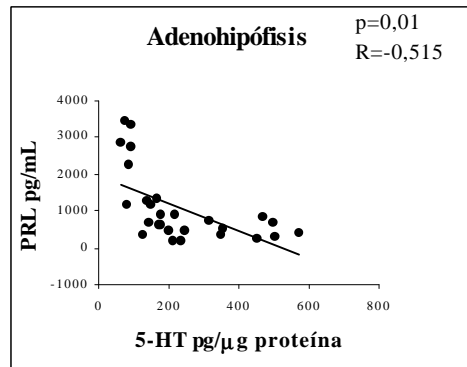
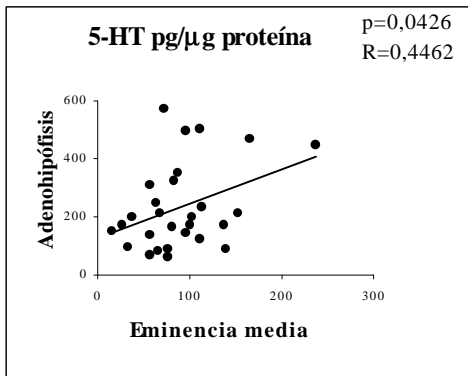
**Figura 50.-** Niveles circulantes de prolactina a lo largo del día y patrón diario de concentración de DA en la eminencia media y en la adenohipófisis en ratas macho adultas envejecidas. Los datos se expresan como media  $\pm$  eem.

***b.2.2.- Correlación entre los patrones de concentración de 5-HT en la eminencia media y en la adenohipófisis. Efecto sobre el ritmo secretor de prolactina***

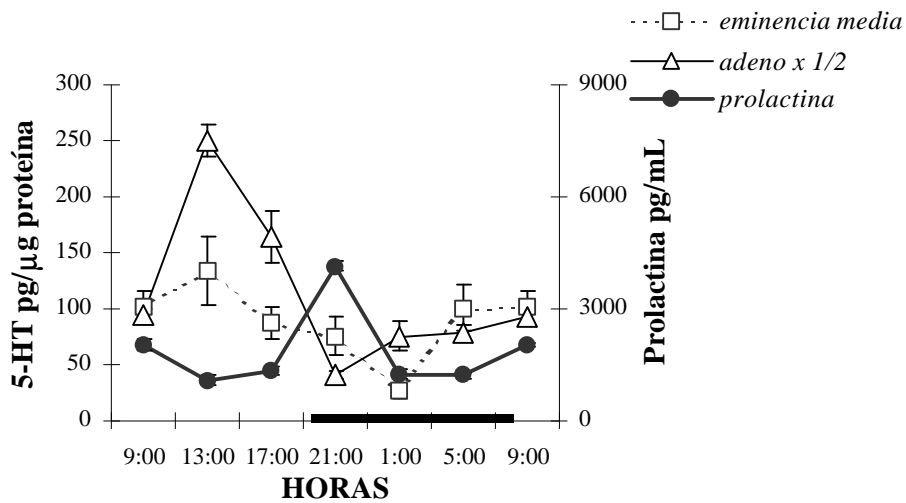
Las variaciones diarias de los niveles circulantes de prolactina y el patrón diario de concentración de 5-HT en la eminencia media y en la adenohipófisis en ratas macho adultas jóvenes y envejecidas, se representan en las figuras 52 y 54.

En los animales jóvenes, el contenido de 5-HT cambia a lo largo del día en la eminencia media ( $F=2,83$   $p=0,046$ ) y en la adenohipófisis ( $F=29,53$   $p=0,0001$ ), como se observa en la figura 52, y se ha descrito en los apartados a.3.3 y a.4.2. Como ocurría con la DA las variaciones diarias de contenido de 5-HT en ambos tejidos muestran una correlación positiva significativa ( $F=4,72$   $p=0,0426$ ), como puede observarse en la figura 51a. Sorprendentemente, el contenido de 5-HT en la adenohipófisis se correlaciona negativamente con el ritmo secretor de prolactina ( $F=7,94$   $p=0,01$ ).

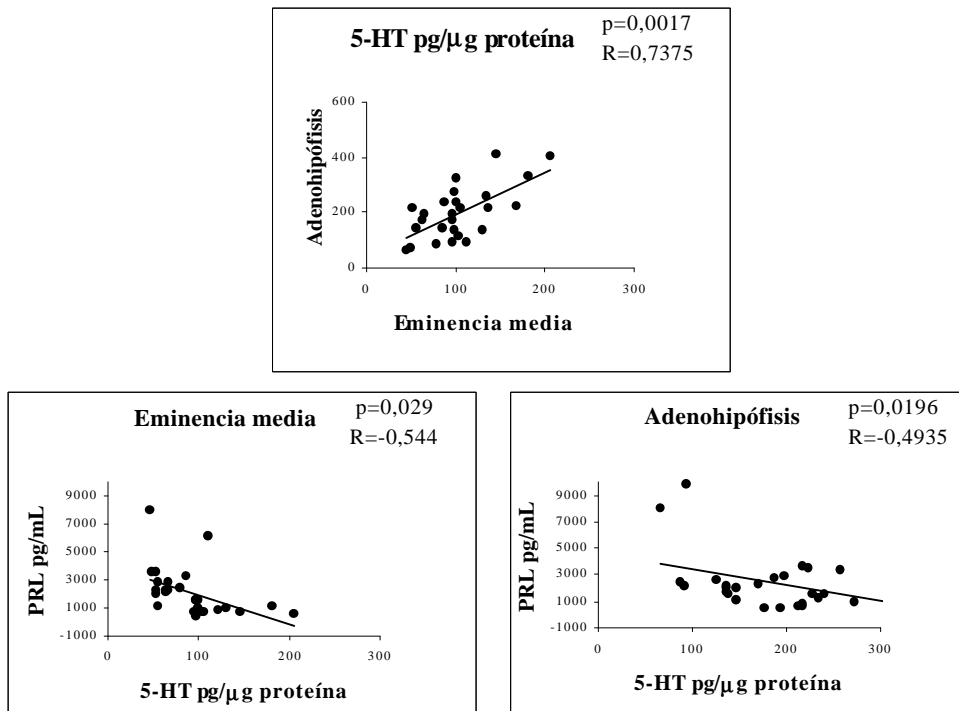
En los animales envejecidos, el patrón diario de contenido de 5-HT mantiene las variaciones diarias significativas de contenido tanto en la eminencia media ( $F=8,437$   $p=0,0013$ ) como en la adenohipófisis ( $F=6,41$   $p=0,0012$ ), como se observa en la figura 54; y se ha descrito en el apartado a.3.3. y a.4.2., para este grupo. En este grupo de animales envejecidos se mantiene la correlación positiva en las concentraciones diarias de 5-HT en ambos tejidos ( $F=15,50$   $p=0,0017$ ), al comparar con lo observado en animales jóvenes. Por otro lado, se mantiene la correlación negativa de 5-HT en la adenohipófisis con el ritmo secretor de prolactina ( $F=6,43$   $p=0,0196$ ) y aparece asimismo una correlación negativa entre la 5-HT de la eminencia media con el ritmo secretor de prolactina ( $F=5,88$   $p=0,0029$ ).



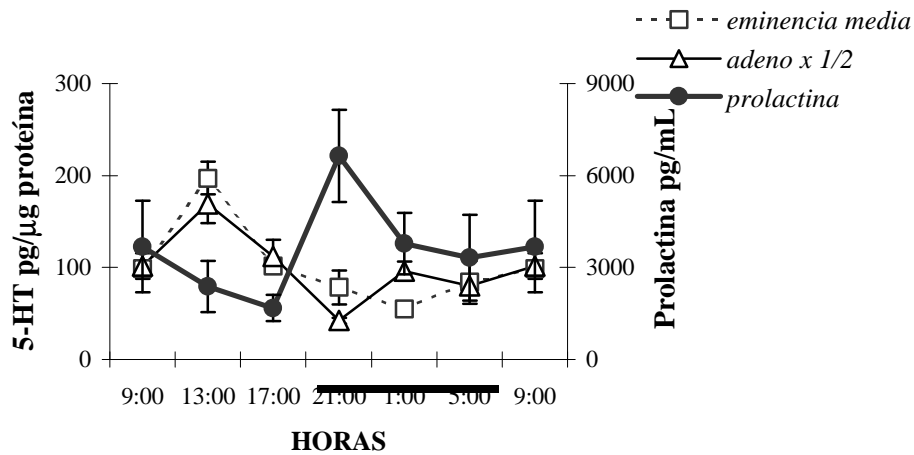
**Figuras 51a y 51b.-** Correlación entre la concentración de 5-HT en la eminencia media y en la adenohipófisis (figura 51a), y entre el patrón secretor de prolactina y la concentración de 5-HT en la adenohipófisis (figura 51b) en ratas macho adultas jóvenes. Se expresa el factor de correlación y su significado estadístico.



**Figura 52.-** Niveles circulantes de prolactina a lo largo del día y patrón diario de contenido de 5-HT en la eminencia media y en la adenohipófisis en ratas macho adultas jóvenes. Los datos se expresan como media  $\pm$  eem.



**Figuras 53a, 53b y 53c.**- Correlación entre la concentración de 5-HT en la eminencia media y en la adenohipofisis (figura 53a), y entre los patrones de contenido de 5-HT en la eminencia media y en adenohipofisis, y los niveles circulantes de prolactina (figura 53b y 53c respectivamente) en ratas macho envejecidas. Se expresa el factor de correlación y su significado estadístico.



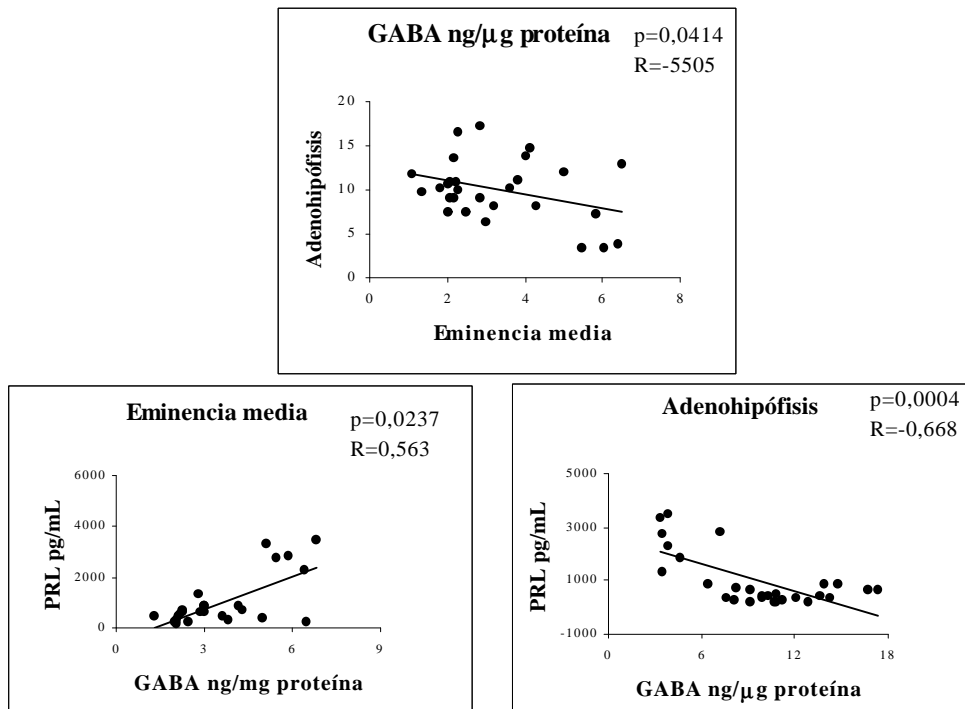
**Figura 54.**-Niveles circulantes de prolactina a lo largo del día y patrón diario de contenido de 5-HT en la eminencia media y en la adenohipofisis en ratas macho envejecidas. Los datos se expresan como media  $\pm$  eem.

***b.2.3.- Correlación entre los patrones de concentración de GABA en la eminencia media y en la adenohipófisis. Efecto sobre el ritmo secretor de prolactina***

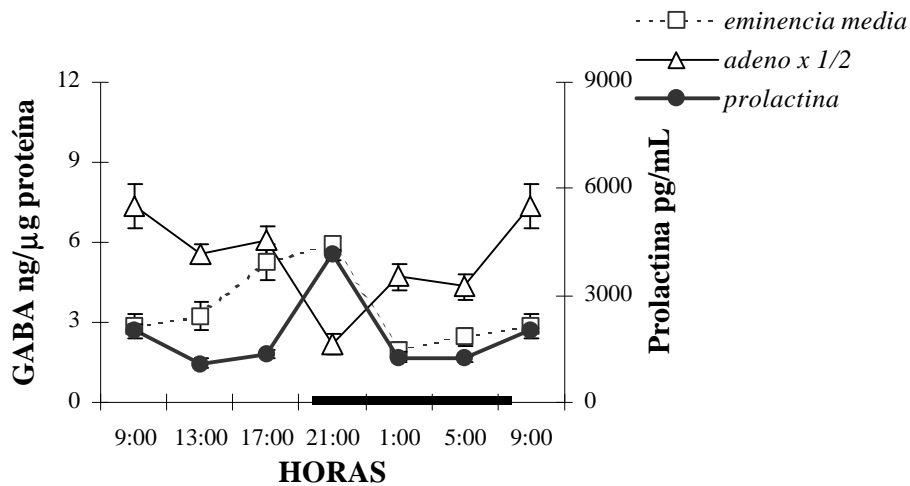
Los niveles circulantes de prolactina y el patrón diario de concentración de GABA en la eminencia media y en la adenohipófisis en ratas macho adultas jóvenes y envejecidas, se representan en las figuras 56 y 58.

En los animales jóvenes, el contenido de GABA muestra variaciones diarias significativas en las dos áreas estudiadas ( $F=11,54$   $p=0,0003$ ;  $F=12,44$   $p=0,0001$ ), como se ha descrito en los apartados a.3.4. y a.4.3., y se observa en la figura 56. A diferencia de lo que ocurría para la DA y la 5-HT, las variaciones diarias de GABA en la eminencia media correlacionan negativamente con la de la adenohipófisis ( $F=5,21$   $p=0,0414$ ). Mientras que las variaciones diarias en el contenido de GABA en la eminencia media correlaciona positivamente con el ritmo secretor de prolactina ( $F=6,44$   $p=0,0237$ ), en la adenohipófisis se observa una interacción negativa con los niveles circulantes de esta hormona ( $F=17,74$   $p=0,0004$ ).

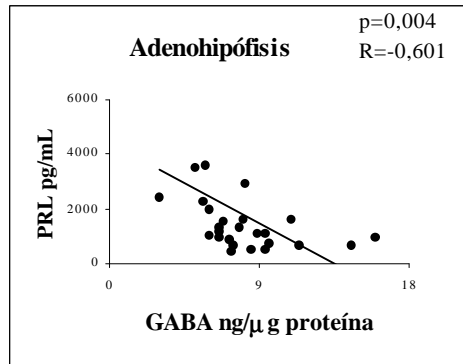
En los animales envejecidos, los resultados muestran que la concentración de GABA en la eminencia media y en la adenohipófisis varía significativamente a lo largo del día ( $F=2,82$   $p=0,049$ ;  $F=9,24$   $p=0,0002$ , respectivamente), como se ha descrito en los apartados a.3.4. y a.4.3., y se observa en la figura 58. Sin embargo, la correlación entre el contenido de este neurotransmisor en ambos tejidos no se mantiene, al compararlo con lo que se observaba en los animales jóvenes (no se muestra figura). Aunque, la concentración diaria de GABA en la adenohipófisis mantiene la correlación negativa con el ritmo secretor de prolactina ( $F=10,74$   $p=0,004$ ), como en el grupo de ratas jóvenes.



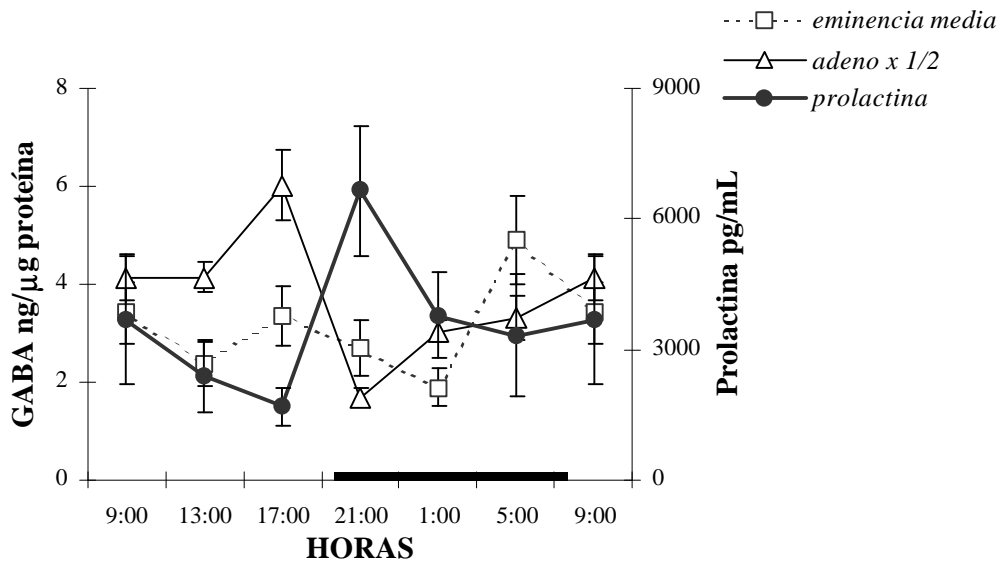
**Figuras 55a, 55b y 55c.-** Correlación entre la concentración de GABA en la eminencia media y en la adenohipófisis (figura 55a), y entre los niveles circulantes de prolactina y la concentración de GABA en los dos tejidos estudiados (figura 55b y 55c) en ratas macho adultas jóvenes. Se expresa el factor de correlación y su significado estadístico.



**Figura 56.-** Niveles circulantes de prolactina a lo largo del día y patrón diario de concentración de GABA en la eminencia media y en la adenohipófisis en ratas macho jóvenes. Los datos se expresan como media  $\pm$  eem.



**Figura 57.-** Correlación entre los niveles circulantes de prolactina y la concentración de GABA en la adenohipótesis en ratas macho envejecidas. Se expresa el factor de correlación y su significado estadístico.



**Figura 58.-** Niveles circulantes de prolactina a lo largo del día y patrón diario de concentración de GABA en la eminencia media y en la adenohipótesis en ratas macho envejecidas. Los datos se expresan como media  $\pm$  eem.

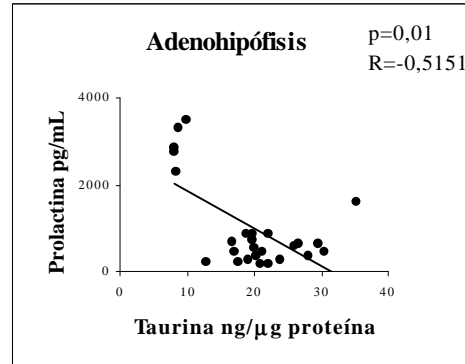
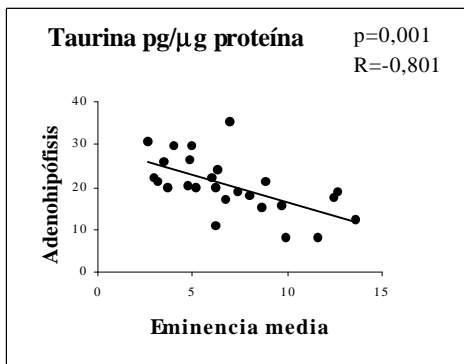
***b.2.4.- Correlación entre los patrones de concentración de taurina en la eminencia media y en la adenohipófisis. Efecto sobre el ritmo secretor de prolactina***

Los niveles circulantes de prolactina y el patrón diario de concentración de taurina en la eminencia media y en la adenohipófisis en ratas macho adultas jóvenes y envejecidas, se representan en las figuras 60 y 61.

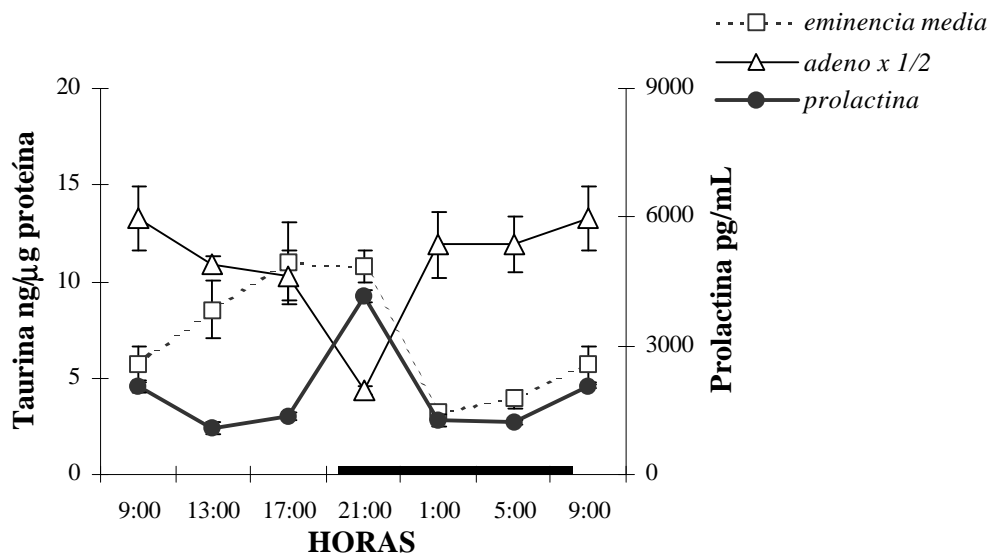
En los animales jóvenes, el contenido de taurina presenta variaciones diarias significativas en la eminencia media ( $F=6,23$   $p=0,0037$ ) y en la adenohipófisis ( $F=7,22$   $p=0,001$ ), como se ha descrito en los apartados a.3.5. y a.4.4., y se observa en la figura 60. Ambos patrones correlacionan negativamente ( $F=19,57$   $p=0,001$ ). Mientras que el patrón diario de taurina en la eminencia media no correlaciona con el patrón secretor de prolactina (no se muestra figura), se observa una correlación negativa entre la taurina adenohipofisaria y los niveles circulantes de prolactina ( $F=7,94$ ,  $p=0,01$ ), como puede observarse en la figura 59b.

En los animales envejecidos la concentración de taurina presenta cambios diarios significativos en la eminencia media ( $F=7,36$ ,  $p=0,0023$ ) y en la adenohipófisis ( $F=3,36$   $p=0,027$ ), como se ha descrito en los apartados a.3.5. y a.4.4., y se observa en la figura 61. A diferencia de lo que se mostraba en el grupo de animales jóvenes, la taurina no correlaciona con el patrón secretor de prolactina ni en la eminencia media ni en la adenohipófisis (no se muestran figuras).

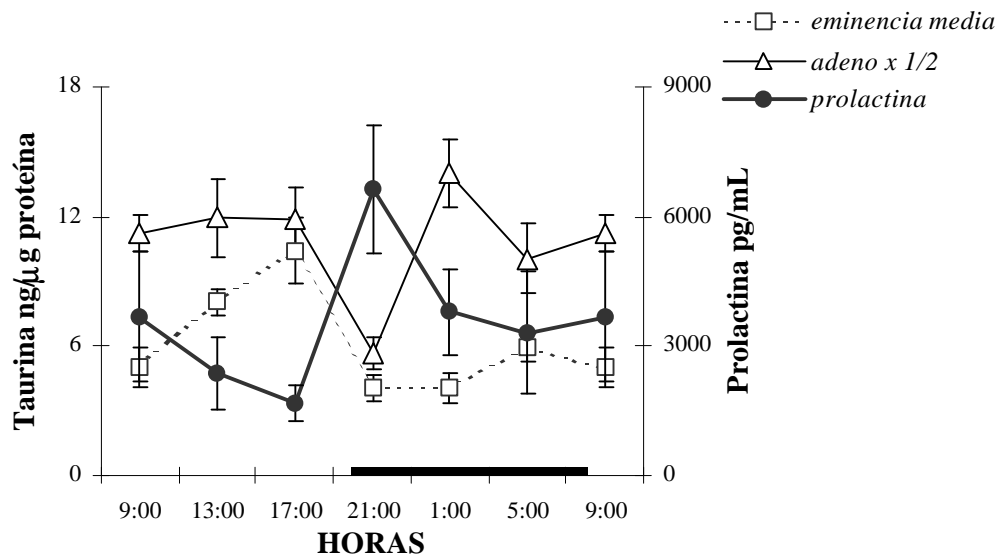




**Figura 59a y 59b.-** Correlación entre la concentración de taurina en la eminencia media y en la adenohipófisis (figura 59a), y entre los niveles circulantes de prolactina y el contenido diario de taurina en la adenohipófisis (figura 59b). Se expresa el factor de correlación y su significado estadístico.



**Figura 60.-** Niveles circulantes de prolactina a lo largo del día y patrón diario de contenido de taurina en la eminencia media y en la adenohipófisis de ratas macho jóvenes. Los datos se expresan como media  $\pm$  eem.



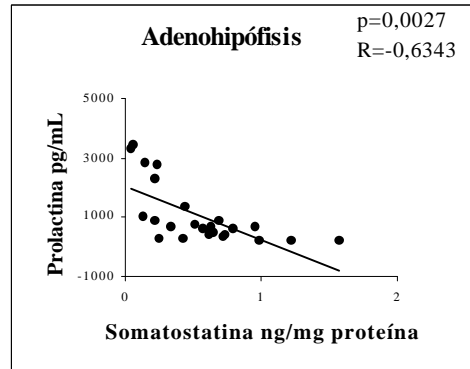
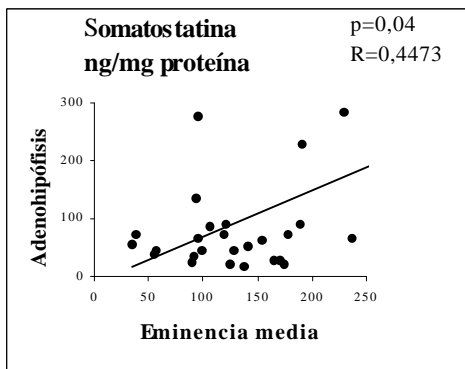
**Figura 61.-** Niveles circulantes de prolactina y patrón diario de contenido de taurina en la eminencia media y en la adenohipófisis en ratas macho envejecidas. Los datos se expresan como media  $\pm$  eem.

***b.2.5.- Correlación entre los patrones de concentración de somatostatina en la eminencia media y en la adenohipófisis. Efecto sobre el ritmo secretor de prolactina***

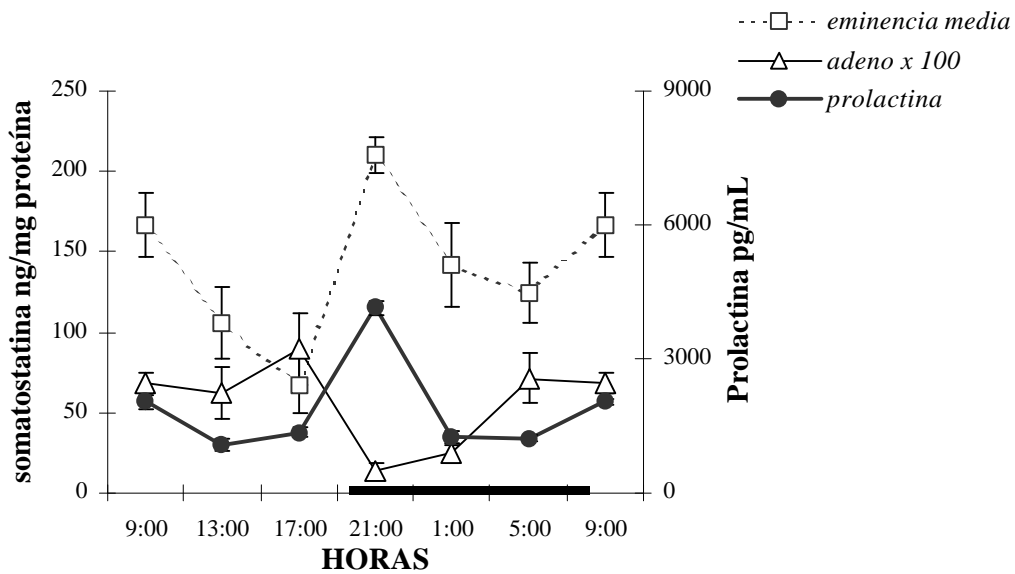
Los niveles circulantes de prolactina y el patrón diario de concentración de somatostatina en la eminencia media y en la adenohipófisis en ratas macho adultas jóvenes y envejecidas, se representan en las figuras 63 y 65.

En los animales jóvenes, el contenido de somatostatina varía significativamente a lo largo del día en las dos áreas estudiadas ( $F=5,033$   $p=0,0042$ ;  $F=3,68$   $p=0,0207$ ), como se ha descrito en los apartados a.3.6 y a.4.5., y se observa en la figura 63. Se muestra una correlación positiva en el contenido de somatostatina de ambos tejidos ( $F=4,81$   $p=0,04$ ). Además, la concentración de este neuropéptido en la adenohipófisis correlaciona negativamente con el ritmo secretor de prolactina ( $F=12,11$   $p=0,0027$ ), como se observa en la figura 62b.

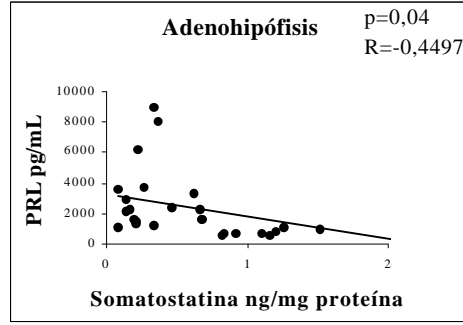
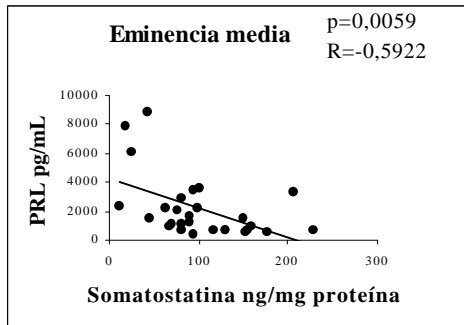
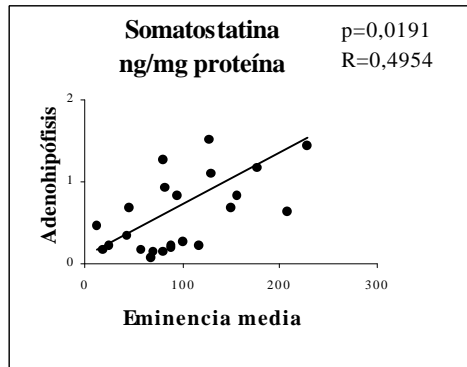
En los animales envejecidos, la concentración de este neuropéptido varía significativamente en la eminencia media y en la adenohipófisis ( $F=6,93$   $p=0,011$ ;  $F=7,54$   $p=0,0006$ , respectivamente) como se ha descrito en los apartados a.3.6. y a.4.5., y se observa en la figura 65. Como ocurría en animales jóvenes se detecta una correlación positiva en la concentración diaria del neuropéptido en ambos tejidos ( $F=6,50$   $p=0,0191$ ). Además, los niveles de somatostatina en la eminencia media y en la adenohipófisis correlacionan negativamente con los niveles circulantes de prolactina ( $F=9,72$   $p=0,0059$ ;  $F=4,81$   $p=0,0408$ , respectivamente), como puede observarse en las figuras 64b y 64c.



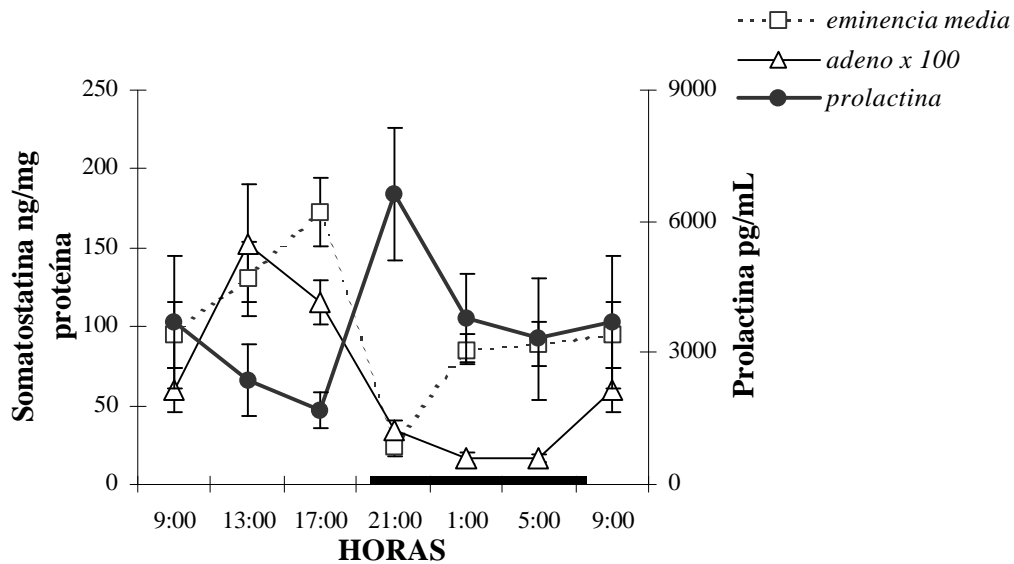
**Figuras 62a y 62b.-** Correlación entre la concentración de somatostatina en la eminencia media y en la adenohipófisis (figura 62a), y entre los niveles circulantes de prolactina y el contenido de somatostatina en la adenohipófisis (figura 62b) en ratas macho adultas jóvenes. Se expresa el factor de correlación su significado estadístico.



**Figura 63.-** Niveles circulantes de prolactina a lo largo del día y patrón diario de contenido de somatostatina en la eminencia media y en la adenohipófisis en ratas macho adultas jóvenes. Los datos se expresan como media  $\pm$  eem.



**Figuras 64a, 64b y 64c.-** Correlación entre la concentración de somatostatina en la eminencia media y en la adenohipófisis (figura 64a), y entre los niveles circulantes de prolactina y la concentración de somatostatina en la eminencia media y en la adenohipófisis (figura 64b y 64c) en ratas macho envejecidas. Se expresa el factor de correlación y su significado estadístico.



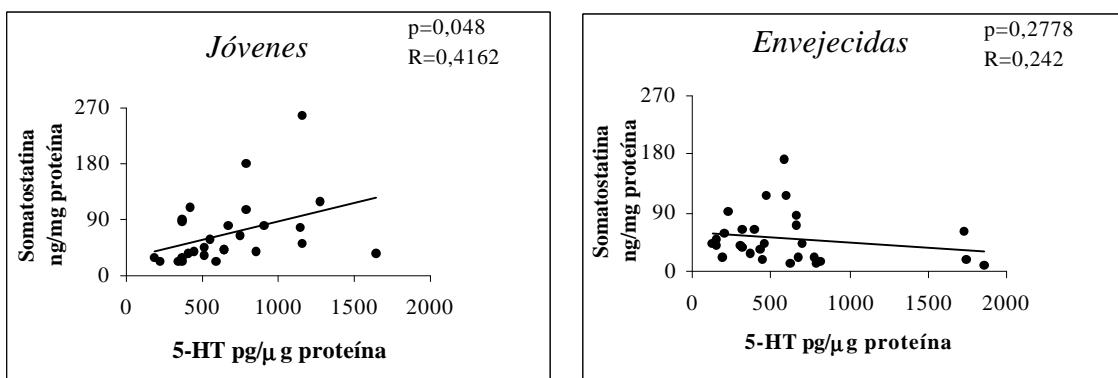
**Figura 65.-** Niveles circulantes de prolactina y patrón diario de contenido de somatostatina en la eminencia media y en la adenohipófisis en ratas macho envejecidas. Los datos se expresan como media  $\pm$  eem.

### C) EFECTO DE LA EDAD SOBRE LOS MECANISMOS DE INTERRELACION ENTRE LOS NEUROMODULADORES, ESTUDIADOS, IMPLICADOS EN LA REGULACIÓN DE GH

#### c.1.- Correlaciones entre las variaciones diarias de concentración de somatostatina y el resto de los neuromoduladores estudiados, en el hipotálamo anterior

##### *c.1.1.- Correlación entre los patrones diarios de concentración de 5-HT y de somatostatina en animales jóvenes y envejecidos*

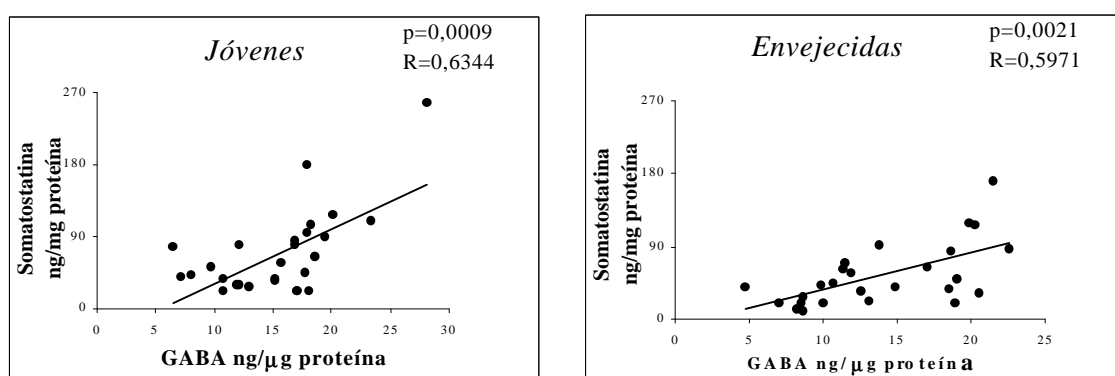
La correlación entre la concentración de 5-HT y somatostatina a lo largo del día, en el hipotálamo anterior, en animales jóvenes y envejecidos se representa en las figuras 66a y 66b. En los animales jóvenes, la concentración de 5-HT y de somatostatina varía significativamente a lo largo del día en este tejido ( $F=4,45$   $p=0,0059$ ;  $F=8,98$   $p=0,0002$  respectivamente), como se ha descrito en los apartados a.1.3. y a.1.6. Ambos patrones correlacionan positivamente ( $F=4,39$   $p=0,0483$ ), como se observa en la figura 66a. En los animales envejecidos el contenido de estos dos neuromoduladores mantiene variaciones diarias significativas ( $F=12,26$   $p=0,0001$ ;  $F=5,71$   $p=0,0022$ , respectivamente). Sin embargo, la correlación observada en los animales jóvenes desaparece.



**Figuras 66a y 66b.-** Correlación entre la concentración de 5-HT y somatostatina en el hipotálamo anterior en ratas macho adultas jóvenes y envejecidas. Se expresa el factor de correlación y su significado estadístico.

**c.1.2.- Correlación entre los patrones diarios de concentración de GABA y de somatostatina en animales jóvenes y envejecidos**

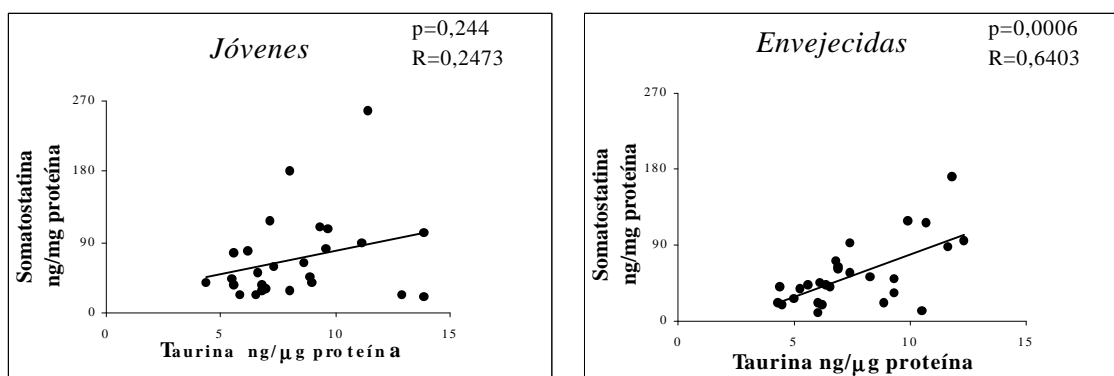
La correlación entre la concentración de GABA y somatostatina a lo largo del día, en el hipotálamo anterior, en animales jóvenes y envejecidos se representa en las figuras 67a y 67b. En los animales jóvenes, la concentración de GABA y de somatostatina varía significativamente a lo largo del día en este tejido ( $F=4,66$   $p=0,0047$ ;  $F=8,98$   $p=0,0002$  respectivamente), como se ha descrito en los apartados a.1.4. y a.1.6. Ambos patrones correlacionan positivamente ( $F=14,81$   $p=0,0009$ ), como se observa en la figura 67a. En los animales envejecidos el contenido de estos dos neuromoduladores mantiene variaciones diarias significativas ( $F=6,01$   $p=0,0013$ ;  $F=5,71$   $p=0,0022$ , respectivamente). Asimismo, la correlación observada en los animales jóvenes se mantiene ( $F=12,19$   $p=0,0021$ ).



**Figuras 67a y 67b.-** Correlación entre la concentración de GABA y somatostatina en el hipotálamo anterior en ratas macho adultas jóvenes y envejecidas. Se expresa el factor de correlación y su significado estadístico.

### *c.1.3.- Correlación entre los patrones diarios de concentración de taurina y de somatostatina en animales jóvenes y envejecidos*

La correlación entre la concentración de taurina y somatostatina a lo largo del día, en el hipotálamo anterior, en animales jóvenes y envejecidos se representa en las figuras 68a y 68b. En los animales jóvenes, la concentración de taurina y de somatostatina varía significativamente a lo largo del día en este tejido ( $F=3,189$   $p=0,0258$ ;  $F=8,98$   $p=0,0002$  respectivamente), como se ha descrito en los apartados a.1.5. y a.1.6. Ambos patrones no correlacionan ( $F=1,43$   $p=0,244$ ), como se observa en la figura 68a. En los animales envejecidos el contenido de estos dos neuromoduladores mantiene variaciones diarias significativas ( $F=4,57$   $p=0,0052$ ;  $F=5,71$   $p=0,0022$ , respectivamente). Sin embargo, la concentración de taurina y somatostatina en el hipotálamo anterior correlacionan significativamente, a diferencia de lo observado en los animales jóvenes ( $F=15,98$   $p=0,0006$ ).



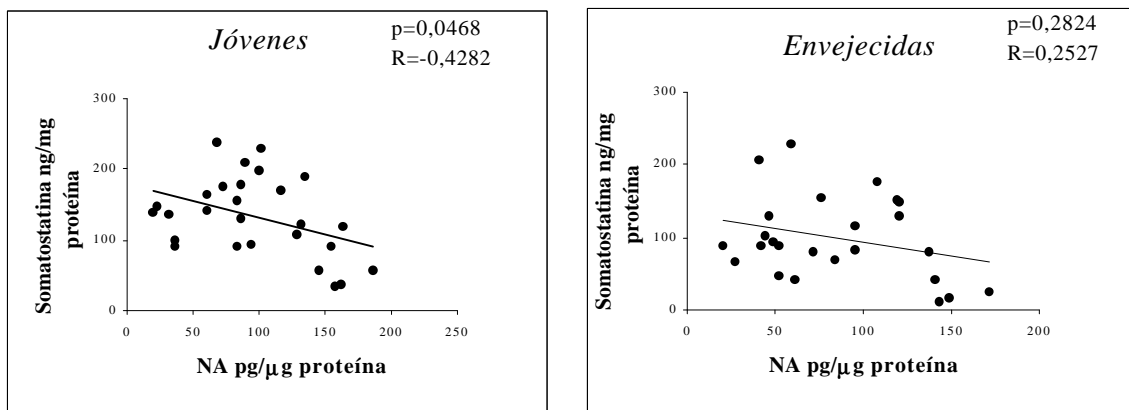
**Figuras 68a y 68b.-** Correlación entre la concentración de taurina y somatostatina en el hipotálamo anterior en ratas macho adultas jóvenes y envejecidas. Se expresa el factor de correlación y su significado estadístico.



**c.2.- Correlaciones entre las variaciones diarias de concentración de somatostatina y el resto de los neuromoduladores estudiados, en la eminencia media**

**c.2.1.- Correlación entre los patrones diarios de concentración de NA y de somatostatina en animales jóvenes y envejecidos**

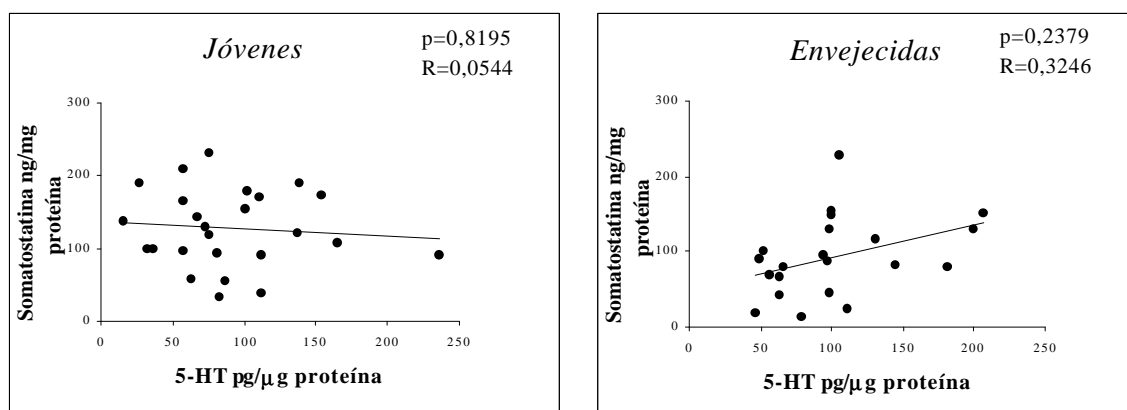
La correlación entre la concentración de NA y somatostatina a lo largo del día, en la eminencia media, en animales jóvenes y envejecidos se representa en las figuras 69a y 69b. En los animales jóvenes, la concentración de NA y de somatostatina varía significativamente a lo largo del día en este tejido ( $F=16,80$   $p=0,0001$ ;  $F=5,033$   $p=0,042$ , respectivamente), como se ha descrito en los apartados a.3.1. y a.3.6. Ambos patrones correlacionan negativamente ( $F=4,48$   $p=0,0468$ ), como se observa en la figura 69a. En los animales envejecidos el contenido de estos dos neuromoduladores mantiene variaciones diarias significativas ( $F=9,59$   $p=0,0002$ ,  $F=6,93$   $p=0,0011$  ;respectivamente). Sin embargo, la correlación observada en los animales jóvenes desaparece, como se observa en la figura 69b.



**Figuras 69a y 69b.-** Correlación entre la concentración de NA y somatostatina en la eminencia media en ratas macho adultas jóvenes y envejecidas. Se expresa el factor de correlación y su significado estadístico.

### ***c.2.2.- Correlación entre los patrones de concentración de 5-HT y de somatostatina en los animales jóvenes y envejecidos***

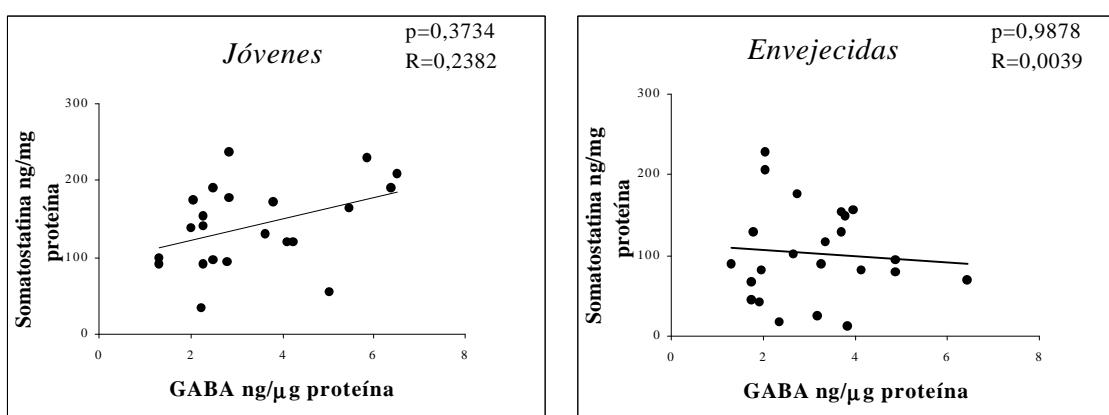
La correlación entre los patrones de contenido de 5-HT y de somatostatina en la eminencia media de ratas jóvenes y envejecidas se observa en las figuras 70a y 70b. En los animales jóvenes, la concentración de 5-HT y de somatostatina varía significativamente a lo largo del día ( $F=2,83$   $p=0,046$ ;  $F=5,033$   $p=0,0042$ , respectivamente), como se ha descrito en los apartados a.3.3. y a.3.6. Ambos patrones de concentración no correlacionan en este tejido estudiado, como puede observarse en la figura 70a. En los animales envejecidos, el contenido diario de 5-HT y de somatostatina mantiene variaciones significativamente a lo largo del día ( $F=8,4375$   $p=0,0013$ ;  $F=6,93$   $p=0,0011$ , respectivamente). Como ocurría en animales jóvenes, ambos patrones no correlacionan significativamente, como se muestra en la figura 70b.



**Figuras 70a y 70b.-** Correlación entre la concentración de 5-HT y somatostatina en la eminencia media en ratas macho adultas jóvenes y envejecidas. Se expresa el factor de correlación y su significado estadístico.

**c.2.3.- Correlación entre los patrones de concentración de GABA y de somatostatina en los animales jóvenes y envejecidos**

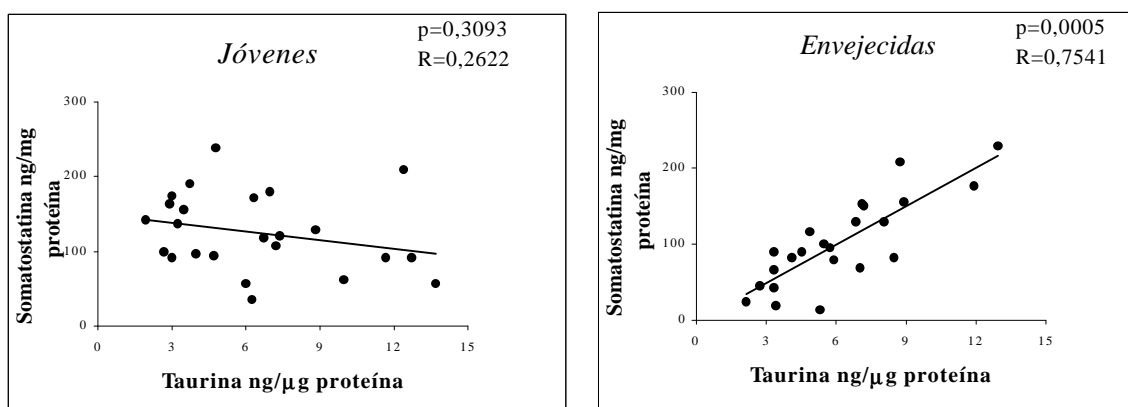
La correlación entre la concentración de GABA y de somatostatina en la eminencia media de ratas macho adultas jóvenes y envejecidas se observa en la figura 71a y 71b. En los animales jóvenes, ambos neurotransmisores presentan patrones de contenido, que muestran variaciones significativas a lo largo del día ( $F=11,54$   $p=0,0003$ ;  $F=5,033$   $p=0,0042$  respectivamente), como se ha descrito en los apartados a.3.4. y a.3.6. Sin embargo, ambos patrones no correlacionan significativamente, como se observa en la figura 71a. Asimismo, en los animales envejecidos, los niveles de GABA y de somatostatina mantienen cambios diarios significativos ( $F=2,82$   $p=0,049$ ;  $F=6,93$   $p=0,011$ , respectivamente). Además, ambos patrones no muestran una correlación significativa, al igual que observamos en los animales jóvenes, como se muestra en la figura 71b.



**Figuras 71a y 71b.-** Correlación entre la concentración de GABA y de somatostatina en la eminencia media en ratas macho adultas jóvenes y envejecidas. Se expresa el factor de correlación y su significado estadístico.

#### ***c.2.4.- Correlación entre los patrones de concentración de taurina y de somatostatina en los animales jóvenes y envejecidos***

La interacción entre la concentración de taurina y de somatostatina en la eminencia media de ratas macho adultas jóvenes y envejecidas se observan en las figuras 72a y 72b. En los animales jóvenes, el contenido diario de taurina y de somatostatina varía significativamente ( $F=6,23$   $p=0,0037$ ;  $F=5,033$   $p=0,0042$ ), como se ha descrito en los apartados a.3.5. y a.3.6., respectivamente. Sin embargo, ambos patrones diarios no correlacionan, como puede observarse en la figura 72a. En los animales envejecidos, los niveles de taurina y de somatostatina mantienen variaciones significativamente a lo largo del día ( $F=7,36$   $p=0,0023$ ;  $F=6,93$   $p=0,0011$ ). Sin embargo, a diferencia de lo que ocurría en animales jóvenes ambos patrones correlacionan positivamente ( $F=19,77$   $p=0,0005$ ), como se muestra en la figura 72b.

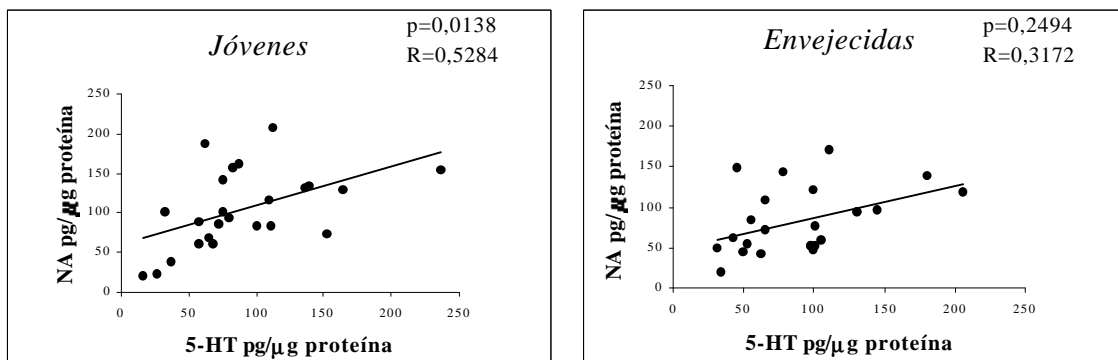


**Figuras 72a y 72b.-** Interacción entre la concentración de taurina y de somatostatina en la eminencia media en ratas macho adultas jóvenes y envejecidas. Se expresa el factor de correlación y su significado estadístico.

**c.3.- Correlaciones entre las variaciones diarias de concentración de NA y de 5-HT, GABA o taurina, en la eminencia media**

***c.3.1.- Correlación entre los patrones de concentración de 5-HT y de NA en los animales jóvenes y envejecidos***

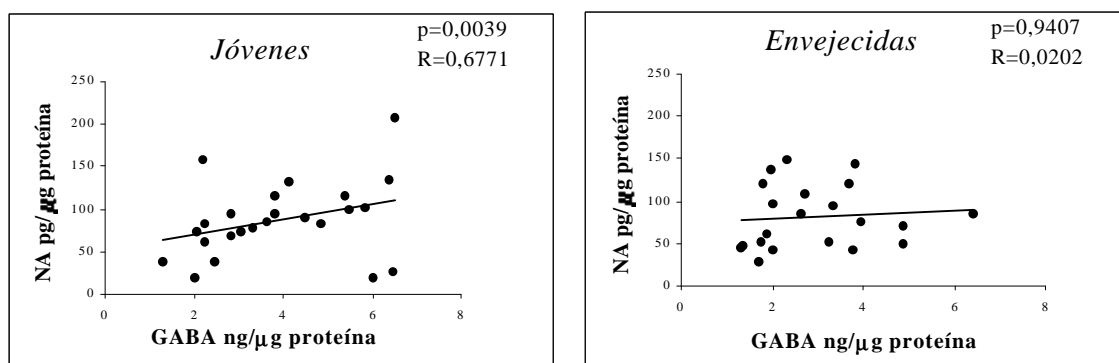
La interacción entre la concentración de 5-HT y de NA en la eminencia media de ratas macho adultas jóvenes y envejecidas se observan en las figuras 73a y 73b. En los animales jóvenes, el contenido diario de 5-HT y de NA varía significativamente ( $F=2,83$   $p=0,046$ ;  $F=16,80$   $p=0,0001$ ), como se ha descrito en los apartados a.3.3. y a.3.1., respectivamente. Ambos patrones diarios correlacionan positivamente ( $F=7,35$   $p=0,0138$ ), como puede observarse en la figura 73a. En los animales envejecidos, los niveles de 5-HT y de NA mantienen variaciones significativamente a lo largo del día ( $F=8,43$   $p=0,0013$ ;  $F=9,59$   $p=0,0002$ ). Sin embargo, a diferencia de lo que ocurría en animales jóvenes ambos patrones no correlacionan, como se muestra en la figura 73b.



**Figuras 73a y 73b.-** Interacción entre la concentración de NA y de 5-HT en la eminencia media en ratas macho adultas jóvenes y envejecidas. Se expresa el factor de correlación y su significado estadístico

### c.3.2.- Correlación entre los patrones de concentración de GABA y de NA en los animales jóvenes y envejecidos

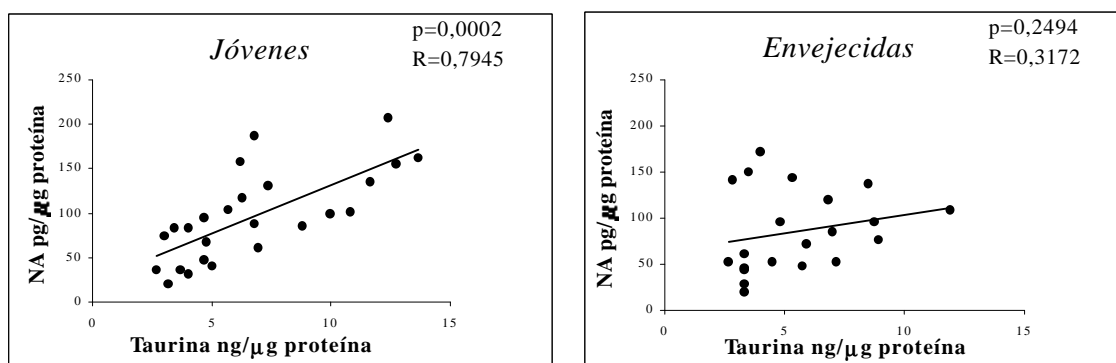
La interacción entre la concentración de GABA y de NA en la eminencia media de ratas macho adultas jóvenes y envejecidas se observan en las figuras 74a y 74b. En los animales jóvenes, el contenido diario de GABA y de NA varía significativamente ( $F=11,54$   $p=0,0003$ ;  $F=16,80$   $p=0,0001$ ), como se ha descrito en los apartados a.3.4. y a.3.1., respectivamente. Ambos patrones diarios correlacionan positivamente ( $F=11,89$   $p=0,0039$ ), como puede observarse en la figura 74a. En los animales envejecidos, los niveles de GABA y de NA mantienen variaciones significativamente a lo largo del día ( $F=2,82$   $p=0,049$ ;  $F=9,59$   $p=0,0002$ ). Sin embargo, a diferencia de lo que ocurría en animales jóvenes ambos patrones no correlacionan, como se muestra en la figura 74b.



**Figuras 74a y 74b.-** Interacción entre la concentración de NA y de GABA en la eminencia media en ratas macho adultas jóvenes y envejecidas. Se expresa el factor de correlación y su significado estadístico

### c.3.3.- Correlación entre los patrones de concentración de taurina y de NA en los animales jóvenes y envejecidos

La interacción entre la concentración de taurina y de NA en la eminencia media de ratas macho adultas jóvenes y envejecidas se observan en las figuras 75a y 75b. En los animales jóvenes, el contenido diario de taurina y de NA varía significativamente ( $F=6,23$   $p=0,0037$ ;  $F=16,80$   $p=0,0001$ ), como se ha descrito en los apartados a.3.5. y a.3.1., respectivamente. Ambos patrones diarios correlacionan positivamente ( $F=11,89$   $p=0,0002$ ), como puede observarse en la figura 75a. En los animales envejecidos, los niveles de taurina y de NA mantienen variaciones significativamente a lo largo del día ( $F=7,36$   $p=0,0023$ ;  $F=9,59$   $p=0,0002$ ). Sin embargo, a diferencia de lo que ocurría en animales jóvenes ambos patrones no correlacionan, como se muestra en la figura 75b.



**Figuras 75a y 75b.-** Interacción entre la concentración de NA y de taurina en la eminencia media en ratas macho adultas jóvenes y envejecidas. Se expresa el factor de correlación y su significado estadístico

**c.4.- Relaciones entre los patrones de concentración de los neuromoduladores estudiados en la eminencia media y la adenohipófisis en animales jóvenes y envejecidos. Efecto sobre el ritmo secretor de GH**

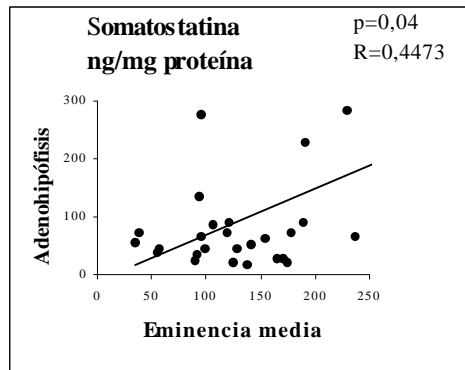
***c.4.1.- Correlación entre los patrones de concentración de somatostatina en la eminencia media y en la adenohipófisis. Efecto sobre el ritmo secretor de GH***

Los niveles circulantes de GH y el patrón diario de concentración de somatostatina en la eminencia media y en la adenohipófisis en ratas macho adultas jóvenes y envejecidas, se representan en las figuras 77 y 79.

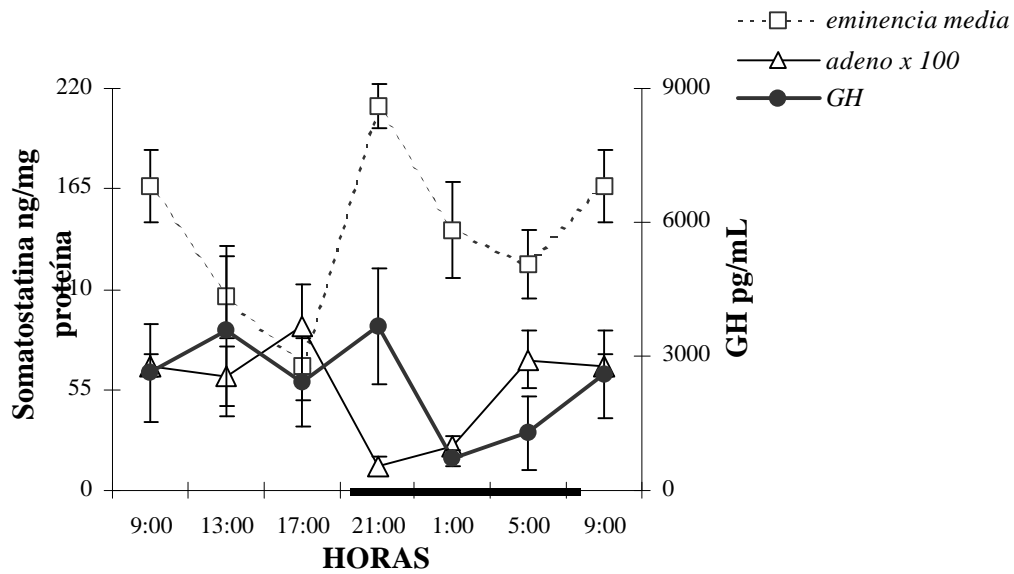
En los animales jóvenes, el contenido de somatostatina varía significativamente a lo largo del día en la eminencia media ( $F=5,033$   $p=0,0042$ ) y en la adenohipófisis ( $F=3,6854$   $p=0,0207$ ), como se ha descrito en los apartados a.3.6. y a.4.5., y se observa en la figura 77. Ambos patrones correlacionan significativamente ( $F=4,81$   $p=0,04$ ). Sorprendentemente, tanto el contenido diario de somatostatina en la eminencia media como en la adenohipófisis no correlacionan con el patrón secretor de GH, en el grupo de ratas adultas jóvenes (no se muestran figuras)

En las ratas envejecidas, la concentración de somatostatina en la eminencia media y en la adenohipófisis mantiene variaciones significativas a lo largo del día ( $F=6,93$   $p=0,0011$ ;  $F=7,54$   $p=0,0006$  respectivamente), como se ha descrito en los apartados a.3.6. y a.4.5., y se observa en la figura 79. Como ocurría en animales jóvenes, ambos patrones correlacionan significativamente ( $F=6,5$   $p=0,0191$ ), como se muestra en la figura 78. De nuevo, como mostramos en animales jóvenes, la concentración de este neuropéptido tanto en la eminencia media como en la adenohipófisis no interaccionan con los niveles circulantes de GH (no se muestran figuras).

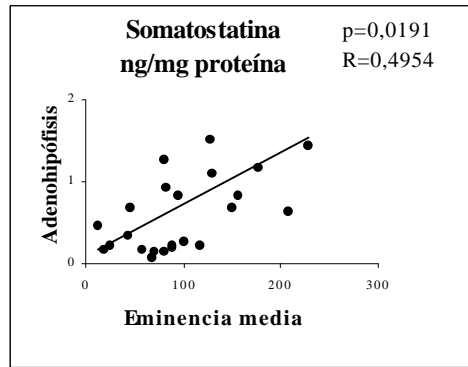




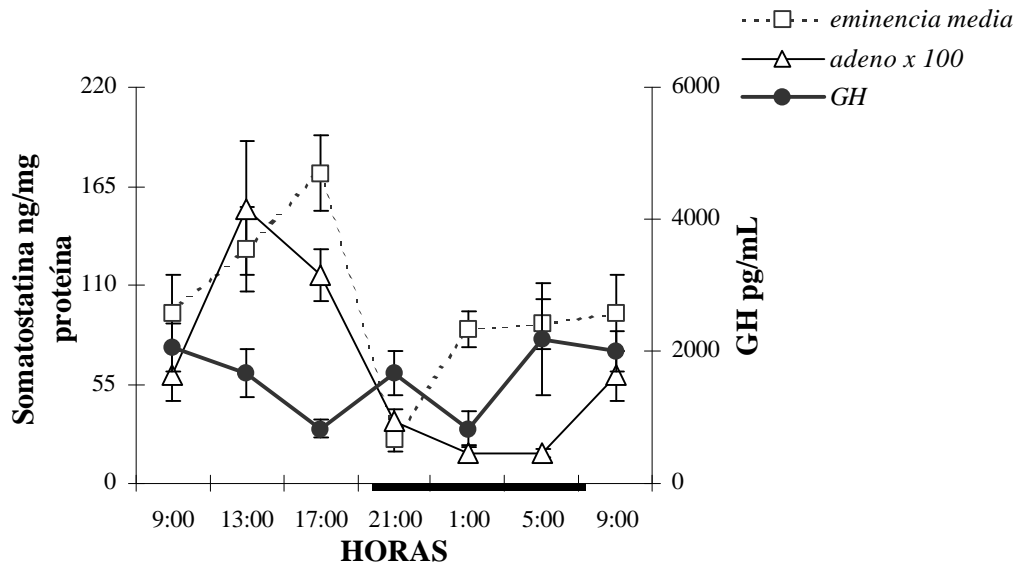
**Figura 76.-** Correlación entre la concentración de somatostatina en la eminencia media y en la adenohipófisis en ratas macho jóvenes. Se expresa el factor de correlación y su significado estadístico



**Figura 77.-** Patrón diario de secreción de la GH y de la concentración de somatostatina en la eminencia media y en la adenohipófisis en ratas macho adultas jóvenes. Los datos se expresan como media  $\pm$  eem.



**Figura 78.-** Correlación entre la concentración de somatostatina en la eminencia media y en la adenohipófisis en ratas macho envejecidas. Se expresa el factor de correlación y su significado estadístico.



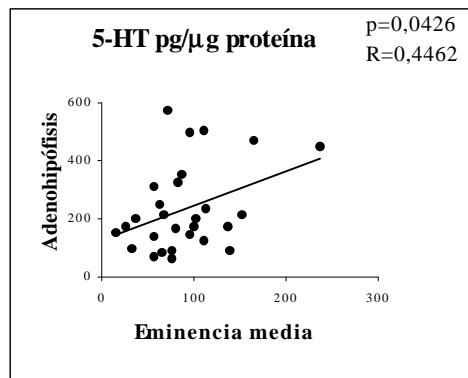
**Figura 79.-** Patrón diario de secreción de la GH y de la concentración de somatostatina en la eminencia media y en la adenohipófisis en ratas macho envejecidas. Los datos se expresan como media  $\pm$  eem.

***c.4.2.- Correlación entre los patrones de concentración de 5-HT en la eminencia media y en la adenohipófisis. Efecto sobre el ritmo secretor de GH***

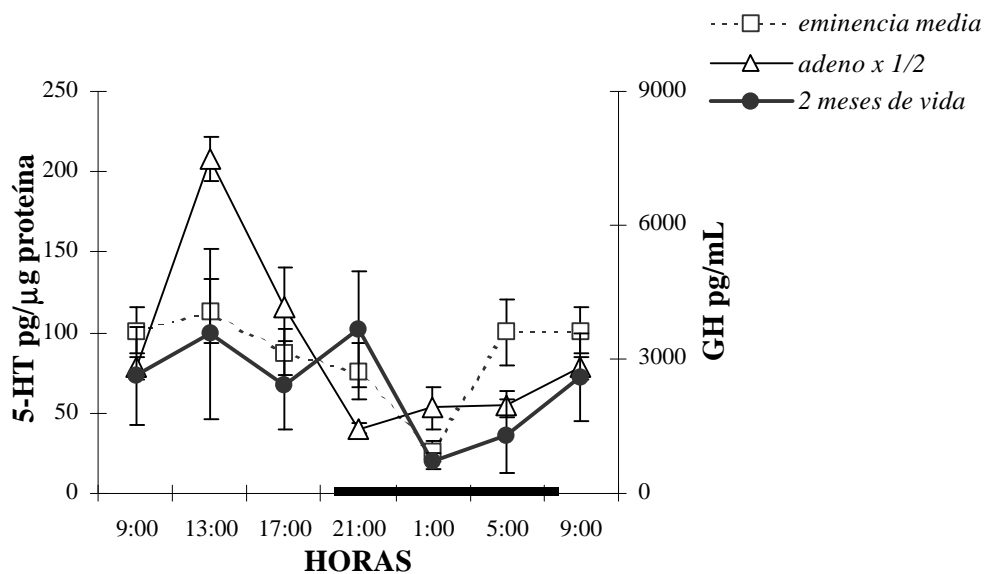
Los niveles circulantes de GH y el patrón diario de concentración de 5-HT en la eminencia media y en la adenohipófisis en ratas macho adultas jóvenes y envejecidas, se representan en las figuras 81 y 83.

En los animales jóvenes, la concentración de 5-HT muestra variaciones diarias significativas en la eminencia media y en la adenohipófisis ( $F=2,83$   $p=0,046$ ;  $F=29,53$   $p=0,0001$ ), como se ha descrito en los apartados a.3.3. y a.4.2., y se observa en la figura 81. Ambos patrones correlacionan positivamente ( $F=4,72$   $p=0,0426$ ), como se muestra en la figura 80. Sin embargo, los niveles diarios de 5-HT en la eminencia media y en la adenohipófisis no correlacionan con los niveles circulantes de GH (no se muestran figuras).

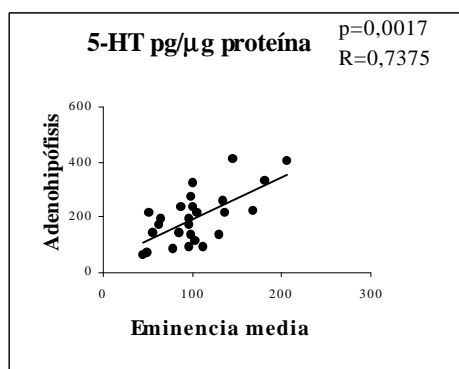
En los animales envejecidos, la concentración de 5-HT en la eminencia media y en la adenohipófisis sigue manteniendo variaciones significativamente a lo largo del día ( $F=8,435$   $p=0,0013$ ;  $F=6,41$   $p=0,0012$ ), como se presenta en la figura 83. Ambos patrones correlacionan positivamente ( $F=15,50$   $p=0,0017$ ), como se muestra en la figura 82. Por otro lado como se observaba en animales jóvenes, tanto el contenido de 5-HT en la eminencia media como en la adenohipófisis no correlacionan con los valores circulantes de GH (no se muestra figura).



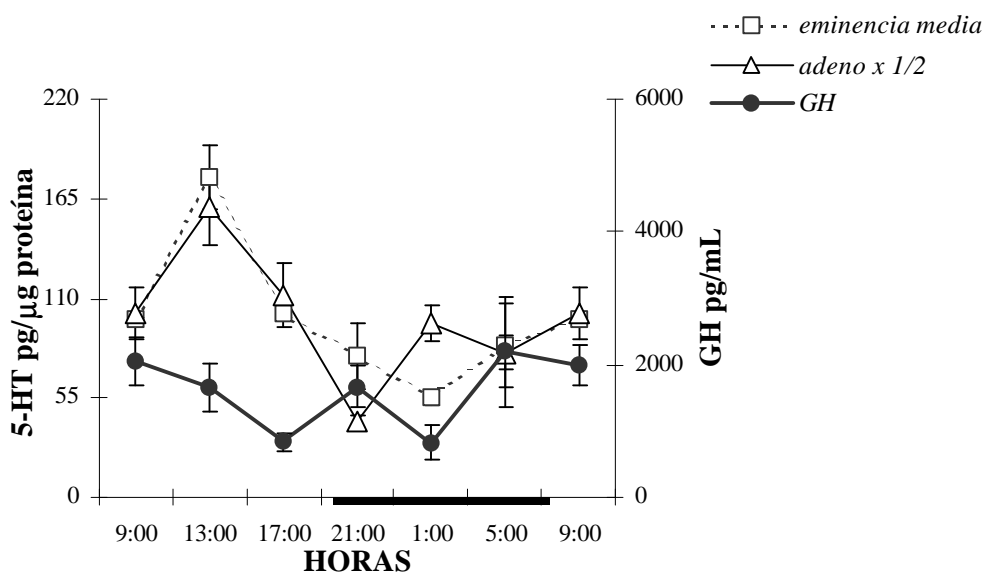
**Figura 80.-** Correlación entre la concentración de 5-HT en la eminencia media y en la adenohipófisis en ratas macho adultas jóvenes. Se expresa el factor de correlación y su significado estadístico.



**Figura 81.-** Patrón diario de secreción de GH y de la concentración de 5-HT en la eminencia media y en la adenohipófisis en ratas macho adultas jóvenes. Los datos se expresan como media  $\pm$  eem.



**Figura 82.-** Correlación entre la concentración de 5-HT en la eminencia media y en la adenohipófisis, en ratas macho envejecida. Se expresa el factor de correlación y su significado estadístico.



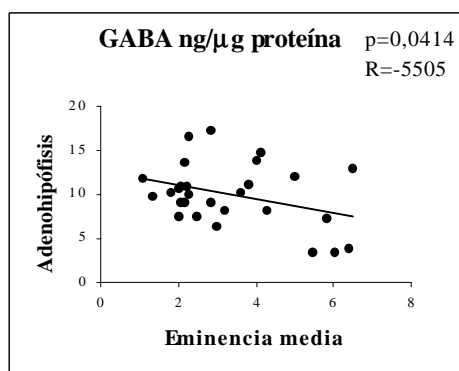
**Figura 83.-** Patrón diario de secreción de GH y de la concentración de 5-HT en la eminencia media y en la adenohipófisis en ratas macho envejecidas. Los datos se expresan como media  $\pm$  eem.

#### ***c.4.3.- Correlación entre los patrones de concentración de GABA en la eminencia media y en la adenohipófisis. Efecto sobre el ritmo secretor de GH***

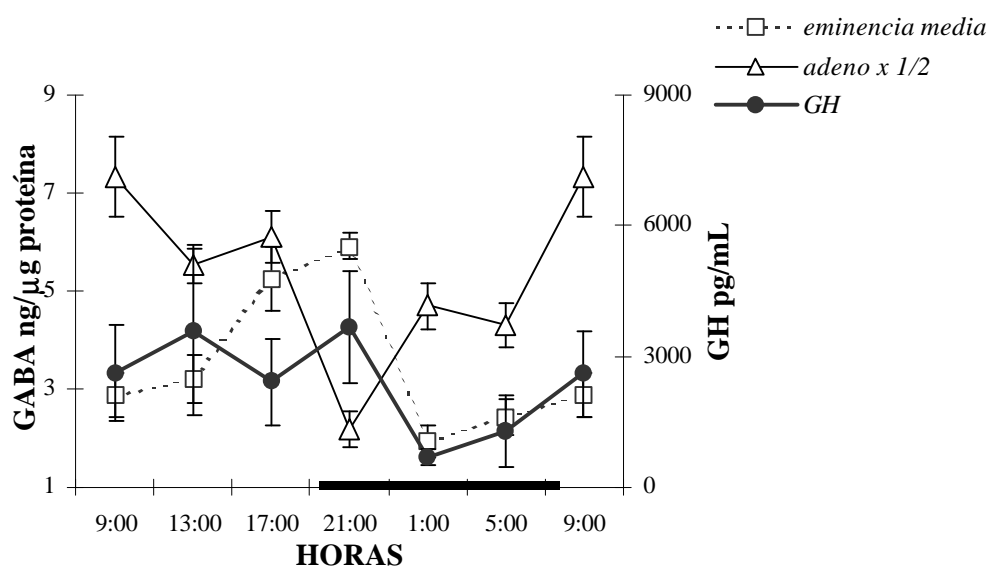
Los niveles circulantes de GH y el patrón diario de concentración de GABA en la eminencia media y en la adenohipófisis en ratas macho adultas jóvenes y envejecidas, se representan en las figuras 85 y 86.

En los animales jóvenes, el contenido de GABA en la eminencia media y en la adenohipófisis varía significativamente a lo largo del día ( $F=11,5$   $p=0,0003$ ;  $F=12,44$   $p=0,0001$ ), como se ha descrito en los apartados a.3.4. y a.4.3., y puede observarse en la figura 85. Ambos patrones correlacionan negativamente ( $F=5,21$   $p=0,0414$ ), como se muestra en la figura 84. Sin embargo, la concentración de GABA tanto en la eminencia media como en la adenohipófisis no correlaciona con el patrón secretor de GH (no se muestran figuras).

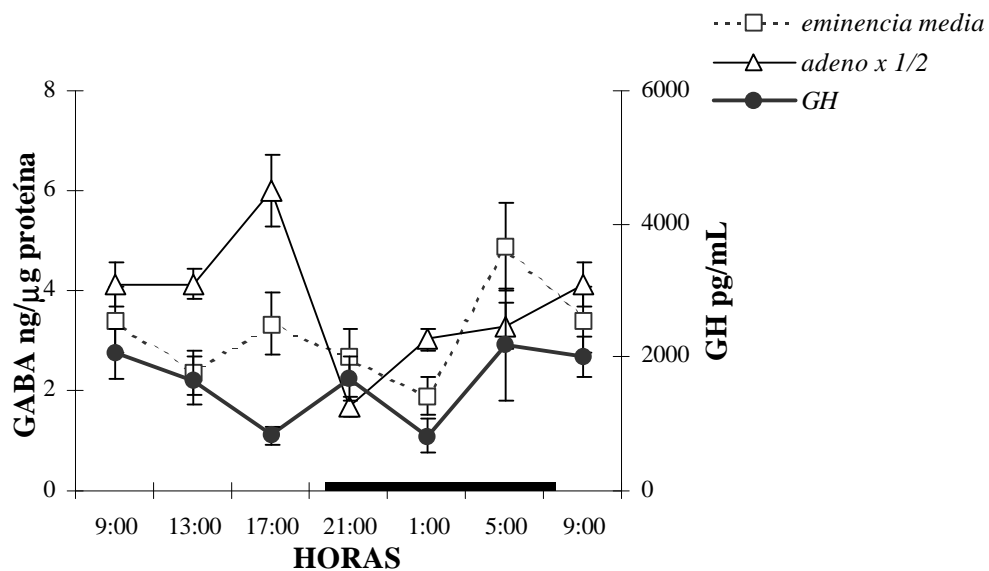
En los animales envejecidos, el contenido diario de GABA mantiene variaciones significativas tanto en la eminencia media ( $F=2,82$   $p=0,0049$ ) como en la adenohipófisis ( $F=9,24$   $p=0,0002$ ), como se ha descrito en los apartados a.3.4. y a.4.3., y se muestra en la figura 86. A diferencia de lo que se observaba en animales jóvenes, la correlación entre ambos patrones, se pierde (no se muestra figura). Además, la concentración de GABA en la eminencia media no correlaciona con el patrón secretor de GH (no se muestra figura).



**Figura 84.-** Correlación entre la concentración de GABA en la eminencia media y en la adenohipófisis en ratas macho adultas jóvenes. Se expresa el factor de correlación y su significado estadístico.



**Figura 85.-** Patrón diario de secreción de GH y de la concentración de GABA en la eminencia media y en la adenohipófisis en ratas macho adultas jóvenes. Los datos se expresan como media ± eem.



**Figura 86.-** Patrón diario de secreción de GH y de la concentración de GABA en la eminencia media y en la adenohipófisis en ratas macho envejecidas. Los datos se expresan como media  $\pm$  eem.

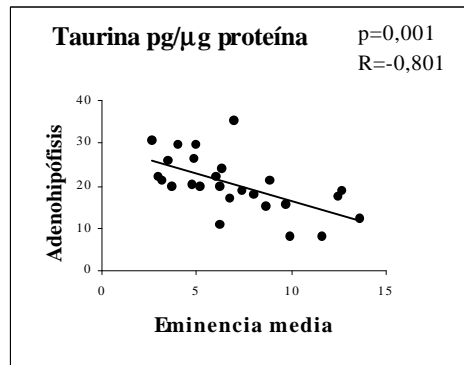


#### ***c.4.4.- Correlación entre los patrones de concentración de taurina en la eminencia media y en la adenohipófisis. Efecto sobre el ritmo secretor de GH***

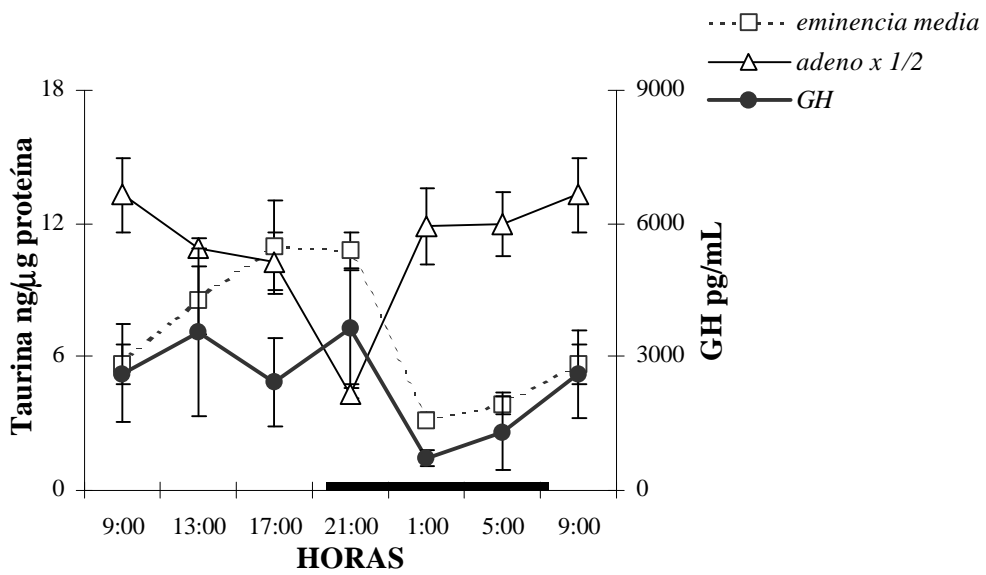
Los patrones de concentración de taurina en la eminencia media y en la adenohipófisis de animales jóvenes y envejecidos se observan en las figuras 88 y 89.

En los animales jóvenes el contenido de taurina en la eminencia media y en la adenohipófisis muestra variaciones significativas a lo largo del día ( $F=6,23$   $p=0,0037$ ;  $F=7,22$   $p=0,001$ , respectivamente), como se ha descrito en los apartados a.3.5. y a.4.4., y se observa en la figura 88. Asimismo, ambos patrones correlacionan negativamente ( $F=19,57$   $p=0,001$ ), como se muestra en la figura 87. Sin embargo, el contenido de taurina tanto en la eminencia media como en la adenohipófisis no correlacionan con los niveles circulantes de GH en ratas jóvenes (no se muestran figuras).

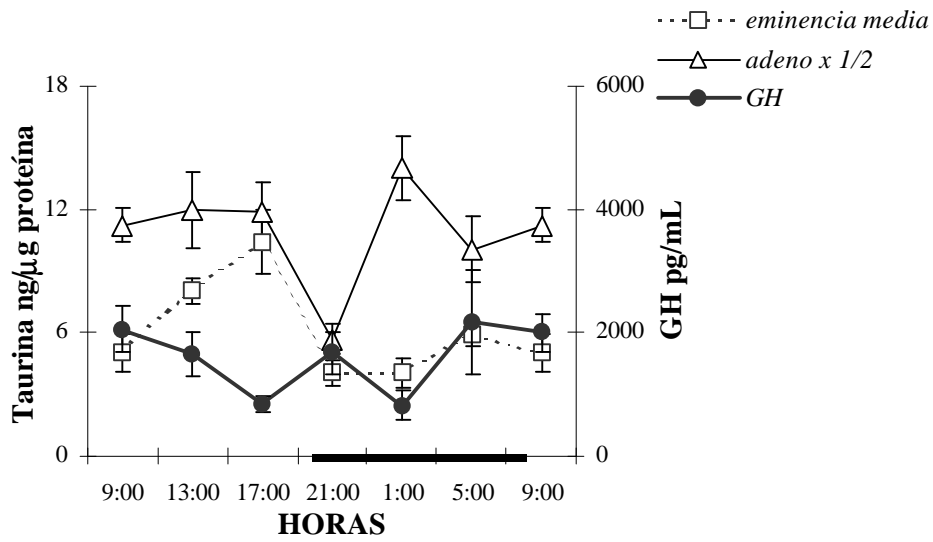
En los animales envejecidos, la concentración de taurina mantiene las variaciones diarias significativas tanto en la eminencia media ( $F=7,36$   $p=0,023$ ) como en la adenohipófisis ( $F=3,36$   $p=0,0271$ ), como se ha descrito en los apartados a.3.5. y a.4.4., y puede observarse en la figura 89. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurría en animales jóvenes, ambos patrones no correlacionan significativamente (no se muestra figura). Asimismo, la concentración diaria de taurina tanto en la eminencia media como en la adenohipófisis no correlacionan con los niveles circulantes de GH (no se muestran figuras).



**Figura 87.-** Interacción entre la concentración de taurina en la eminencia media y en la adenohipófisis en ratas macho adultas jóvenes. Se expresa el factor de correlación y su significado estadístico.



**Figura 88.-** Patrón diario de secreción de GH y de la concentración de taurina en la eminencia media y en la adenohipófisis en ratas macho jóvenes. Los datos se expresan como media  $\pm$  eem.



**Figura 89.-** Patrón diario de concentración de GH y de la concentración de taurina en la eminencia media y en la adenohipófisis en ratas macho envejecidas. Los datos se expresan como media  $\pm$  eem.

## **DISCUSIÓN**

---

## **A) EFECTOS DEL ENVEJECIMIENTO EN EL CONTENIDO EN AMINAS BIÓGENAS, GABA, TAURINA Y SOMATOSTATINA EN HIPOTÁLAMO, EMINENCIA MEDIA Y ADENOHIPÓFISIS**

### **a.1.- Hipotálamo anterior**

Los resultados obtenidos en hipotálamo anterior indican la existencia de un patrón diario de concentración específico para cada uno de los neuromoduladores estudiados en ratas macho jóvenes. Dichos patrones se modifican diferencialmente durante el proceso de envejecimiento.

Se observa un patrón diario en la concentración de NA en el hipotálamo anterior, (*Cano y cols, 2001*), que viene a reafirmar la hipótesis de que el hipotálamo funciona rítmicamente (*Cagampang y cols, 1994; Selgas y cols, 1998; Smriga y cols, 2000; Lafuente y cols, 2002*). Es importante destacar que los datos obtenidos en este trabajo, conjuntamente con los obtenidos previamente por el grupo en otras estaciones del año (invierno y otoño), sugieren que el número de máximos de concentración de este neurotransmisor varía según la estación del año considerada. Además, hemos encontrado que en primavera estos máximos se producen en horarios distintos a los previamente publicados por nuestro grupo en invierno (*Selgas y cols, 1998*). Igualmente, nuestros resultados muestran cambios en su amplitud (*Selgas y cols, 1998; Lafuente y cols, 2002*). En animales envejecidos el contenido medio diario en NA disminuye en esta área hipotalámica (*Cano y cols, 2001*). Ello se explica por la disminución en la amplitud del ritmo al compararlo con el descrito en animales jóvenes. Es importante destacar que el ritmo encontrado en animales envejecidos es idéntico al observado en los animales jóvenes, por lo que no se produciría un efecto desincronizador en la NA durante el envejecimiento, como se ha encontrado para otras variables analizadas en este trabajo. Esta disminución podría deberse a una menor producción de este neurotransmisor en esta área hipotalámica, ya que la actividad de la enzima clave en la ruta biosintética de NA, la tirosina hidroxilasa, disminuye con la edad, según se ha descrito en estudios realizados en hipotálamos completos en el horario basal (*Meites, 1982; Meites, 1991; Rodríguez-Gómez y cols, 1995*). Este efecto indicaría que la DA también se reduciría con la edad (*Simpkins y cols, 1977; Demarest y cols, 1980; Simpkins, 1984*).

Como ocurría para la NA en el hipotálamo anterior, la concentración de DA en los animales jóvenes varía significativamente a lo largo del día, y está de acuerdo con las variaciones diarias descritas en el contenido de este mismo neurotransmisor en el área pre-óptica y en los núcleos supraquiasmáticos hipotalámicos, incluidos en el hipotálamo anterior (*Arutjunyan y cols, 2001*), así como con los cambios día-noche mostrados por estos mismos núcleos (*Reuss y cols, 1999*). Sin embargo, este patrón diario de contenido en DA en el hipotálamo anterior no se encontró en trabajos previos del grupo, realizados en ratas de la cepa Sprage Dawley, sometidas a un régimen de luz-oscuridad de 14:10 h en la estación de primavera (en nuestro trabajo se utiliza 12:12 h.) (*Lafuente y cols, 2002*). Estas diferencias se podrían deber a la distinta duración de la fase luminosa, que manda una información diferencial al hipotálamo a través del haz retino-hipotalámico, o a diferencias en la cepa de rata utilizada (Wistar en este trabajo vs. Sprage Dawley en el trabajo previo). A diferencia de lo que se mostraba para NA, la concentración diaria de DA además de disminuir con la edad, se desincroniza, mostrando un adelanto de fase del pico máximo desde las 05:00 hasta las 17:00 horas. La reducción en el contenido de DA, en esta área hipotalámica, se podría explicar por una disminución dependiente de la edad en la actividad de la enzima, tirosina hidroxilasa, hecho ya mencionado. Ello confirmaría trabajos puntuales de la literatura (*Simpkins y cols, 1977; Demarest y cols, 1980; Simpkins, 1984*) que describen este efecto en el hipotálamo completo.

Asimismo, la tasa de recambio de DA en este tejido varía a lo largo del día, aumentando significativamente al final de la fase oscura del fotoperiodo (*Cano y cols, 2001*), lo cual había sido descrito en trabajos previos del grupo realizado en otras estaciones (*Selgas y cols, 1998; Pazo y cols, 2000*). Durante el envejecimiento el patrón diario del metabolismo de esta catecolamina en el hipotálamo anterior no se modifica. Este hecho ha sido mostrado por nosotros por primera vez (*Cano y cols, 2001*). Sin embargo, datos obtenidos por el grupo muestran que el contenido diario en DA y en DOPAC en el hipotálamo anterior (datos no presentados en este trabajo) disminuye con la edad. Esta disminución en el contenido en DA y DOPAC ha sido descrita en trabajos puntuales de la literatura (*Simpkins y cols, 1977; Demarest y cols, 1980; Simpkins, 1984; Raymond y cols, 1984; Miguez, 1999*). Ello indicaría que la utilización de este neurotransmisor disminuye con la edad.

Nuestros datos muestran que el contenido en 5-HT en el hipotálamo anterior de ratas macho jóvenes muestra variaciones circadianas, lo que confirma datos previos del grupo, si bien, los ritmos encontrados difieren en ambos trabajos (*Lafuente y cols, 2002*). Estas diferencias se explicarían por los fotoperiodos distintos empleados así como por el uso de cepas de rata diferentes. Asimismo, se han descrito ritmos en la concentración de este neurotransmisor en núcleos de esta área hipotálámica (*Hery y cols, 1982; Shioiri y cols, 1991; Poncet y cols, 1999; Barassin y cols, 2002*). En este trabajo describimos por vez primera, el efecto de la edad sobre el patrón diario de concentración de 5-HT. A diferencia de lo que se observaba para NA y DA, este neurotransmisor no modifica su concentración media diaria con la edad, pero se produce un efecto desincronizador, que se caracteriza por un retraso de fase en el pico de concentración máxima desde las 17:00 hasta las 05:00 horas. Este cambio de patrón podría explicar discrepancias entre trabajos puntuales de la literatura donde se observan disminuciones o no de la concentración de 5-HT en el horario basal con la edad en hipotálamos completos (*Gozlan y cols, 1990; Simpkins y cols, 1977; Simpkins, 1984*).

Por otro lado, el metabolismo de 5-HT tiende a aumentar al final de la fase oscura del fotoperiodo en el hipotálamo anterior de animales jóvenes, pero no es estadísticamente significativo. Estos datos difieren de los observados en trabajos previos del grupo (*Selgas y cols, 1998*), donde se ha descrito un patrón circadiano para el metabolismo de 5-HT con un máximo al final del periodo oscuro. Estas discrepancias podrían explicarse por criterios de estacionalidad ya que el trabajo de Selgas y cols (1998) se ha realizado en invierno y el nuestro en primavera. Un efecto similar se ha descrito para la GH donde se encuentra un patrón rítmico en otoño (*Pazo 2002*) pero no en primavera (*García-Bonacho y cols, 2000; Castrillón y cols, 2001*) ni en invierno (*Selgas y cols, 1997*). Durante el envejecimiento, el metabolismo de 5-HT aumenta con respecto a los valores observados en los animales jóvenes, como previamente se ha descrito en trabajos puntuales de la literatura (*Gozlan y cols, 1990; Rodríguez-Gómez, 1995*). Este aumento de 5-HT podría estar relacionado con el incremento de los niveles de prolactina circulante que describimos en animales envejecidos, y de acuerdo con su papel estimulador sobre la secreción de prolactina (*Lu y Meites, 1973; Lamberts y MacLeod, 1978*).

El patrón diario de concentración de GABA en el hipotálamo anterior observado en ratas macho jóvenes muestra variaciones circadianas semejantes a las observadas

previamente por nuestro grupo en animales de la misma edad y sexo, en la estación de invierno (*Duvilanski y cols, 2002*). La actividad rítmica del GABA en hipotálamo anterior parece estar bien establecida, siendo varios los trabajos que así lo apuntan tanto en el hipotálamo (*Cattaberi y cols, 1978; Cardinali y Golombek, 1998*) como en áreas hipotalámicas específicas (*Duvilanski y cols, 1998*) o en núcleos hipotalámicos (*Aguilar-Robledo y cols, 1993*). Es importante destacar que el contenido medio diario en este aminoácido es máximo en otoño, precisamente cuando los niveles circulantes de prolactina son menores (*Pazo, 2002; Cano y cols, datos no publicados*). En este trabajo describimos por primera vez el efecto del envejecimiento sobre el patrón diario de concentración de GABA en esta área hipotalámica. En concreto se observa un efecto desincronizador que conduce a la aparición de dos mínimos de concentración, en vez de dos máximos que aparecían en los animales jóvenes. Al igual que ocurría para DA y para 5-HT, se observa una disminución significativa de los niveles medios de GABA con la edad, lo que parece confirmar el efecto inhibitor del envejecimiento sobre este neurotransmisor. Lo que ha sido descrito en otras áreas cerebrales, como el núcleo accumbens (*Segovia y cols, 2001*) y el área estriatal (*Esquifino y cols, 2002*). Este efecto explicaría el aumento en los niveles circulantes de prolactina que encontramos en este trabajo y en trabajos previos del grupo (*García-Bonacho y cols, 2000*). Sin embargo, trabajos en núcleos específicos de esta área hipotalámica muestran que el contenido basal de GABA disminuye, aumenta o no se modifica durante el envejecimiento (*Banay-Schwartz y cols, 1989a*). Lo que observamos en este trabajo resultaría una sumatoria de lo que ocurre en todos los núcleos e indicaría que predominan los efectos inhibidores, los cuales podrían deberse a la existencia de una función circadiana sincrónica y regionalizada, que se modificaría con la edad. Por ello, los estudios puntuales no se pueden diferenciar los cambios que si aparecen en los estudios cronobiológicos.

El patrón diario de concentración de taurina en el hipotálamo anterior de ratas jóvenes muestra variaciones diarias, como en el resto de los neuromoduladores estudiados. Este resultado se correlaciona con trabajos de la literatura en los que se describen variaciones circadianas de este neurotransmisor tanto en glándula pineal (*Grosso y cols, 1978*) como en hipotálamo mediobasal en la estación de invierno (*Duvilanski y cols, 1998; Duvilanski y cols, 2002*). Sorprendentemente, y a diferencia de lo descrito para los parámetros anteriormente discutidos, no hemos encontrado diferencias en amplitud ni tampoco en el horario del máximo de concentración de este neurotransmisor, al compararlo con datos del



grupo obtenidos en invierno (*Duvilanski y cols, 2002*). Sí se encuentran variaciones con respecto al ritmo observado en otoño (*Esquifino y cols, datos no publicados*), lo que apuntaría la existencia de variaciones circaestacionales menos marcadas para la taurina que para el resto de los neuromoduladores anteriormente mencionados. Asimismo, describimos por vez primera el efecto del envejecimiento sobre el patrón diario de concentración de taurina en esta área hipotalámica. Se detecta un efecto desincronizador, que conduce a la aparición de dos mínimos de concentración en vez de un único máximo. Todo ello se acompaña de una disminución de la concentración media diaria de este neurotransmisor en animales envejecidos lo que se correlaciona con datos obtenidos en otras áreas cerebrales, como el estriado o el córtex cerebral (*Wallace y Dawson, 1990; Benedetti y cols, 1991; Dawson y cols, 1999; Eppler y Dawson, 2001*).

La concentración de somatostatina varía a lo largo del día en el hipotálamo anterior, lo cual confirma trabajos previos del grupo realizados en esta misma área hipotalámica (*Esquifino y cols, 1999a*), o de la literatura en el hipotálamo completo (*Berelowitz y cols, 1982a; Nicholson y cols, 1983; Gardi y cols, 1999*). Sin embargo, el contenido en somatostatina en el hipotálamo anterior presenta un patrón distinto según la estación del año en la cual se realice la experimentación (*Esquifino y cols, 1999a*). Por otro lado, los resultados de este trabajo muestran por vez primera el efecto del envejecimiento sobre el patrón diario de concentración de somatostatina. Nuestros datos indican una disminución de este neuropéptido con la edad al igual que otros trabajos puntuales de la literatura (*Sonntag y cols, 1980; Wang y cols, 1993*). Asimismo, se ha demostrado un efecto similar en el área estriatal (*Esquifino y cols, 2002*). A diferencia de los efectos desincronizadores descritos para otros neurotransmisores, el patrón de concentración de somatostatina se mantiene sin cambios en las edades estudiadas.

### **a.2.- Hipotálamo mediobasal**

Los resultados obtenidos muestran un patrón diario de concentración característico para cada uno de los neuromoduladores estudiados en ratas macho adultas jóvenes en el hipotálamo mediobasal. Estos patrones difieren de los encontrados en el hipotálamo anterior. Además se producen modificaciones diferentes, a las observadas en el hipotálamo anterior, durante el envejecimiento.

El contenido diario en NA en el hipotálamo mediobasal en animales jóvenes muestra variaciones circadianas (*Cano y cols, 2001*), que confirman los resultados anteriores del grupo realizados en la misma estación del año (*Lafuente y cols, 2002*). El patrón obtenido en este trabajo es igualmente similar al descrito en invierno (*Selgas y cols, 1998*), aunque los niveles medios de contenido en NA son mayores durante la primavera (*este estudio y Lafuente y cols, 2002*) que en el invierno. Estos datos junto con las variaciones descritas en el hipotálamo anterior (*Selgas y cols, 1998; Cano y cols, 2001*), y los resultados publicados en núcleos hipotalámicos específicos contenidos en esta área hipotalámica (*Cagampang y cols, 1994; Smriga y cols, 2000*) refuerzan la idea de que el contenido en NA varía rítmicamente en el hipotálamo. Durante el envejecimiento la concentración diaria de NA en el hipotálamo mediobasal disminuye significativamente, al igual que ocurría en el hipotálamo anterior. Esta disminución de la concentración de NA en esta área hipotalámica, se podría explicar por una disminución en la actividad de la enzima tirosina hidroxilasa con la edad, que se ha mencionado con anterioridad (*Reymond y cols, 1984; ThyagaRajan y cols, 1995*). Además, como ocurría para el hipotálamo anterior, no se observan efectos desincronizadores para este neurotransmisor en esta área hipotalámica durante el envejecimiento.

Nuestros resultados indican que la concentración diaria de DA en el hipotálamo mediobasal presenta variaciones circadianas, con una concentración máxima a las 01:00 horas. Este patrón diario de contenido difiere del descrito en el hipotálamo anterior, donde el máximo se ha observado a las 05:00 horas. Asimismo, se han descrito variaciones circadianas diferenciales de este neurotransmisor en esta área hipotalámica en trabajos previos del grupo en animales de la misma edad (*Esquifino y cols, 1997*) o de 4 meses de edad (*Lafuente y cols, 2002*). Todo ello refuerza la hipótesis de que el contenido de DA presenta variaciones circadianas tanto si se considera el hipotálamo completo (*Shioiri y cols, 1991*), como si se estudian áreas hipotalámicas determinadas (*Lafuente y cols, 2002; resultados presentados en este trabajo*) o núcleos hipotalámicos específicos (*Shioiri y cols, 1991; Arutjunyan y cols, 2001*). Por otro lado, es la vez primera que se describe el efecto del envejecimiento sobre el patrón diario de concentración de DA en el hipotálamo mediobasal. Se produce un efecto desincronizador, por el cual el ritmo se desaparece. Por el contrario el envejecimiento producía, en el hipotálamo anterior, cambios de fase. Además en el hipotálamo mediobasal el efecto desincronizador se acompaña de una disminución en el contenido de este neurotransmisor durante la fase luminosa, lo que fue apuntado en

trabajos puntuales realizados también en hipotálamo mediobasal (*Simpkins y cols, 1977; Simpkins, 1984*). Este efecto sobre el contenido en DA se podría explicar por una disminución de la actividad de la enzima tirosina hidroxilasa (*Reymond y cols, 1984; ThyagaRajan y cols, 1995*). Los datos anteriormente mencionados estarían de acuerdo con el papel inhibitor de este neurotransmisor sobre el mecanismo secretor de prolactina, y por tanto con el incremento en los valores medios diarios de la hormona con la edad (*García-Bonacho y cols, 2000*). Además, se describe un efecto diferencial del envejecimiento sobre este neurotransmisor en otras áreas del cerebro como en el núcleo accumbens (*Segovia y cols, 1999; Segovia y cols, 2001; Yoshimoto y cols, 2001*) y/o el estriado (*Esquifino y cols, 2002*).

El metabolismo de DA en el hipotálamo mediobasal no varía a lo largo del día (*Cano y cols, 2001*), a diferencia de lo que se había observado en el hipotálamo anterior donde mostraba un máximo a las 05:00 horas. Además, nuestros resultados difieren de los descritos por el grupo, en trabajos realizados en invierno (*Selgas y cols, 1998*). Estas variaciones se asocian con cambios estacionales en el ritmo secretor de prolactina, como se ha sugerido en trabajos previos del grupo realizados en invierno, en primavera o en otoño (*Selgas y cols, 1997; Esquifino y cols, 1999c; García-Bonacho y cols, 2000; Castrillón y cols, 2001*). Durante el envejecimiento, el metabolismo de DA disminuye en esta área hipotalámica, lo que se ha observado también en trabajos puntuales realizados en hipotálamo completo (*Simpkins y cols, 1977; Algeri y cols, 1983; Venero y cols, 1993; Miguez y cols, 1999*). Ello estaría de acuerdo con el incremento en los niveles circulantes medios de prolactina que describimos en este trabajo y en trabajos anteriores (*García-Bonacho y cols, 2000*).

La concentración de 5-HT en el hipotálamo mediobasal en ratas macho adultas jóvenes muestra variaciones circadianas, con una concentración máxima a las 21:00 horas. Estos resultados difieren de los encontrados en hipotálamo anterior, donde se ha observado el máximo a las 17:00 horas. Estos cambios diarios en el contenido son similares a los descritos por el grupo, en trabajos en la misma estación del año (*Esquifino y cols, 1997*), y confirmaría que el hipotálamo mediobasal funciona rítmicamente, como ocurre en otras áreas hipotalámicas (*Esquifino y cols, 1997; Lafuente y cols, 2002; datos presentados en este trabajo*) o en otros núcleos hipotalámicos (*Rozsahegyi y cols, 1973; Hery y cols, 1982; Shioiri y cols, 1991*). Durante el envejecimiento la concentración media diaria de 5-HT

disminuye significativamente, al igual que ocurría con la NA y la DA en este tejido, confirmando datos puntuales de la literatura (*Gozlan y cols, 1990*). Además, su patrón diario de concentración se desincroniza, con la desaparición de las variaciones rítmicas. Las neuronas hipotalámicas productoras de 5-HT disminuyen durante el envejecimiento (*Rodríguez-Gómez, 1995*) lo que podrían explicar estas variaciones en la concentración del neurotransmisor. Los cambios observados en el patrón diario de contenido de 5-HT en el hipotálamo mediobasal, conjuntamente con los anteriormente mencionados en el hipotálamo anterior, sugieren que el envejecimiento ejerce en el hipotálamo efectos regionales diferenciales.

Como ocurría en el hipotálamo anterior, el metabolismo de 5-HT en el hipotálamo mediobasal tiende a aumentar al final de la fase oscura del fotoperiodo, pero no es estadísticamente significativo. Sin embargo, trabajos previos del grupo realizados en invierno, han descrito que el metabolismo diario de 5-HT en el hipotálamo mediobasal varía a lo largo del día, aumentando significativamente al final de la fase oscura (*Selgas y cols, 1998; Pazo y cols, 2000*). Durante el envejecimiento, el metabolismo basal de 5-HT en hipotálamo mediobasal aumenta sólo en uno de los horarios estudiados, a las 21:00 horas, al igual que ocurre en el hipotálamo anterior, lo que confirma y amplía estudios puntuales realizados en el hipotálamo completo (*Gozlan y cols, 1990; Rodríguez-Gómez, 1995*). Este efecto, podría indicar un mecanismo para compensar funcionalmente la pérdida de neuronas serotoninérgicas en el hipotálamo durante el envejecimiento (*Rodríguez-Gómez, 1995*).

La concentración de GABA en el hipotálamo mediobasal muestra variaciones circadianas diferentes a las encontradas en el hipotálamo anterior, con un único máximo a las 01:00 horas. Sin embargo, en la estación de invierno el contenido de GABA presenta dos máximos, uno durante la fase luminosa y otro durante la fase oscura del fotoperiodo (*Duvilanski y cols, 1998; Duvilanski y cols, 2002*) mientras que en otoño solo aparece un máximo durante la fase luminosa (*Esquifino y cols, datos no publicados*). Además de los resultados presentados en este trabajo, se han descrito cambios diarios en el contenido de GABA en el hipotálamo completo (*Cattaberi y cols, 1978*), en áreas hipotalámicas específicas (*Duvilanski y cols, 1998; Duvilanski y cols, 2002*) o en núcleos hipotalámicos determinados (*Aguilar-Robledo y cols, 1993*), lo que apunta una actividad GABAérgica rítmica en el hipotálamo. Describimos por vez primera el efecto de la edad sobre la

concentración diaria de este aminoácido en el hipotálamo mediobasal. Durante el envejecimiento, el contenido en GABA disminuye, como describimos en el hipotálamo anterior. Sin embargo, resultados puntuales en núcleos hipotalámicos pertenecientes a esta área, muestran que el contenido en GABA no se modifica con la edad (*Banay-Schwartz y cols, 1989a*). Esta discrepancia se puede explicar porque en estudios puntuales no se ponen de manifiesto diferencias que pueden ocurrir a lo largo del día. Además, con la edad se desincroniza el patrón diario de concentración de GABA, lo que aumentaría la aparición de datos discordantes, al igual que ocurre en el hipotálamo anterior.

El contenido en taurina del hipotálamo mediobasal muestra variaciones circadianas similares a las obtenidas en el hipotálamo anterior, con un máximo a las 01:00 horas. Estos resultados difieren de los obtenidos por el grupo en trabajos realizados en invierno (*Duvilanski y cols, 1998; Duvilanski y cols, 2002*). Durante la estación de primavera, la concentración de taurina presenta un máximo a las 01:00 horas, mientras que durante la estación de invierno se detectan dos máximos, uno durante la fase luminosa y otro durante la fase oscura, y en la estación de otoño se encuentra un solo máximo durante el periodo luminoso en otoño (*Esquifino y cols, datos no publicados*). Estas diferencias estacionales son similares a las descritas previamente en el GABA. Describimos por vez primera el efecto del envejecimiento en el patrón diario de concentración de taurina en esta área hipotalámica, que se caracteriza por un efecto desincronizador, y por la aparición de un mínimo de concentración en vez de un único máximo. Este efecto se acompaña de una disminución en el contenido medio diario de taurina, como se ha descrito anteriormente en el hipotálamo anterior y en datos puntuales en otras regiones cerebrales (*Wallace y Dawson, 1990; Benedetti y cols, 1991; Dawson y cols, 1999; Eppler y Dawson, 2001; Duvilanski y cols, 2002*).

El contenido en somatostatina varía a lo largo del día en el hipotálamo mediobasal, lo que concuerda con trabajos previos del grupo en esta área hipotalámica (*Esquifino y cols, 1999a*) y de la literatura en hipotálamo completo (*Berelowitz y cols, 1982a; Nicholson y cols, 1983; Gardi y cols, 1999*). El patrón de somatostatina presenta un contenido máximo entre las 24:00 horas y las 01:00 horas durante la fase oscura del fotoperiodo (*Esquifino y cols, 1999a*), y difiere de los resultados obtenidos en el hipotálamo anterior, donde se ha descrito un máximo a las 17:00 horas. El envejecimiento disminuye el contenido diario de este neuropéptido, como en el hipotálamo anterior, lo que corrobora los resultados

obtenidos en trabajos puntuales de la literatura (*Sonntag y cols, 1980; Wang y cols, 1993*). Además, las variaciones diarias de concentración de somatostatina desaparecen, en el envejecimiento, lo que indica un efecto desincronizador del envejecimiento similar al descrito para 5-HT, y que no se produce en hipotálamo anterior.

### **a.3.- Eminencia media**

El patrón diario que se observa en la concentración de NA en la eminencia media, al igual que en el hipotálamo mediobasal y anterior, viene a confirmar datos previos de la literatura (*Koulu y cols, 1989; Selgas y cols, 1997; Selgas y cols, 1998; Arutjunyan y cols, 2001; Pazo, 2002*). Nuestros resultados, obtenidos en primavera, muestran una concentración máxima a las 17:00 horas, mientras que en invierno el máximo se encuentra entre las 16:00 y las 20:00 horas (*Selgas y cols, 1997; Selgas y cols, 1998*), y en el otoño se retrasa a las 21:00 horas (*Pazo, 2002*). Por otro lado, el envejecimiento induce una disminución del contenido medio diario en NA en la eminencia media, como también se ha descrito en hipotálamo anterior y mediobasal. Esta disminución se explicaría, al igual que en las áreas hipotalámicas anteriormente mencionadas, por un descenso en la actividad de la tirosina hidroxilasa (*Reymond y cols, 1984; Horniekiewicz, 1987; Meites, 1991*) y por un incremento en la actividad de la MAO, enzima responsable del catabolismo de este neurotransmisor (*Meites, 1991*). Sin embargo, datos puntuales de la literatura muestran resultados variables, con una disminución (*Demarest y cols, 1980*) o no (*Rodríguez-Gómez y cols, 1995*) del contenido en este neurotransmisor. Además, el patrón diario de concentración de NA se desincroniza, observándose un desdoblamiento del pico máximo encontrado en animales jóvenes, a diferencia de lo que ocurría en el hipotálamo mediobasal o en el hipotálamo anterior, donde el ritmo no variaba con la edad.

La concentración de DA en la eminencia media varía significativamente a lo largo del día, lo que confirma trabajos previos de la literatura y del grupo (*Koulu y cols, 1989; Arutjunyan y cols, 2001; Pazo, 2002*). Ello junto con datos encontrados en hipotálamo anterior y mediobasal indica que la actividad del eje hipotálamo-hipofisario funciona rítmicamente. Nuestros resultados y los datos previos de la literatura muestran que la concentración de este neurotransmisor se encuentra elevada durante la fase luminosa del fotoperiodo (*Koulu y cols, 1989; Arutjunyan y cols, 2001; Pazo, 2002*). Sin embargo, el patrón de concentración es específico de la estación del año en la que se estudia este

neurotransmisor (*Pazo, 2002*). Las variaciones estacionales de DA explicarían el patrón secretor estacional de prolactina, al menos en parte, teniendo en cuenta que este neurotransmisor es el neuromodulador inhibitor principal del mecanismo secretor de esta hormona (*MacLeod, 1969; MacLeod y cols, 1970; Freeman y cols, 2000*). El envejecimiento disminuye la concentración media diaria de DA en la eminencia media, al igual que ocurre en hipotálamo anterior y mediobasal. Nuestros resultados confirman datos previos de la literatura sobre la disminución de DA y de DOPAC (su principal metabolito) con la edad (*Simpkins, 1984; Demarest y cols, 1980*), lo que explicaría la disminución de la secreción basal de DA a los vasos porta-hipofisarios previamente descrita (*Gudelsky y cols, 1980*). Además, las variaciones diarias de este neurotransmisor, descritas en animales jóvenes, desaparecen, de forma similar a lo que ocurría en hipotálamo mediobasal, donde precisamente se encuentran los núcleos específicos encargados de la regulación de prolactina (*Leong y cols, 1983; Mai y cols, 1994*).

La concentración de 5-HT en la eminencia media varía significativamente a lo largo del día, confirmando datos previos de la literatura y del grupo (*Koulu y cols, 1989; Pazo, 2002*). Las variaciones circadianas de 5-HT muestran una concentración mínima a las 01:00 horas, con datos similares a los datos descritos por *Koulu y cols, (1989)*, que observan también un mínimo de concentración a la misma hora. Sin embargo, los valores obtenidos en otoño describen un contenido máximo a las 17:00 horas (*Pazo, 2002*), lo que indicaría variaciones estacionales de este neurotransmisor en este tejido. Por otro lado, la concentración diaria media de 5-HT en la eminencia media no se altera durante el envejecimiento. Estos datos confirman resultados puntuales de la literatura (*Simpkins, 1984*). Sin embargo, el envejecimiento desincroniza el patrón de contenido de 5-HT en este tejido. Por lo tanto, nuestros resultados muestran efectos similares en la eminencia media y en el hipotálamo anterior y distintos a los que ocurren en hipotálamo mediobasal. Ello sugiere un efecto regional diferencial del envejecimiento sobre el eje hipotálamo-hipofisario.

El contenido en GABA varía a lo largo día en la eminencia media, lo que confirmaría datos previos del grupo y de la literatura en ésta y en otras áreas cerebrales (*Casanueva y cols, 1984; Duvilanski y cols, 2002; Pazo, 2002*). Este patrón diario de concentración es semejante a los resultados obtenidos por nuestro grupo durante la estación de otoño (*Pazo, 2002*), aunque difiere de los datos encontrados durante la estación de invierno (*Duvilanski y*

*cols, 2002*). Por otro lado, las variaciones circadianas de GABA descritas por Casanueva y cols (1984) son distintas a los resultados presentados en este trabajo, lo que podría deberse a diferencias en el fotoperiodo utilizado (12:12 en nuestro estudio frente a 14:10 en el trabajo de Casanueva y cols) y a los horarios estudiados a lo largo del día. Durante el envejecimiento, el contenido diario en GABA no disminuye en eminencia media de acuerdo con trabajos puntuales (*Banay-Schwartz y cols, 1989a*), y a diferencia de lo que se ha descrito en el hipotálamo anterior y mediobasal en este trabajo. Además, se produce un retraso de fase en el valor de concentración máxima durante la fase oscura, desde las 21:00 horas hasta las 05:00 horas, a diferencia de lo anteriormente mencionado para hipotálamo anterior y mediobasal. Todo ello sugiere la existencia de diferencias específicas, inducidas por el envejecimiento, según el área cerebral considerada. Sin embargo, las implicaciones fisiológicas de estos efectos diferenciales en individuos envejecidos están por establecerse. Estos cambios podrían explicar, al menos en parte, las modificaciones en el patrón diario de prolactina teniendo en cuenta el papel que ejerce el GABA en este mecanismo secretor hipofisario.

El patrón diario de concentración de taurina en la eminencia media varía a lo largo del día, lo que confirmaría datos previos del grupo en ésta y en otras áreas cerebrales (*Duvilanski y cols, 2002*). Sin embargo, los datos muestran patrones diferentes. Esto se explicaría si tenemos en cuenta que el trabajo referido (*Duvilanski y cols, 2002*) se realizó en la estación de invierno. Ello sugiere la existencia de variaciones estacionales para este neurotransmisor en esta área cerebral. Por otro lado, durante el envejecimiento la concentración de taurina disminuye puntualmente, a las 21:00 horas, en la eminencia media (*Banay-Schwartz y cols, 1989b*), a diferencia de lo observado en hipotálamo anterior y mediobasal, donde se ha descrito un descenso de los niveles medios de contenido, indicando, de nuevo, efectos específicos de la edad sobre el funcionamiento cronobiológico de este neurotransmisor en las regiones cerebrales estudiadas.

El patrón de concentración diario de somatostatina varía a lo largo del día en la eminencia media, al igual que hemos descrito para hipotálamo anterior y mediobasal (*Esquifino y cols, 1999a*). El patrón diario de contenido en este neuropéptido que hemos encontrado en primavera, muestra valores máximos durante la fase oscura, mientras que en invierno (*Esquifino y cols, 1999a*) los valores máximos se encuentran durante la fase luminosa del fotoperiodo. El envejecimiento disminuye la concentración media diaria de



somatostatina en la eminencia media, efecto similar al descrito en el hipotálamo anterior o mediobasal. Este efecto confirma resultados de trabajos puntuales de la literatura (*Hoffman y cols, 1980*) y podría deberse a que el número de axones somatostatinérgicos que llegan a la eminencia media desde el núcleo paraventricular disminuye con la edad (*Calza y cols, 1990*). Además, el patrón diario de concentración de este neuropéptido muestra un adelanto de fase del pico máximo desde las 21:00 horas a las 17:00 horas. Los efectos del envejecimiento sobre somatostatina y NA son similares y podrían reflejar los mecanismos de interacción que existen entre ambos neuromoduladores en la regulación de la síntesis y secreción de GH (*Negro-Vilar y cols, 1979; Maeda y Forman, 1980*) más que sobre otras hormonas hipofisarias, sobre las que también actúa (*Freeman y cols, 2000*).

#### **a.4.- Adenohipófisis**

Mientras que no hemos encontrado en este estudio NA en la hipófisis lo que concuerda con datos previos de la literatura (*Fernández-Ruiz y cols, 1987*). La concentración en DA en la adenohipófisis de ratas macho adultas jóvenes presenta variaciones circadianas, similares a las encontradas en la eminencia media, con valores más altos en las primeras horas de la fase luminosa, y a diferencia de los ritmos encontrados en las áreas hipotalámicas estudiadas en las que los máximos aparecen en la fase oscura del fotoperiodo. La similitud en los patrones de concentración en DA en la eminencia media y la adenohipófisis confirma que un porcentaje elevado de la DA procede de la eminencia media a través del sistema porta-hipofisario como ya se había descrito en estudios puntuales (*Cramer y cols, 1979; Freeman y cols, 2000*). Globalmente existe un efecto inhibitorio de la edad sobre la concentración en DA tanto en las áreas hipotalámicas estudiadas como en la eminencia media; sin embargo, la concentración media diaria de este neurotransmisor aumenta en la adenohipófisis. Este hecho se ha reflejado en trabajos puntuales de la literatura y no parece deberse a una disminución del metabolismo de la DA, porque su metabolismo mediado por las enzimas MAO y COMT, aumenta o no se modifica respectivamente (*Demarest y cols, 1985*). Además, la DA presente en la adenohipófisis no forma parte de un pool estático, porque en tanto ratas jóvenes como viejas su concentración disminuye rápidamente por tratamientos farmacológicos, que inhiben la actividad tuberoinfundibular hipotalámica (*Demarest y cols, 1985*). Además, este incremento de la concentración en DA en la hipófisis no explica los niveles elevados de prolactina en sangre periférica que se observan en animales envejecidos (*García-Bonacho y cols, 2000*). Esta

discrepancia podría explicarse teniendo en cuenta que la DA aparece asociada no solo en los gránulos secretores de prolactina sino también a otros orgánulos de las células mamotropas. De hecho, se ha demostrado que en ratas envejecidas el contenido en DA se asocia en un grado menor con los gránulos secretores de prolactina (*Arita y cols, 1984*), lo que induce una secreción mayor de la hormona. Asimismo, el patrón diario de concentración en DA en la adenohipófisis de animales envejecidos se desincroniza, con respecto al descrito en los animales jóvenes de forma similar a lo que ocurría en hipotálamo anterior o mediobasal y en eminencia media, aunque estos efectos son específicos de cada tejido estudiado. Asimismo este hecho podría causar el incremento en los niveles circulantes de prolactina, teniendo en cuenta que las células mamotropas poseen, a diferencia del resto de las células hipofisarias, una pulsátilidad intrínseca (*Lafuente y cols, 1993*) así como un funcionamiento circadiano (*Neill y cols, 1987*).

Describimos por vez primera, el patrón de concentración diaria de 5-HT en la adenohipófisis en ratas macho adultas jóvenes de la cepa Wistar, el cual, muestra variaciones circadianas, al igual que ha sido descrito en otros tejidos como glándula pineal (*Cano y cols, 2002; Sun y cols, 2002*) hipotálamo y eminencia media (*Rozsahegyi y cols, 1973; Koulu y cols, 1989; Shioiri y cols, 1991; Poncet y cols, 1999*). Las variaciones diarias de este neurotransmisor muestran un máximo a las 13:00 horas, al igual que se ha descrito en la eminencia media, y a diferencia de lo observado en hipotálamo anterior y mediobasal (con máximos a las 17:00 y a las 21:00 horas, respectivamente). Durante el envejecimiento, el contenido en 5-HT disminuye en la adenohipófisis, como en otros tejidos (*Meek y cols, 1977; Machado y cols, 1986; Miguez y cols, 1999; Cano y cols, 2002*), a diferencia de lo que ocurría en hipotálamo anterior o la eminencia media donde no se modificaba su concentración. El patrón diario de concentración de 5-HT, en la hipófisis, no varía durante el envejecimiento, a diferencia de lo descrito para este neurotransmisor en hipotálamo anterior, mediobasal y en la eminencia media, donde sin embargo se desincroniza.

El patrón diario de concentración de GABA en la adenohipófisis es diferente al descrito previamente por Casanueva y cols, en 1984, en este mismo tejido. Las diferencias podrían deberse al fotoperiodo (12:12 en nuestro estudio y 14:10 en el trabajo previo), a la cepa de rata utilizada (Wistar en nuestro trabajo vs. Sprague Dawley en el trabajo previo) o bien a la estación del año en la que se realizó la experimentación (primavera en este trabajo

y desconocida en el trabajo previo), ya que trabajos previos del grupo sugieren diferencias estacionales en los patrones de concentración de GABA (*Duvilanski y cols, 1998; Duvilanski y cols, 2002, datos presentados en este trabajo*). A diferencia de lo que ocurría en las áreas hipotalámicas estudiadas y en la eminencia media, el patrón de concentración de GABA en la hipófisis no se desincroniza, aunque el contenido medio diario disminuye, lo que explicaría los cambios en el patrón secretor de prolactina durante el envejecimiento. Los efectos del envejecimiento sobre el GABA son opuestos a los descritos para la DA en este tejido, aunque ambos explican al menos en parte los cambios en el patrón secretor de prolactina que se describe en este estudio y en trabajos previos del grupo (*García-Bonacho y cols, 2000*). El hecho de que el efecto inhibitor sobre el GABA no se describan en trabajos puntuales previos (*Banay-Schwartz y cols, 1989a*), se podría explicar por la existencia de variaciones circadianas del neurotransmisor que se pierden en los estudios puntuales.

Describimos por vez primera, el patrón de concentración de taurina en la adenohipófisis de ratas macho adultas, que muestra variaciones significativas a lo largo del día. Este resultado se suma a datos previos (*Grosso y cols, 1978; Duvilanski y cols, 1998; Esquifino y cols, 2002*) lo que sugiere una ritmicidad circadiana de la taurina en los tejidos estudiados hasta el momento. El patrón diario de concentración de taurina encontrado es específico para este tejido y se mantiene en los animales envejecidos, indicando que probablemente los efectos de taurina en este tejido adquieran relevancia con la edad al igual que se han descrito en otros tejidos (*Benedetti y cols, 1991; Dawson y cols, 1999; Eppler y Dawson, 2001*).

Como ocurría para otros parámetros medidos en este estudio, describimos por vez primera variaciones significativas a lo largo del día en la concentración de somatostatina en la adenohipófisis. El ritmo encontrado confirma la existencia de variaciones circadianas de este neuropéptido descritas en otros tejidos (*Kasting y cols, 1981; Berelowitz y cols, 1982a; Nicholson y cols, 1983; Esquifino y cols, 1999a*). El envejecimiento aumenta el contenido de somatostatina durante las primeras horas de la fase luminosa, lo que concuerda con trabajos puntuales de la literatura (*Deslauriers y cols, 1991*). Asimismo, el envejecimiento desincroniza el patrón de concentración de somatostatina, a diferencia de lo que ocurría para la taurina o el GABA. El aumento de somatostatina explicaría al menos en parte la

disminución de GH que observamos en animales envejecidos (*García-Bonacho y cols, 2000; y este trabajo*).

#### **a.5.- Prolactina, GH y melatonina**

Los resultados obtenidos confirman la existencia de un patrón diario de secreción de prolactina en ratas macho adultas, característico de la estación de primavera, con valores máximos al inicio de la fase oscura del fotoperiodo (*Esquifino 1999b; García-Bonacho, 2000; Castrillón y cols, 2001*). Este patrón difiere del encontrado en otoño (*Esquifino y cols, 1999c; Pazo, 2002*) en el que la secreción de prolactina es máxima durante la fase oscura, o del descritos en invierno (*Villanúa y cols, 1987; Villanúa y cols, 1988*), en el que los valores máximos se detectan al final de la fase luminosa e inicio de la fase oscura del fotoperiodo. Todo ello confirmaría la existencia de variaciones circadianas y circaestacionales en los niveles circulantes de prolactina (*Isakov y cols, 1986; Chang y cols, 1999; Pazo, 2002*), que se explicarían al menos en parte por las variaciones diarias en el contenido en DA y GABA encontradas en el eje hipotálamo-hipofisario. Durante el envejecimiento se observa un aumento en la amplitud del ritmo secretor de prolactina lo que se correlaciona con datos puntuales de la literatura (*Meites y cols, 1978; Demarest y cols, 1985*). Además el patrón secretor de la hormona es similar al descrito en animales jóvenes, lo que confirma resultados previos del grupo (*García-Bonacho y cols, 2000*).

Los niveles circulantes de GH no muestran variaciones diarias, como ya demostraron trabajos anteriores del grupo realizados en la misma estación del año y en invierno (*Esquifino y cols, 1997; Selgas y cols, 1997; Selgas y cols, 1998; Esquifino y cols, 1999b; García-Bonacho y cols, 2000; Castrillón y cols, 2001*). Esto se explicaría por la existencia de variaciones ultradianas de los niveles circulantes de GH que podrían enmascarar el patrón circadiano de la hormona (*Tannenbaum y Martín, 1976; Esquifino y Lafuente, datos no publicados*). Sin embargo, entendemos que es posible que este ritmo exista en primavera, sí se ha encontrado en otoño (*Pazo, 2002*). Asimismo, encontramos diferencias estacionales en los niveles circulantes medios de la hormona, con valores más elevados en primavera (*Castrillón y cols, 2001 y este estudio*) que en otoño (*Pazo, 2002*) o en invierno (*Selgas y cols, 1998*) donde se miden niveles intermedios respecto a los descritos en las otras estaciones. Todo ello sugeriría la existencia de variaciones circaanuales de los niveles circulantes de GH, como ya ha sido descrito en la prolactina. Con el envejecimiento los

niveles plasmáticos de GH disminuyen (*Meites, 1982; García-Bonacho y cols, 2000; Johansson y cols, 2000; Rehman y Masson, 2001*) durante el periodo luminoso, fase de descanso en la rata Wistar, lo que sugiere que el pico nocturno de GH asociado al sueño debería disminuir o desaparecer, confirmando resultados previos realizados en el hombre (*Guldner y cols, 1997; Van Carter y Copinschi, 2000*).

En la estación de primavera describimos un patrón circadiano de contenido en melatonina en la glándula pineal de rata, con niveles más elevados durante la fase oscura del fotoperiodo, apoyado por datos previos del grupo (*Cardinali y cols, 1998b; Pazo, 2002*) y de la literatura (*Binkley, 1983; Reiter, 1983; Reiter, 1991*). La amplitud del ritmo de secreción en primavera es mayor que la descrita en otoño y en invierno, lo que indica la existencia de variaciones estacionales y circaestacionales de melatonina, al igual que ocurre con la prolactina y la GH (*Nelson y cols, 1995; Cano y cols, 2002; Pazo, 2002*). Todo ello apuntaría que los mecanismos secretores de las tres hormonas están interrelacionados siendo dependientes de la estación del año considerada (*Esquifino y cols, datos no publicados*) y de los niveles plasmáticos de cada hormona (*Esquifino y cols, 1987a; Esquifino y cols, 1989a; Villanúa y cols, 1989*). El envejecimiento disminuye la concentración de esta hormona, como ya han señalado trabajos de la literatura (*Pang y cols, 1984; Miguez y cols, 1998; Cano y cols, 2002*), si bien no modifica el patrón secretor encontrado en los animales jóvenes (*Cano y cols, 2002*).

## **B) EFECTO DE LA EDAD SOBRE LOS PARÁMETROS IMPLICADOS EN LA REGULACIÓN DE PROLACTINA**

### **b.1.- Correlaciones entre las variaciones diarias de concentración de DA y el resto de los neuromoduladores estudiados, en la eminencia media**

Nuestros resultados describen por vez primera la existencia de interacciones en la eminencia media entre las terminaciones neuronales dopaminérgicas y las noradrenérgicas, serotoninérgicas, GABAérgicas o taurinérgicas. La resultante de estas interacción es la secreción de DA al sistema porta-hipofisario. Estas interacciones varían a lo largo del día lo que queda reflejado por las variaciones diarias del neurotransmisor en la hipófisis, lo que comentaremos más adelante. Sin embargo, no hemos detectado interacciones entre las

terminaciones nerviosas dopaminérgicas y somatostatinérgicas, lo que indicaría que este neuromodulador ejercería sus efectos principalmente sobre las neuronas TIDAérgicas a nivel hipotálamico, de acuerdo con otros autores (*Kaneda y cols, 1991; Shieh y Pan, 1999*). Además, destacamos que los efectos de estos neuromoduladores son diferenciales, y dependientes de su concentración en el caso de NA, GABA y taurina. Sorprendentemente, en el caso de 5-HT se ha descrito una interacción lineal positiva con DA, en principio contraria a su papel estimulador sobre la secreción de prolactina, aunque es posible que la acción del resto de los neuromoduladores pueda contrarrestar el efecto de la 5-HT.

En la eminencia media los contenidos diario en NA y DA correlacionan de forma polinómica, lo que podría explicar el aumento de la tasa de recambio de NA y DA en este tejido en situaciones de hiperprolactinemia (*Esquifino y cols, 1987b*). Asimismo, se ha descrito que la NA afecta a las neuronas TIDAérgicas en el núcleo arcuato del hipotálamo (*Moss y cols, 1975; Lin y Pan, 1993; Freeman y cols, 2000*); por lo tanto, la NA podría modular la actividad de las neuronas dopaminérgicas tanto a nivel hipotalámico en la eminencia media. La relación entre estos dos neurotransmisores en la eminencia media se pierde durante el envejecimiento, lo que llevaría consecuentemente a una alteración en el mecanismo secretor de prolactina, que se traduce en un incremento en los niveles circulantes de la hormona (*Meites y cols, 1978; Demarest y cols, 1985; García-Bonacho y cols, 2000*). Por lo tanto, la NA ejercería un papel modulador, de la concentración, sobre los efectos de DA en los animales jóvenes.

En la eminencia media la 5-HT correlaciona positivamente con la DA, como se expone en este trabajo, lo que difiere de su papel estimulador sobre la secreción de prolactina. Esto podría explicarse por la posible implicación de otros neuromoduladores no estudiados en este trabajo. De hecho los efectos de 5-HT sobre la prolactina podrían estar mediados, entre otros, por los esteroides sexuales circulantes (*Mallmann y cols, 2001*). Sin embargo, la 5-HT inhibe la actividad de las neuronas TIDAérgicas hipotalámicas (*Liang y Pan, 2000; Freeman y cols, 2000*), probablemente disminuyendo la actividad de la enzima tirosina hidroxilasa (*Monhakumar y cols, 1998*), ya que neuronas serotoninérgicas provenientes del núcleo del rafe interactúan con neuronas TIDAérgicas (*Krulich y cols, 1980; Steinbusch, 1981; Monhakumar y cols, 1998*). De acuerdo con todo ello las interacciones entre 5-HT y DA son muy complejas y pueden ser opuestas según el aminoácido estudiado, aunque globalmente se produzca un efecto estimulador de este

neurotransmisor sobre la secreción de prolactina. Sorprendentemente, y a diferencia de lo observado en las interacciones con NA, GABA o taurina, la relación entre la 5-HT y la DA en la eminencia media se mantiene en el envejecimiento, lo que ha sido descrito en el hipotálamo (*Monhakumar y cols, 1998*).

La interacción entre GABA y DA en la eminencia media, como la de NA y DA, es de tipo polinómico y depende, por tanto, de las concentraciones de ambos neurotransmisores. Sin embargo, a nivel hipotalámico, el GABA inhibe la actividad dopaminérgica (*Locatelli y cols, 1979; Casanueva y cols, 1981; Ondo y Dom, 1986; Makinen y cols, 1993; Freeman y cols, 2000; Lee y Pan, 2001*), por lo que ejercería efectos estimuladores sobre la secreción de prolactina. Además, el GABA inhibe la secreción de esta hormona cuando actúa directamente sobre la adenohipófisis (*Apud y cols, 1989; Duvilanski y cols, 1983; Duvilanski y cols, 1986*) Todo ello indica que este neurotransmisor desempeña también un papel complejo sobre el mecanismo secretor de prolactina, pudiendo describirse tanto efectos estimuladores como inhibidores sobre la secreción de esta hormona (*Lee y Pan, 2001*). La interacción entre DA y GABA en la eminencia media se pierde con la edad. Además, como se ha mencionado anteriormente, los patrones diarios de GABA y DA se desincronizan durante el envejecimiento, lo que podría explicar el incremento en la amplitud del ritmo de prolactina que observamos en los animales envejecidos.

La interacción entre taurina y DA en la eminencia media es de tipo polinómico, al igual que para la NA y el GABA. Es importante destacar que los patrones de taurina y DA en la eminencia media siguen imágenes prácticamente especulares. Todo ello sugeriría que la taurina reforzaría la pérdida de la capacidad inhibitoria de la DA sobre la prolactina, y por tanto estimularía la secreción de la hormona. Este efecto se ha descrito previamente en estudios puntuales a nivel hipotalámico (*Makinen y cols, 1993*). Sin embargo, los efectos de taurina sobre prolactina son más complejos que los derivados de esta interacción, ya que se ha descrito que la taurina actúa modificando el sistema peptidérgico opioide endógeno en el hipotálamo (*Shoichiro y cols, 1988*), sistema que no ha sido analizado en este trabajo. Durante el envejecimiento, la relación entre el contenido en taurina y en DA se pierde. Esta pérdida de correlación podría estar relacionada con la necesidad de modular el incremento en amplitud del ritmo de prolactina que se produce con la edad.

**b.2.- Relaciones entre los patrones de concentración de los neuromoduladores estudiados en la eminencia media y la adenohipófisis en animales jóvenes y envejecidos. Efecto sobre el ritmo secretor de prolactina**

Como era de esperar, en la rata adulta joven, el contenido en DA aumenta en la adenohipófisis a medida que se incrementa en la eminencia media, y es inverso a los niveles circulantes de prolactina, como se desprende de su papel inhibitor sobre el patrón secretor de la hormona. Este trabajo muestra una correlación positiva entre la DA de la eminencia media y la adenohipófisis a lo largo del día y confirma y amplía datos puntuales de la literatura (*MacLeod, 1969; Mai y cols, 1994; Freeman y cols, 2000*). Sin embargo, en animales envejecidos, si bien se mantiene la interacción positiva entre la DA de la eminencia media y de la adenohipófisis el contenido en DA en esta última es más elevada que en los animales jóvenes, lo que concuerda con trabajos puntuales (*Demarest y cols, 1985*). Este incremento de la concentración de DA en la adenohipófisis no correlaciona con los niveles circulantes de prolactina que deberían disminuir en vez de aumentar, según los datos previos (*Meites y cols, 1978; Demarest y cols, 1985; García-Bonacho y cols, 2000*). Estas discrepancias se explicarían basándose en la existencia de una diferente compartimentalización celular de la DA en las células mamotropas (*Arita y cols, 1984; Demarest y cols, 1985*). Todo ello indicaría que la mayor parte de la DA contenida en estas células adenohipofisarias no está asociada con los gránulos secretores de prolactina, lo que es indispensable para que la DA ejerza su efecto inhibitor (*Nansel y cols, 1979; Gudelsky y cols, 1980*).

El contenido en 5-HT en eminencia media y adenohipófisis correlaciona positivamente. Ello indicaría que la mayoría de la 5HT contenida en la eminencia media, llega hasta la adenohipófisis donde ejercería un efecto directo, de forma análoga a lo descrito en la DA (*Mai y cols, 1994; Freeman y cols, 2000*). Sin embargo, estudios puntuales previos de la literatura no encontraron efectos directos del neurotransmisor sobre la secreción de prolactina hipofisaria (*Lamberts y MacLeod, 1978; Tuomisto y Mansito, 1985*), por lo que la presencia de 5-HT en estas células tendría que ser redefinida. Además, los niveles de 5-HT en la adenohipófisis son más elevados que en la eminencia media, lo que podría indicar que se acumula en este tejido. Por otro lado, los resultados muestran que los niveles circulantes de prolactina disminuyen a medida que aumenta el contenido de 5-HT en la adenohipófisis, de forma similar a lo descrito para DA. Es posible que existan



efectos paracrinos de este neurotransmisor en la adenohipófisis que estarían mediados por cambios en la secreción de IL-6, interleuquina producida en concentraciones elevadas en la adenohipófisis (*Spangelo y cols, 1990*), la cual modula la secreción de prolactina, GH y LH (*Spangelo y cols, 1989*). Por lo tanto, aunque la 5-HT estimularía la secreción de prolactina ejerciendo su acción en el hipotálamo y/o la eminencia media modulando la actividad de las neuronas TIDAélicas (*Liang y Pan, 2000; Freeman y cols, 2000*). Sin embargo, los resultados encontrados en este trabajo, sugieren efectos directos del neurotransmisor sobre la adenohipófisis, que suscita la necesidad de llevar a cabo estudios más amplios, ya que incluso en el envejecimiento la relación de 5-HT en la eminencia media y la hipófisis no se altera con la edad.

Los resultados muestran que el contenido diario en GABA en la eminencia media y en la adenohipófisis correlacionan de forma inversa indicando que no todo el GABA que llega a la eminencia media es secretado a la adenohipófisis (*Vicent y cols, 1982*). Además, los resultados presentados sugieren un efecto diferencial de este neurotransmisor sobre el mecanismo secretor de prolactina, en ambos tejidos, de acuerdo con datos previos de la literatura (*Casanueva y cols, 1981; Makinen y cols, 1993; Lee y Pan, 2001*). La existencia de una correlación negativa entre el GABA y la prolactina en la adenohipófisis, encontrada en nuestro trabajo, confirma el efecto inhibitorio de ese neurotransmisor sobre la secreción de la hormona (*Enjalbert y cols, 1979; Matsushita y cols, 1983; Loeffler y cols, 1986*). Estos efectos conjuntamente con las variaciones de concentración de GABA en el hipotálamo y la eminencia media (*Pass y Gondo, 1977; Locatelli y cols, 1979; Ondo y Dom, 1986; Lee y Pan, 2001*) explican los niveles circulantes de prolactina. Por otro lado, la hormona modificaría la síntesis y secreción del GABA a lo largo del día de acuerdo con su papel inhibitorio sobre la secreción de la hormona (*Duvilanski y cols, 1987; Duvilanski y cols 2002*). Es importante destacar que mientras que no se mantenía la correlación negativa entre el contenido de DA y los niveles circulantes de prolactina en las ratas envejecidas, esta correlación sí se mantiene entre GABA y prolactina. Este efecto estaría relacionado con el hecho de que el GABA adquiere mayor relevancia como factor modulador de la secreción de prolactina en situaciones en las que la hormona está elevada (*Apud y cols, 1989; Duvilanski y cols, 1983; Duvilanski y cols, 1987*), como ocurre en el grupo envejecido de este estudio.

Sorprendentemente y como ocurría para el GABA, encontramos una correlación negativa entre la concentración de taurina en la eminencia media y la adenohipófisis y su relación con los niveles circulantes de prolactina, indicando la existencia de un efecto inhibitorio directo de la taurina sobre prolactina a nivel hipofisario, aunque otros trabajos no muestran estos efectos (*Scheibel y cols, 1980*). A la vista de datos recientes, la taurina podría ejercer efectos paracrinos directos o mediados por sustancias endógenas producidas en la propia glándula como la IL-6, que modulen la secreción de prolactina (*Spangelo y cols, 1989; Spangelo y cols, 1990*). Sin embargo, considerando los efectos de taurina sobre la secreción de prolactina en el hipotálamo (*Scheibel y cols, 1980, Arias y cols, 1998; Shoichiro y cols, 1988*) y adenohipofisario (este trabajo), se podría sugerir que este neurotransmisor ejerce efectos diferenciales sobre el mecanismo secretor de prolactina según el nivel considerado (*Casanueva y cols, 1981; Makinen y cols, 1993; Lee y Pan, 2001*). A diferencia de lo que ocurría para el GABA la correlación entre taurina y prolactina a nivel adenohipofisario desaparece con la edad, indicando que la taurina podría tener un papel más predominante sobre la secreción de prolactina en animales más jóvenes.

El contenido en somatostatina en la adenohipófisis correlaciona negativamente con los niveles circulantes de prolactina. Estos resultados explicarían que este neuropéptido regule la secreción de prolactina a nivel hipofisario, ejerciendo un papel inhibitorio sobre la secreción de esta hormona, como previamente se muestra en trabajos puntuales (*Reichlin, 1983; Patel y Srikant, 1986*). Durante el envejecimiento, se mantiene la correlación positiva entre el contenido de somatostatina en la eminencia media y la adenohipófisis, lo que indicaría que la somatostatina sería secretada desde la eminencia media, al sistema porta-hipofisario para llegar a la adenohipófisis donde realiza su función fisiológica, como se ha descrito (*Müller y cols, 1999; Freeman, 2000*). Asimismo, se observa que la concentración en ambos tejidos es inversa a los niveles circulantes de prolactina. Por lo tanto, los resultados indicarían que no se modifica el control inhibitorio de la somatostatina sobre la secreción de esta hormona en la adenohipófisis durante el envejecimiento.

## C) EFECTO DE LA EDAD SOBRE LOS PARÁMETROS IMPLICADOS EN LA REGULACIÓN DE GH

### c.1.- Correlaciones entre las variaciones diarias de concentración de somatostatina y el resto de los neuromoduladores estudiados, en el hipotálamo anterior y en la eminencia media

Se encuentra una relación negativa entre NA y somatostatina en animales jóvenes, confirmando el papel inhibitorio de la NA sobre la secreción de somatostatina, señalado en trabajos puntuales, a través de receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos (*Negro-Vilar y cols, 1979; Maeda y Frohman, 1980*). Esta correlación se pierde en animales envejecidos. Se encuentra, además, una desincronización tanto del patrón de concentración de NA (*Demerast y cols, 1980*) como de somatostatina (*Hoffman y Sladek, 1980*), lo que explicaría la reducción tan marcada de GH en estos animales. Es posible que otros neuromoduladores no analizados en este trabajo, implicados en la regulación de la secreción de GH, puedan tener un papel relevante en el envejecimiento.

Aunque no se han encontrado correlaciones entre la 5-HT y la somatostatina en la eminencia media, independientemente de la edad del animal, sí se observa una correlación positiva entre 5-HT y NA en animales jóvenes. Por lo tanto, este neurotransmisor ejercería efectos indirectos a través de NA sobre la somatostatina. Asimismo, nuestros resultados describen estas mismas interacciones en el hipotálamo anterior, lo que sugeriría la existencia de interacciones entre neuronas serotoninérgicas y somatostatinérgicas para la regulación de la secreción de GH, ya señalada en trabajos puntuales (*Kiss y cols, 1988*). Este efecto estimulador se potenciaría teniendo en cuenta que la 5-HT también actúa sobre las neuronas GHRHérgicas (*Cataldi y cols, 1994*) produciendo el mismo efecto. En los animales envejecidos, estas interacciones se pierden, lo que podría explicar los efectos desincronizadores dependientes de la edad, observados en el patrón diario de concentración de somatostatina en la eminencia media.

El contenido de GABA no correlaciona con el de somatostatina en la eminencia media ni en animales jóvenes ni en envejecidos, al igual que ocurre con 5-HT. Sin embargo, el contenido de GABA y de NA sí correlacionan positivamente en este tejido en animales jóvenes, lo que sugiere que el GABA ejerce efectos indirectos, mediados por NA,

sobre la secreción de somatostatina en la eminencia media. Esta interacción se pierde con la edad. Asimismo, nuestros resultados muestran que el GABA y la somatostatina correlacionan en el hipotálamo anterior, indicando la existencia de interacciones entre las neuronas GABAérgicas y somatostatinérgicas, similares a las descritas para 5-HT. Estas interacción han sido descritas en la literatura en estudios puntuales (*García-Segura y cols, 1991*) y sugieren un efecto inhibitor de este neurotransmisor sobre la secreción de GH, mediado por la somatostatina. Esta interacción se mantiene con la edad. Por otra parte, el efecto inhibitor de GABA sobre la secreción de somatostatina hacia el sistema porta-hipofisario (*Takahara y cols, 1980; Rage y cols, 1992*), indica un control doble del GABA sobre la concentración de somatostatina que llega a la hipófisis a lo largo del día y que modula la secreción de GH y/o prolactina.

Las concentraciones de taurina y somatostatina no correlacionan en la eminencia media de animales jóvenes, a lo largo del día, como sí ocurre con 5-HT y GABA. Sin embargo los contenidos de NA y de taurina sí correlacionan en este tejido, al igual que ocurre con los otros neurotransmisores estudiados. Al igual que GABA y 5-HT, la taurina inhibiría la secreción de GH a través de la somatostatina. Este efecto sería contrario al descrito por *Aguila y McCann en 1985* en estudios *in vitro*. Esta discrepancia podría explicarse teniendo en cuenta que los sistemas *in vitro* no reflejan la situación *in vivo* y que en nuestro trabajo se hace una comparación global de los resultados obtenidos a lo largo del día y no punto a punto. Sorprendentemente, con la edad aparece una correlación entre taurina y somatostatina en la eminencia media y en el hipotálamo anterior, lo que sugiere que los efectos moduladores de la taurina son más relevantes con la edad. De hecho, un efecto dependiente de la edad se ha demostrado para prolactina pero en este caso los efectos más relevantes se dan en animales jóvenes. Todo esto apunta que este neurotransmisor ejerce efectos diferenciales según la hormona y la edad estudiada.

### **c.2.- Relaciones entre los patrones de concentración de los neuromoduladores estudiados en la eminencia media y la adenohipófisis en animales jóvenes y envejecidos. Efecto sobre el ritmo secretor de GH**

Sorprendentemente, no hemos encontrado ningún tipo de correlación entre la somatostatina y los niveles circulantes de GH, de acuerdo con lo que cabría esperar por el papel inhibitor de la somatostatina sobre GH (*Müller y cols, 1999*). Esta discrepancia

podría explicarse porque la secreción de GH presenta secreción pulsátil con fases de secreción brusca separadas entre sí por períodos largos (horas) en los que no existe apenas secreción de la hormona (*Tannenbaum y Martín, 197; Müller y cols, 1999*). De hecho, en este trabajo no hemos encontrado un ritmo diario secretor de la hormona (*Esquifino y cols, 1999b; García-Bonacho y cols, 2000*), aunque sí lo presenta su neuromodulador tanto en la eminencia media (*Hoffman y Sladek, 1980; Esquifino y cols, 1999a*) como en la adenohipófisis (*Cano y cols, 2002; datos presentados en este trabajo*). Es importante resaltar que sí hemos encontrado un ritmo secretor para la GH en la estación de otoño (*Pazo, 2002*) lo que indicaría cambios estacionales en el mecanismo secretor de esta hormona como ya se ha reflejado para la prolactina (*Isakov y cols, 1986; Chang y cols, 1999; Pazo, 2002*). En las ratas envejecidas, la concentración de somatostatina en la eminencia media y en la adenohipófisis mantienen su correlación positiva. Asimismo, se observa que los efectos desincronizadores con la edad inducen la aparición de un máximo de concentración de somatostatina en el mismo horario en los dos tejidos. El que coincidan los máximos en el mismo horario en los dos tejidos, junto con el aumento en la concentración media diaria de somatostatina en animales envejecidos, podría indicar una potenciación del efecto inhibitor del neuropeptido sobre GH. Ello explicaría, al menos en parte, la disminución de los niveles de GH que observamos en este trabajo y en trabajos previos del grupo (*García-Bonacho y cols, 2000*) o de la literatura utilizando muestreos puntuales (*Meites, 1982; Johansson y cols, 2000; Rehman y Masson, 2001*).

Hemos encontrado una correlación positiva entre la 5-HT de la eminencia media y de la adenohipófisis tanto en ratas jóvenes como envejecidas. Este resultado podría indicar que el contenido en 5-HT en la eminencia media llegaría a través del sistema porta-hipofisario hasta la adenohipófisis, donde produciría un efecto directo sobre la secreción de GH. Sin embargo, el hecho de que no se observe correlación alguna entre el neurotransmisor y los niveles circulantes de GH sugiere más bien un efecto indirecto de la de 5-HT sobre la secreción de GH. De hecho, este neurotransmisor ejercería efectos a través de GHRH y/o somatostatina en el hipotálamo o en la eminencia media (*Willoughby y cols, 1987; Conway y cols, 1990; datos presentados en nuestro trabajo*) con el resultado final de un incremento en los niveles circulantes de GH. Aunque, a la vista de datos recientes, la 5-HT podría ejercer efectos paracrinos indirectos sobre la hipófisis mediados por sustancias endógenas producidas en la propia glándula, que modulan la secreción de GH entre otras hormonas hipofisarias, como la IL-6 (*Spangelo y cols, 1989; Spangelo y cols, 1990*). Por otra parte,

no se pueden descartar efectos sobre el PACAP (no estudiado en este trabajo) (*Yamauchik y cols, 1996*).

El contenido en GABA en la eminencia media y en la adenohipófisis no correlacionan con los niveles circulantes de GH, independientemente de la edad del animal. Estos resultados confirman que este neurotransmisor modularía indirectamente la secreción de esta hormona, como se ha descrito en la literatura. Así, se ha demostrado que este neurotransmisor ejerce efectos sobre la secreción de GHRH (*Baes y Vale, 1989*) y/o somatostina en hipotálamo o en eminencia media (*Takahara y cols, 1980; García-Segura y cols, 1991; datos presentados en nuestro estudio*), que se traducen en un incremento en los niveles circulantes de GH. El GABA que llega a la adenohipófisis procedente de la eminencia media estaría más relacionado con el mecanismo secretor de prolactina y no de GH, a la vista de los trabajos de la literatura (*Apud y cols, 1989; Duvilanski y cols, 1983; Duvilanski y cols, 1986*).

Como ocurría para la 5-HT y el GABA no existe correlación entre la taurina en eminencia media y en adenohipófisis con los niveles circulantes de GH, independientemente de la edad del animal. Estos resultados confirman que la taurina modularía indirectamente la secreción de esta hormona a través cambios en la concentración de somatostatina tanto en hipotálamo como en eminencia media, como han descrito estudios puntuales de la literatura en (*Aguila y McCann, 1985*) y como sugieren los resultados de este trabajo.

---

## **CONCLUSIONES**

1.- Los cambios descritos para todos neuromoduladores estudiados en el hipotálamo anterior y mediobasal, en animales de más edad, sugieren que el envejecimiento modifica diferencialmente el funcionamiento cronobiológico del hipotálamo.

2.- Asimismo los cambios descritos para los neuromoduladores estudiados en la eminencia media en animales de mas edad, indican que el envejecimiento modifica diferencialmente su funcionamiento cronobiológico, en paralelo a lo encontrado en el hipotálamo anterior y/o mediobasal.

3.- Los neuromoduladores estudiados en la adenohipófisis, muestra variaciones a lo largo del día, como se ha descrito anteriormente en el hipotálamo anterior, mediobasal y en la eminencia media. El hecho de que todos los neuromoduladores estudiados no se desincronicen con la edad a excepción de DA y somatostatina, a este nivel, implica que las correlaciones que se establecen entre ellos mantienen la secreción hipofisaria en un estado pseudonormal durante el envejecimiento.

4.- Mientras que las interacciones DA con GABA, 5HT y taurina en la eminencia media explican, al menos en parte el incremento en la amplitud del ritmo secretor de prolactina que se produce durante el envejecimiento, las interacciones entre somatostatina y NA en la eminencia media, y de NA con 5-HT, GABA y taurina tanto en este tejido como en el hipotálamo anterior explicarían las variaciones diarias de GH con la edad. Las interacciones de estos neuromoduladores en la hipófisis con las hormonas estudiadas confirman los efectos observados en la eminencia media y en el hipotálamo anterior.

5.- Globalmente los efectos desincronizadores observados a nivel del eje hipotálamo-hipofisario para la mayoría de los parámetros estudiados, sugieren un cambio en el mecanismo homeostático predictivo de este eje con la edad que va a condicionar sus respuesta a estímulos externos (por ejemplo a los cambios ambientales).



**BIBLIOGRAFÍA**

---

- Afilone S., Duvilanski B., Seilicovich A., Lasaga M., Díaz M.C., Develjuk L. (1990a).* “Effects of serotonin on the hypothalamic-pituitary GABAergic system”. *Brain Res. Bull.*, 25:245-249.
- Afilone S., Develjuk L., Seilicovich A., Pisera D., Lasaga M., Díaz C., Duvilanski B. (1990b).* “Substance P affects the GABAergic system in the hypothalamo-pituitary axis”. *Peptides*, 11:1065-1068.
- Aguilar M.C., McCann (1985).* “Stimulation of somatostatin release from median eminence tissue incubated *in vitro* by taurine and related aminoacids”. *Endocrinology*, 116:1156-1162.
- Aguilar Roblero R., Verduzco-Carbajal L., Rodríguez C., Mendez-Franco J., Mora J., De la Mora M.P. (1993).* “Circadian rhythmicity in the GABAergic system in the suprachiasmatic nuclei of the rat”. *Neurosci. Lett.*, 157(2):199-202.
- Alba-Roth J., Müller O.A., Schopohl J., Von Verder K. (1988).* “Arginine stimulates growth hormone secretion by supresing endogenous somatostatin secretion”. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 67:1168.
- Algeri S., Calderini G., Tofano G., Ponzio F. (1983).* “Neurotransmitter alterations in aging rats”. In: Samuel D., Algeri S., Gershon S., Grimm V.E., Toffano G. (eds). *Aging the brain*. Raven Press, New York, pp 227-243.
- Apud J.A., Masotto C., Cocchi D., Locatelli V., Muller E.E., Racagni G. (1984).* “Prolactin control by the tuberoinfundibular GABAergic system: role of anterior pituitary GABA receptors”. *Psychoneuroendocrinology*, 9:125-133.
- Apud J.A., Cocchi D., Locatelli V., Masoto C., Muller E.E., Racagni G. (1989).* “Biochemical and functional aspects on the control of prolactin release by the hypothalamo-pituitary GABAergic system”. *Psychoneuroendocrinology*, 14:3-17.
- Arafah B.M., Finegan H.M., Roe J., Manni A., Pearson O.H. (1982).* “Hormone dependency in N-nitrosomethyurea-induced rata mammary tumors”. *Endocrinology*, 111:584.
- Arafah B.M., Griffin P., Gordon N.H., Pearson O.H. (1984).* “Growth enhancement of N-nitrosomethyl-induced rat mammary tumors cells in soft agar by estrogen or prolactin”. *Cancer Res.*, 44:5506-5608.
- Arafah B.M., Gordon N.H., Salazar R., Douglas J.G. (1990).* “Modulación of tissue responsiveness to angiotensin II in hyperprolactinemic subjects”. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 71:60-66.
- Arbogast L.A., Voogt J.L. (1997).* “Prolactin (PRL) receptors are colocalized in dopaminergic neurons in fetal hypothalamic cell cultures: effect of PRL on tyrosine hydroxylase activity”. *Endocrinology*, 138:33016-3023.
- Arce V., Lima L., Lois C. (1991a).* “Role of central dopaminergic pathways in the neural control of growth hormone secretion in normal men: studies with metoclopramine”. *Neuroendocrinology*, 53:143.

- Arce V., Lima L., Devesa J. (1991b). "Growth hormone and aging". *Endocrinología*, 38:254.
- Arce A. (1994). "Papel de la prolactina y la intervención autonómica en los efectos de la ciclosporina sobre la respuesta inmunológica de los ganglios linfáticos submaxilares". Tesis doctoral, Facultad de Ciencias, Sección de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Madrid. (Directora: Ana I. Esquifino).
- Arce A., Castrillón P.O., Cardinali D.P., Esquifino A.I.(1997)."Age-dependent effects of pituitary transplants on immune responses in rat spleen. Modulatory effect of cyclosporine". *Biol. Signal*, 6:11-20.
- Arias P., Jarry H., Convertini V., Ginzburg M., Wuttke W., Moguilevsky J. (1998). "Changes in mediobasal hypothalamic dopamine and GABA release: a possible mechanism underling taurine-induced prolactin secretion". *Amino acids*, 15(1-2):5-11.
- Arimura A., Merchenthaler I., Culler M.D. (1986). "Distribution and release of GRF". In: *Endocrinology*, edited by F. Labrie and L. Proulux. Amsterdam: Elsevier, p 827-830.
- Arita J., Reymond M.J., Porter J.C. (1984). "Evidence for alteration in the processing of dopamine in the anterior pituitary of aged rats: Receptors and intracellular compartmentalization of dopamine". *Endocrinology*, 114:974-979.
- Arita J., Kojima Y., Kimura F. (1991). "Identification by the sequential cell immunoblot assay of a subpopulation of rat dopamine-unresponsive lactotrophs". *Endocrinology*, 128:1887-1894
- Arnold M.A., Fernstrom J.D. (1981). "L-tryptophan injection enhances pulsatile growth hormone secretion in the rat". *Endocrinology*, 108:331-335.
- Artz E., Stalla G.K. (1996). "Cytokines: autocrine and paracrine roles in the anterior pituitary". *Neuroimmunomodulation*, 3(1):28-34.
- Arutjunyan A.V., Kerkeshko G.O., Amisimov U.N., Steparov M.G., Prokopenko V.M., Pozdeyev N.V., Korenevsk A.V. (2001). "Disturbances of diurnal rhythms of biogenic amines contents in hypothalamic nuclei as a evidence of neurotropic effects of enterotropic carcinogen 1,2-dimethyl hydrazine". *Neuroendocrinol. Lett.*, 22(4):229-237.
- Aschoff J. (1960). "Exogenous and endogenous components in circadian rhythms". *Aerospace Medicine*, 40:844-849.
- Babu G.N., Vijayan E. (1983). "Plasma gonadotrophin, prolactin levels and hypothalamic tyrosine hydroxylase activity following intraventricular bombzed conscious rats". *Brain Research Bulletin*, 11:25-2.

- Baes M., Vale W.W. (1989).* “Growth hormone-releasing factor secretion from fetal hypothalamic cell culture is modulated by forskoli, phorbol esters and muscimol.” *Endocrinology*, 124:104-110.
- Baes M., Vale W.W. (1990).* “Characterization of the glucose-dependent release of growth hormone-releasing factor and somatostatin from perfused rat hypothalami” *Neuroendocrinology*, 51:202-207.
- Bakowska J.C., Morrel J.L. (1997).* “Atlas of the neurons that express mRNA for the long form of the prolactin receptor in the forebrain of the female rat”. *J. Comp. Neurol.*, 386:161-177.
- Banay-Schwartz M., Lajtha A., Palkovits M. (1989a).* “Changes with aging in the levels of amino acids in rat CNS structural elements I. Glutamate and related amino acids”. *Neurochemical research*, 14(6):555-562.
- Banay-Schwartz M., Lajtha A., Palkovits M. (1989b).* “Changes with aging in the levels of amino acids in rat CNS structural elements II. Taurine and small neutral amino acids”. *Neurochemical research*, 14(6):563-570.
- Barassin S., Raison S., Saboureau M., Bienvenu C., Maitre M., Malan A., Pevet P. (2002).* “Circadian tryptophan hydroxylase levels and serotonin release in the suprachiasmatic nucleus of the rat”. *Eur. J. Neurosci.*, 15(5) :833-840.
- Bataille D., Peillon F., Besson J., Rosselin G. (1979).* “Vasoactive intestinal peptide (VIP): receptors spécifique le activation de l’adenylate cyclase dans une tumeur hypophysaire a prolactin”. *C.R. Acad. Sci. Ser. D (Paris)*, 288: 1315.
- Bazan J.F. (1990).* “Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily”. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:6934-6938.
- Ben-Jonathan L. (1985).* “Dopamine: A prolactin-inhibiting hormone”. *Endocrine Reviews*, 6:564-589.
- Ben-Jonathan N., Arbogast A., Hyde L. y F. (1989).* “Neuroendocrine regulation of prolactin release”. *Progress in Neurology*, 33:399-477.
- Benedetti M.S., Russo A., Marrari P., Dostert P. (1991).* “Effects of aging on the content in sulfur-containing amino acid in rat brain”. *J. Neural Trans. Gen. Sect.*, 86(3) : 191-203.
- Bentley A.M., Wallis M. (1987).* “In vitro evidence for the autoregulation of prolactin secretion at the level of the pituitary gland in the rat”. *J. Endocrinol.*, 115:13-18.
- Berelowitz M., Dudlak D., Frohman L.A. (1982a).* “Diurnal variations in release of somatostatin-like immunoreactivity from incubated rat hypothalamus and cerebral cortex”. *Endocrinology*, 10(6):2195-2197.

- Berelowitz M., Dudlak D., Frohman L.A. (1982b).* “Release of somatostatin-like immunoreactivity from incubated rat hypothalamus and cortex. Effects of glucose and glucoregulatory hormones”. *J. Clin. Invest.*, 69:1293-1301.
- Berczi I. (1986).* “The immune system and its function. Pituitary function and immunity”. Berczi I (ed). CRC Press, Boca Raton, Ca. pp:1-7.
- Bethea C.L., Neill J.D.(1979).* “Prolactin secretion after cervical stimulation of rats maintained in constant dark or constant light”. *Endocrinology*, 104:870-876.
- Bethea C.L., Neill J.D. (1980).* “Lesions of the suprachiasmatic nuclei abolish the cervically stimulated prolactin surges in the rat”. *Endocrinology*, 107:1-5.
- Binkley S.A. (1983).* “Circadian rhythms of pineal function in rats”. *Endocrine Reviews*, 4(3):255-270.
- Blake C.A. (1974).* “Stimulation of pituitary prolactin and TSH release in lactating and proestrous rats”. *Endocrinology*, 94:503-508.
- Bloch B., Guillard R.C., Brazeau P., Lin P., Ling N. (1984).* “Topographical and ontogenetic study of the neurons producing growth hormones-releasing factor in human hypothalamus”. *Regul. Pept.*, 8:21-31.
- Bolander F.F. (1999).* “Regulation of prolactin receptor glycosylation and its role in receptor localization”. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 149:85-92.
- Bole-Feysot C., Goffin V., Edery M., Binart N., Kelly P.A. (1998).* “Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice”. *Endocr. Rev.*, 19:225-268.
- Boockfor F.R., Hoeffle J.P., Frawley L.S. (1985).* “Cultures of GH<sub>3</sub> cells are functionally homogeneous. Thyrotrophin-releasing hormone, estradiol and cortisol cause reciprocal shifts in the proportion of growth hormone and prolactin secretors”. *Endocrinology*, 117:418-420.
- Boockfor F.R., Frawley L.S. (1987).* “Functional variations among prolactin cells from different pituitary regions”. *Endocrinology*, 120:874-879.
- Bourin P., Mansour I., Doinel C., Roue R., Rouger P., Levi F. (1993).* “Circadian rhythms of circulating NK cells in healthy and human immunodeficiency virus-infected men”. *Chronobiol. Int.*, 10:298-305.
- Bowers C.Y., Friesen H.G., Hwang P., Guyda H.J., Folkers K. (1971).* “Prolactin and thyrotropin release in man by synthetic pyroglutamyl-histidyl-prolinamide”. *Biochem. Biophys Res. Commun.*, 45:1033-1041.
- Bradford M.M. (1976).* “A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding”. *Anal. Biochem.*, 72:248-254.

- Brunello N., Riva M., Rovescalli A.C., Galimberti R., Racagni G. (1988).* “Age-related changes in serotonergic and adrenergic systems and in receptors responsive to subchronic desipramine treatment”. *Pharmacol. Toxicol.*, 63:150-155.
- Bulter W.R., Krey L.C., Lu H.C., Peckham W.D., Knobil E. (1975).* “Surgical disconnection of the medial hypothalamus and pituitary function in the rhesus monkey IV. Prolactin secretion”. *Endocrinology*, 96(5):1099-1105.
- Burstyn P.G.R. (1978).* “Sodium and water metabolism under the influence of prolactin, aldosterone and antidiuretic hormone”. *J. Physiol. (London)*, 275:39.
- Cagampang F.R., Okamura H., Inouye S. (1994).* “Circadian rhythms of norepinephrine in the rat suprachiasmatic nucleus”. *Neurosci. Lett.*, 33:173(1-2):185-188.
- Cai A., Wise P.M. (1996).* “Age-related changes in the diurnal rhythm of CRH gene expression in the paraventricular nuclei”. *Am.J. Physiol.*, 270(2):238-243.
- Cai A., Bowers R.C., Moore J.P. Jr., Hyde J.F. (1998).* “Function of galanin in the anterior pituitary of estrogen-treated Fischer 344 rats: autocrine and paracrine regulation of prolactin secretion”. *Endocrinology*, 139:2452-2458.
- Calza L, Giardino L, Velardo A, Battistini N, Narrama P. (1990).* “Influence of aging on the neurochemical organization of the rat paraventricular nucleus”. *J. Chem Neuroanat.*, 3(3):215-231.
- Cano P., Cardinali D.P., Chacón F., Castrillón P.O., Reyes Toso C.A., Esquifino A.I. (2001).* “Age-dependent changes in 24-hour rhythms of catecholamine content and turnover in hypothalamus, habenular striatum and pituitary gland of rats injected with Freund’s adjuvant”. *BMC physiology*, 1:14.
- Cano P., Cardinali D.P., Chacon F., Reyes Toso C. A., Esquifino A.I. (2002).* “Nighttime changes in norepinephrine and melatonin content and serotonin turnover in pineal glands of young and old rats injected with Freund Adjuvant”. *Neuroendocrinology Lett.*, 23(1):49-53.
- Cardinali D.P., Golombek D.A., Bonanni Rey R.A. (1992).* “Relojes y calendarios biológicos. Sincronía del hombre con su medio ambiente”. Fondo de Cultura Económica, Buenos Aires. Argentina.
- Cardinali D.P., Jordá Catalá J.J., Sánchez Barceló E.J. (1994).* “Introducción a la cronobiología”. Universidad de cantabria.
- Cardinali D.P., Cutrera R., Castrillón P.O., Esquifino A.I. (1996a).* “Diurnal rhythms in ornithine decarboxylase activity and norepinephrine and acetylcholine synthesis of rat submaxillary lymph nodes: effect of pinealectomy, superior cervical ganglionectomy and melatonin replacement”. *Neuroimmunomodulation*, 3:102-111.
- Cardinali D.P., Della Maggiore V., Selgas L., Esquifino A.I. (1996b).* “Diurnal rhythms in ornithine decarboxylase activity and noradrenergic and cholinergic markers in rat submaxillary lymph nodes “. *Brain Research*, 711:153-162.

- Cardinali D.P., Brusco L.I., García-Bonacho M., Esquifino A.I. (1998a)*. “Effect of melatonin on 24-hour rhythms of ornithine decarboxylase activity and norepinephrine and acetylcholine synthesis in submaxillary lymph nodes and spleen of young and aged rats”. *Neuroendocrinology*, 67:349-362.
- Cardinali D.P., Brusco L.I., Selgas L., Esquifino A.I. (1998b)* “Diurnal rhythms in ornithine decarboxylase activity and norepinephrine and acetylcholine synthesis in submaxillary lymph nodes and spleen of young and aged rats during Freund's adjuvant-induced arthritis. *Brain Res.*, 13;789(2):283-92.
- Cardinali D.P., Golombek D.A. (1998)*. “The rhythmic GABAergic system”. *Neurochemical Research*, 23:611-618.
- Cardinali D.P. (1999)*. “Ritmos biológicos”. En: *Fisiología humana*. Tresguerres J.A.F., Aguilar E., Cachofeiro V., Cardinali D.P., Gil P., Lahera V., Martínez J.A., Mora F., Rodríguez R., Romano M., Tamaro J., Zarco P.(eds). McGraw-Hill. Interamericana, Madrid, pp:1133-1147.
- Cardinali D.P.(2001)*. “Manual de neurofisiología”. Sintex.
- Caron R.W., Jahn G.A., Deis R.P. (1994)*. “Lactogenic action of different growth hormone preparations in pregnant and lactating rats”. *J. Endocrinol.*, 142(3):535-545.
- Casanueva F., Apud J., Locatelli V., Martínez-Campos A., Civati C., Racagni G., Cocchi D., Müller E.E. (1981)*. “Mechanisms subserving the stimulatory and inhibitory components of  $\gamma$ -aminobutyric acid-ergic control of prolactin secretion in the rat”. *Endocrinology*, 109:567-575.
- Casanueva F., Apud J.A., Massoto C., Cocchi D., Locatelli V., Racagni G., Müller E. (1984)*. “Daily fluctuations in the activity of the tuberoinfundibular GABAergic system and plasma prolactin levels”. *Neuroendocrinology*, 39(4) :367-370.
- Castrillón P.O., Esquifino A.I., Varas A., Zapata A., Cutrera R.A., Cardinali D.P. (2000)*. “Effect of melatonin on 24 hour rhythms in lymphocyte subset populations in rat submaxillary lymph nodes”. *J. Neuroendocrinology*, 12:758-765.
- Castrillón P.O., Cardinali D.P., Pazo D., Cutrera R.A., Esquifino A.I. (2001)*. “Effect of superior cervical ganglionectomy on 24-hour variations in serum ACTH, growth hormone, prolactin and luteinizing hormone levels, and in hypothalamic monoamine turnover, during the preclinical phase of Freund's adjuvant arthritis in rats”. *Journal of Neuroendocrinology*, 13:288-295.
- Cataldi M., Magnan E., Guillame V., Hery F., Dutour A., Rettori M.C., Kamoun A., Oliver C. (1994)*. “Effect of tianeptine on the hypothalamic somatotrophic axis in the conscious sheep”. *Eur.J. Pharmacol.*, 253:149-153.
- Cattabeni F., Maggi A., Monduzzi M., De Angelis L, Racagni G. (1978)*. “GABA: circadian fluctuations in rat hypothalamus”. *J. Neurochem*, 31(2):565-567.

- Ceda G.P., Valenti G., Butturini U., Hoffman A.R. (1986).* “Diminished pituitary responsiveness to growth hormone releasing factor in aging male rats”. *Endocrinology*, 118:2109.
- Chang L.L., Lo M.J., Kan S.F., Huang W.J., Chen J.J., Kau M.M., Wang J.L., Lin H., Tsai S.C., Chiao Y.C., Yeh J.Y., Wun W.S., Wang P.S. (1999).* “Direct effects of prolactin on corticosterone release by zona fasciculate-reticularis cell from male rats”. *Journal of Cellular Biochemistry*, 73(4):563-572.
- Chen H.T., Meites J. (1975).* “Effects of biogenic amines and TRH on the release of prolactin and TSH in the rat”. *Endocrinology*, 96:10-14.
- Chen H.T., Meites J. (1979).* “Endocrinology, 85:503-505.
- Chen E.Y., Liao Y., Smith D.H., Barrera-Saldaña H.A., Gelinas R.E., Seeburg P.H. (1989).* “The growth hormone gene locus nucleotide séquence, biology and evolution”. *Genomics*, 4:479.
- Chihara K., Minamitani N., Kaji H., Arimura A., Fujita T. (1979).* “Intraventricular injected growth hormone stimulates somatostatin release into rat hypophyseal portal blood”. *Endocrinology*, 109:2279-2281.
- Clark W.E., Le Gross J., Beattie G., Riddoch N.M., Dott. (1938).* “The hypothalamus. Morphological, Functional, Clinical and Surgical aspects “. Oliver and Boyd, Edimburgh.
- Clevenger C.V., Russell D.H., Appasamy P.M., Prystowsky M.B. (1990).* “Regulation of interleukin 2-driven T-lymphocyte proliferation by prolactin”. *Proceeding of the National Academy of Science of USA*, 87:6460-6464.
- Cohen I.R., Mann D.R. (1979).* “Seasonal changes associated with puberty in female rats: effect of photoperiod and ACTH adminisitation”. *Biol. Reprod.*, 20:757-762.
- Cohen I.R., Wise P.M. (1988).* “Age-related changes in the diurnal rhythm of serotonin turnover in microdissected brain areas of estradiol-treated ovariectomized rats”. *Endocrinology*, 122(6): 2626-2633.
- Conway S., Richardson L., Speciale S., Moherek R., Marceri H., Krulich L. (1990).* “Interaction between norepinephrine and serotonin in the neuroendocrine control of growth hormone release in the rat”. *Endocrinology*, 126(2):1022-1030.
- Cooper G.R., Shin S.H. (1981).* “Somatostatin inhibits prolactin secretion in the estradiol primed male rat”. *Can J. Physiol. Pharmacol.*, 59:1082-1088.
- Copinschi G., Van Cauter E. (1995).* “Effects of ageing on modulation of hormonal secretions by sleep and circadian rhythmicity”. *Horm. Res.*, 43(1-3): 20-24
- Costoya J.A., Vidal A., García Barros M., Arce V., Devesa J. (1996).* “Expression of the human growth hormone normal gene, hGH-N in proliferating and differentiated HL-60 cells”. *Exp. Cell Res.*, 228:164-167.



- Cramer C.R., Parker O.M.Jr, Porter J.C. (1979).* “Estrogen inhibition of dopamine release into hypophysial portal blood”. *Endocrinology*, 104:419-422.
- Cuttler L. (1996).* “The regulation of growth hormone secretion”. *Endocrinol. Metab. Clinics of North America*, 25:541.
- Dawson R. Jr. Pellemounter M.A., Cullen M.J., Gollud M., Liu S. (1999).* “An aged related decline in striatal taurine is correlated with a loss of dopaminergic markers”. *Brain Res.*, 48(3): 319-324.
- De Castro E., Silva E.J., Antunes-Rodrigues J. (1989).* “Central adrenoceptors and basal prolactin release in the rat.” *Horm.Metab. Res.*, 21:179-181.
- De Paul A.L., Pons P., Aoki A., Torres A.I. (1997).* “Heterogeneity of pituitary lactotrophs: immunocytochemical identification of functional lactotrophs: immunocytochemical identification of functional subtypes”. *Acta Histochem.*, 99:277-289.
- De Gennaro Colonia V., Zoli M., Cocchi D. (1989).* “Reduced growth hormone-releasing factor-like immunoreactivity and GHRF gene expression in the hypothalamus of aged rats”. *Péptides*, 10:705.
- Deslauriers N., Gaudreau P., Abirt T., Reinier G., Petitder D., Brazcau P. (1991).* “Dynamic of growth hormone responsiveness to growth hormone releasing factor in aging rats : peripheral and central influences”. *Neuroendocrinology*, 53(5):439-446.
- Demarest K.T., Riegler G.D., Moore K.E. (1980).* “Characteristics of dopaminergic neurons in the aged male rat”. *Neuroendocrinology*, 31:222-227.
- Demarest K.t., Moore K.E., Riegler G.D. (1985).* “Adenohypophysial dopamine content and prolactin secretion in the aged male and female rat”. *Endocrinology*, 116(4):1316-1323.
- Devesa J. (1990).* “Hormona de crecimiento y somatomedinas”. En: *Fisiología endocrina*. Tresguerres J.A.F. (ed). EUEDEMA, Madrid.
- Devesa J., Lima L., Tresguerres J.A.F. (1991a).* “Neuroendocrinology control of growth hormone secretion in humans”. *Trends Endocrinol. Metab.*, 3:11.
- Devesa J., Lois N., Arce V., Díaz M.J., Lima L., Tresguerres J.A.F. (1991b).* “The role of sexual steroids in the modulation of growth hormone, GH secretions in humans”. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 40:165.
- Devesa J., Lima L., Arce V., Díaz M.J., Tresguerres J.A.F. (1993).* “State of the art 1992 in the GH control”. En: *Two decades of experience in growth*. Eds M. Ponbo, Rosenfeld R.G. Raven Pres., New York, 1993.
- Devesa J., García-Barros M., Costoya J.A. (1996).* “Expresión de los genes de hormonas de crecimiento, variantes moleculares y acciones biológicas de estas variantes”. En: *Retrasos del crecimiento*. Moreno B., Tresguerres J.A.F. (eds). Díaz de Santos, Madrid.

- Diamond M.C., Scheibel A.B., Elson L.M.(1996).* "El cerebro humano: libro de trabajo". Editorial Ariel Neurociencia.
- Donovan B.T. (1977).* "Fundamentos de los mecanismos neuroendocrinos. En: Manual de neuroendocrinología. Ed. El manual moderno, México.
- Dumont J. (1971).* "The action of thyrotropin in thyroid metabolism". *Vitam. Horm.*, 29:287.
- Dutt A., Kaplitt M.G., Kow L.M., Pfaff D.W, (1994).* "Prolactin. Central nervous system and behavior: a critical review". *Neuroendocrinology*, 59:413-419
- Duvilanski B.H., Díaz M.C., Debeljuk L. (1983).* "The effect of prolactin on GABA related enzymes in the hypothalamus and pituitary of ovariectomized rats". *Neuroendocri. Lett.*, 5:99-104.
- Duvilanski B.H., Selicovich A., Díaz M.C., Lasaga M., Debeljuk L. (1986).* "GABA-prolactin interactions". *Adv. Biochem., Psychopharmacol.*, 42 :119-130.
- Duvilanski B.H., Selicovich A., Lasaga M., Díaz M.C., Debeljuk L. (1987).* "Mechanism of endogenous GABA release from hypothalamic slice. Effect of prolactin". *Neuroendocrinology*, 46:504-510.
- Duvilanski B.H., Selgas L, García-Bonacho M., Esquifino A.I. (1998).* "Daily variations of aminoacid concentration in mediobasal in rats injected with Freund's adjuvant. Effect of cyclosporine". *J. Neuroimmunol.*, 187(1-2):189-196.
- Duvilanski B.H., Alvarez M.P., Castrillón P.O., Cano P., Esquifino A.I. (2002).* "Daily changes of GABA and taurine concentrations in various hypothalamic areas are affected by chronic hyperprolactinemia". *Chronobiology International*, en prensa.
- Emanuele N.V., Metcalfe L., Wallock L., Tentler J., Hagen T.C., Beer C.T., Martinson D., Gout P.W., Kirstens L., Lawrence A.M. (1987).* "Extrahypothalamic brain prolactin: characterization and evidence for independence from pituitary prolactin". *Brain Res.*, 421:255-262.
- Enjalbert A., Ruberg M., Arancibia S., Fiore L., Priam M., Kordon C. (1979).* "Independent inhibition of prolactin secretion by dopamine and gamma aminobutyric acid in vitro". *Endocrinology*, 105:823-826.
- Epler B., Dawson R.Jr. (2001).* "Dietary taurine manipulations in aged male Fisher 344 rat tissue: TAU concentration, TAU biosynthesis and oxidate markers". *Biochem Pharmacol.*, 62(1):29-36.
- Eriksson B.M., Persson B.A. (1982).* "Determination of catecholamines in rat heart tissue and plasma samples by liquid chromatography with electrochemical detection". *Journal of chromatography*, 228:143-154.

- Eskay R.L., Oliver C., Ben-Jonathan N., Porter J.C. (1975).* “Hypothalamic hormone in portal and system blood”. In: hypothalamic hormones: Chemistry, Physiology, Pharmacology and Clinical Uses, edited by Motta M., Crosighani P.G., Martini L., New York: Academic, p, 125-137.
- Esquifino A.I. (1976).* “Puesta a punto de un radioinmunoensayo de prolactina de rata”. Tesina de Licenciatura. Universidad Autónoma de Madrid (Directora: Gabriela Morreale).
- Esquifino A.I., Fernández-Ruíz J.J., Cebeira M., Agrasal C., Tresguerres J.A.F., Ramos J.A. (1987a).* “Effect of experimentally induced hyperprolactinemia on growth hormone secretion”. *Revista Española de fisiología*, 43(4): 463-468.
- Esquifino A.I., Fernández J.F., Bartke A., Agrasal C., Steger R., Cebeira M. (1987b).* “Prolactin increases norepinephrine and dopamine turnover in the median-eminence of hypophysectomized female rats”. *Neuroendocrinol. Lett.*, 9(1):5-13.
- Esquifino A.I., Agrasal C., Villanúa M.A. (1989a).* “Prolactina: fisiología y regulación”. En: *Fisiología Endocrina*. Fernández-Tresguerres J.A. (Ed), Eudema, Universidad. Madrid, pp 179-192.
- Esquifino A.I., Villanúa M.A., Agrasal C., Tresguerres J.F.A. (1989b).* “Posible prolactin mediated effects of melatonin on gonadotropin secretion in the rat”. *Pharmacology biochemistry and Behavior*, 32:157-162.
- Esquifino A.I., Selgas L., Arce A., Della Maggiore V., Cardinali D.P. (1996).* “Twenty four hour rhythms in immune responses in rat submaxillary lymph nodes and spleen. Effect of cyclosporine”. *Brain, Behavior and Immunity*, 10:92-102.
- Esquifino A.I., Arce A., Villanúa M.A., Cardinali D.P. (1997).* “Twenty-four hour rhythms of serum prolactin, growth hormone and luteinizing hormone levels and of medial basal hypothalamic corticotropin-releasing hormone levels and dopamine and serotonin metabolism in rats neonatally administered melatonin”. *Journal of Pineal Research*, 22:52-58.
- Esquifino A.I., Selgas L., Vara E., Arce A., Cardinali D.P. (1999a).* “Twenty-four hour rhythms of hypothalamic corticotropin-releasing hormone, thyrotropin-releasing hormone, growth hormone-releasing hormone and somatostatin in rats injected with Freund’s adjuvant”. *Biol. Signals recept*, 8(3):178-190.
- Esquifino A.I., Castrillón P.O., García-Bonacho M., Vara E., Cardinali D.P. (1999b).* “Effect of melatonin treatment on 24-hour rhythms of serum ACTH, growth hormone, prolactin, luteinizing hormone and insuline in rats injected with Freund’s adjuvant”. *J. Pineal Res.*, 27:15-23.
- Esquifino A.I., Pazo D., Cutrera R.A., Cardinali D.P. (1999c).* “Seasonally dependent effect of ectopic pituitary grafts on 24-hour rhythms in serum prolactin and gonadotropins in rats”. *Chronobiology international*, 16:451-460.

- Esquifino A.I., Cano P., Chacón F., Reyes Toso C. F., Cardinali D. P. (2002).* “Effect of aging on 24-hour changes in dopamine and serotonin turnover and aminoacid and somatostatin content of rat corpus striatum”. *Neurosignals*, en prensa.
- Fernández-Vasquez G., Cacicedo L., Lorenzo M.J., Tolón R.M., Lopez J., Sánchez F.F. (1995).* “Corticosterone modulates growth hormone-releasing factor and somatostatin in fetal rat hypothalamic cultures”. *Neuroendocrinology*, 61:31-35.
- Fernández-Ruiz J.J., Cebeira M., Agrasal C., Tresguerres J.A.F., Bartke A., Esquifino A.I., Ramos J.A. (1987).* “Possible role of dopamine and noradrenaline in the regulation of prolactin secretion from an ectopic anterior pituitary gland in female rats”. *J. Endocrinology*, 113:45-49.
- Fessler R.G., Deyo S.N., Meltzer H.Y., Miller R.J. (1984).* “Evidence that the medial and dorsal raphe nuclei mediate serotonergically-induced increases in prolactin release from the pituitary”. *Brain Res.*, 299:231-237.
- Field J. (1978).* “Pituitary thyrotropin mechanism of action”. En: *The Thyroid* Harper and Row (eds), New York, 185.
- Fishman M.A., Peake G.T. (1970).* “Paradoxical growth in patient with the diencephalic syndrome”. *Periatrics*, 45:973-982.
- Forman L.J., Somtang W.E., Hylka V.W., Meites J. (1985).* “Pituitary growth hormone and hypothalamic somatostatin in young female rats versus old constant estrous female rats”. *Experientia*, 41(15):653-654.
- Frantz A.G. (1979).* “Rhythms in prolactin secretion”. *Endocrine Rhythms*, Krieger D.T. (Eds). New York, Raven Press, 175-186.
- Frawley L.S., Boockfor F.R., Hoefler J.P. (1985).* “Identification by plaque assays of a pituitary cell type that secretes both growth hormone and prolactin”. *Endocrinology*, 116:734-737.
- Freeman M.E., Kanyicska B., Lerant A., Nagy G. (2000).* “Prolactin: Structure, Function and Regulation of Secretion”. *Physiological Reviews*, 80(4): 1523-1631.
- Gaillard R.C. (1998).* “Cytokines in the neuroendocrine system”. *International Reviews of Immunology*, 17:181-216.
- Gala R.R., Shevach E.M. (1994).* “Evidence for the release of a prolactin like substance by mouse lymphocytes and macrophages”. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 205:12-19.
- Gamse R.D., Vaccaro D., GAMSE G., Pad DI, Fox T.O., Leeman S.E. (1980).* “Release of immunoreactive somatostatin from hypothalamic cells in culture: Inhibition by gamma-aminobutyric acid”. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 77:5552-5557.
- Ganzetti I., De Gennaro V., Redaelli M., Müller E.E., Cocchi D. (1986).* “Effect of hypophysectomy and growth hormone replacement on hypothalamic GHRH”. *Peptides*, 7:1011-1014.

- García-Bonacho M., Esquifino A.I., Castrillón P.O., Reyes Toso C., Cardinali D.P. (2000).* "Age-dependent effect of Freund's adjuvant on 24-hour rhythms in plasma prolactin, growth hormone, thyrotropin, insulin, follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone and testosterone in rats". *Life Science*, 66:1969-1977.
- García-Bonacho M., Cardinali D.P., Castrillón P., Cutrera R.A., Esquifino A.I. (2001).* "Aging-induced changes in 24-h rhythms of mitogenic responses, lymphocyte subset populations and neurotransmitter and amino acid content in rat submaxillary lymph nodes during Freund's adjuvant arthritis". *Experimental Gerontology*. 36:267-282.
- García Fernández J.M. (1998).* "Los ritmos biológicos y sus fundamentos neuronales". En: manual de neurociencia. Delgado J.M., Ferrús A., Mora F., Rubia F. (eds). Síntesis, Madrid, pp: 778-799.
- García-Segura L. M., Perez J., Pons M., Rejas M.T., Torres-Aleman I. (1991).* "Localization of insulin-like growth factor I (IFG-I)-like immunoreactivity in the developing and adult rat brain". *Brain Res.*, 560:167-174.
- Gardi J., Obal F.Jr., Fang J., Zhang J., Krueger J.M. (1999).* "Diurnal variations and sleep deprivation-induced changes in rat hypothalamic GHRH and somatostatin contents". *Am. J.Physiol.*, 277(5Pt2):1339-1344.
- Goffin V., Kelly P.A. (1996).* "Prolactin and growth hormone receptors". *Clin. Endocrinology*, 45:247-255.
- Goffin V., Ferrag F., Kelly P.A. (1998).* "Molecular aspects of prolactin and growth hormone receptors". In: *Advances in Molecular and Cellular Endocrinology*, edited by LeRoith D., London: JAI, p1-3.
- Gore A.C., Oung T., Yung S., Flagg R.A., Woller M.J. (2000).* "Neuroendocrine mechanisms for reproductive senescence in the female rats: gonadotropin hormone neurons". *Endocrine*, 13(3):315-323.
- Goth M.I., Lyons C.E.J., Ellwood M.R., Barret J.R., Thorner M.O. (1996).* "Chronic estrogen treatment in male rats reveals mammosomatotropes and allows inhibition of prolactin secretion by somatostatin". *Endocrinology*, 137:274-280.
- Gozlan H., Daval G., Verge D., Spampinato U. (1990).* "Aging associated changes in serotonergic and dopaminergic pre and postsynaptic neurochemicals markers in the rat brain". *Neurobiol. Aging*, 11:437-449.
- Govoni S., Memo M., Sajari L., Spano P.F., Trabucchi M. (1980).* "Impairment of brain neurotransmitter receptors in aged rats". *Mech. Ageing Dev.*, 21(1):39-46.
- Green J.D., Harris G.W.(1947).*"The neurovascular link between the neurohypophysis and the adenohypophysis". *J.Endocrinology*, 5:136-147.
- Grossmann A., Rees L.H. (1983).* "The neuroendocrinology of opioid peptides". *Brain medicine Bulletin*, 39:83-88.

- Grosso D.S., Bressler R., Benson B. (1978).* "Circadian rhythm and uptake of taurine by the rat pineal gland". *Life Science*, 22(20):1789-1798.
- Gudelsky G.A., Nansel D.D., Porter J.C. (1980).* "Dopaminergic control of prolactin secretion in the aging male rat ". *Brain Res.*, 204:446-450.
- Guldner J., Schier T., Friens E., Colla M., Holsboer F., Steiger A. (1997).* "Reduced efficacy of growth hormone releasing in modulation sleep endocrine activity in the elderly". *Neurobiol. Aging*, 18(4):423-429.
- Guyton A.C. (1988a).* "Hormonas hipofisarias y su regulación por el hipotálamo". En: *Tratado de fisiología médica*, Ed. interamericana, 7ª edición, pp 876 -887.
- Guyton A.C. (1988b).* "Funciones de conducta del cerebro: sistema límbico, papel del hipotálamo y control de las funciones vegetativas del organismo". En: *Tratado de fisiología médica*, Ed. interamericana, 7ª edición, pp 673 -682.
- Hadjiivanova C., Zamdjieva S., Petkow V.V. (1992).* "Age-related changes in central and peripheral benzodiazepine binding sites". *Acta Physiol. Pharmacolol. Bulg.*, 18(19):17-20.
- Herlant M. (1964).* "The cells of the adenohypophysis and their functional significance". *Int. Rev. Cytol.*, 17:299-382.
- Hery M, Faudon M., Dusticier G., Hery F. (1982).* "Daily variations in serotonin metabolism in the suprachiasmatic nucleus of the rat: influence of oestradiol impregnation". *J.Endocrinol.*, 94(2):157-166.
- Hoffman G.E., Sladek J.R.Jr. (1980).* "Age-related changes in dopamine LHRH and somatostatin in the rat hypothalamus". *Neurobiol. Aging*, 1(1):27-37.
- Holl R.W., Hartman M.L., Veldhuis J.D., Taylor W.M., Thorner M.O. (1991).* "Thirty-second sampling of plasma growth hormone in man: correlation with sleep stages". *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 72:854.
- Horniekiewicz O. (1987).* "Neurotransmitter changes in human brain during aging". In: Govoni S., Battani F. (eds). *Modification of cell to cell signals during normal and pathological aging*. Berlin: Springer Verlag, pp:169-182.
- Horrobin D.F. (1977).* "Prolactin". *Annual Research Reviews*, vol 5.
- Howard G., Peng L, Hyde J.F. (1997).* "An estrogen receptor binding site within the human galanin gene". *Endocrinology*, 138:4649-4656.
- Hyde J.F., Moore J.P.J, Cai A. (1998).* "Galanin in normal and hyperplastic anterior pituitary cells. From pituitary tumor cells lines to transgenic mice". *Ann. NY Acad. Sci.*, 863:48-55.

- Ibata Y., Okamura H., Tanaka M., Tamada Y., Hayashi S., Iijima N., Matsuda T., Munexawa K., Takamata T., Hisa Y., Shigeyoshi Y., Amaya F. (1999).* “Functional morphology of the suprachiasmatic nucleus”. *Front Neuroendocrinol.*, 20(3):241-268.
- Inouye S.T., Kawamura H. (1979).* “Persistence of circadian rhythmicity in a mammalian hypothalamic “island” containing the suprachiasmatic nucleus”. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 76:5962-5966.
- Isakov A.V., Potin V.V., Svechnikova F.A., Iumatova T.D. (1986).* “Gonadotropic activity of the hypophysis and ovarian endocrine function in hyperprolactinemic amenorrhea”. *Problemy Endocrinology*, 32(1):32-35.
- Jarry H., Wise P.M., Leonhardt S., Wuttke W. (1999).* “Effects of age on GABA turnover specific hypothalamic areas in female rats”. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes*, 107(1):59-62.
- Johannsson G., Svenson J., Bengtsson B.A. (2000).* “Growth hormone and ageing”. *Growth horm. IGF Res.*, 10B:s25-30
- Kabayama Y., Kato Y., Murakami Y., Tanaka H, Imura H. (1986).* “Stimulation by  $\alpha$ -adrenérgic mechanisms of the secretion of growth hormone-releasing factor (GRF) from perfused rat hypothalamus”. *Endocrinology*, 119:432-434.
- Kadowaki J., Ku N., Oetting W.S., Walker A.M. (1984).* “Mammotroph autoregulation: uptake of secreted prolactin and inhibition of secretion”. *Endocrinology*, 114:2060-2067.
- Kaiser G.G., Sinowatz F., Palma G.A. (2001).* “Effects of growth hormone on female reproductive organs”. *Anat. Histol. Embryol.*, 30(5):265-271.
- Kandel E.R., (1997).* “Motivación”. En: *Neurociencia y conducta*. Kandel E.R., Jessell T.M., Schwartz J.H. (eds). Prentice Hall, Madrid, pp:653-670.
- Kaneda H., Tanimoto K., Shintani T., Kakigi T., Maeda K. (1991).* “The effect of intracerebroventricular administration of somatostatin on prolactin and TSH release in the rat”. *Jpn J. Psychiatry Neurol.*, 45:903-907.
- Kasting N.W., Martín J.B., Arnold M.A. (1981).* “Pulsatile somatostatin release from the median eminence of the urethastized rat and its relationship to plasma growth hormone levels”. *Endocrinology*, 109(5):1739-1745.
- Katakami H., Arimura A., Frohman L.A. (1985).* “Hypothalamic somatostatin mediates the supresión of growth hormone secretion by centrally administered thyrotropin-releasing hormone in conscious rats”. *Endocrinology*, 117:1139-1144.
- Kato Y., Chiara K., Ohgo S., Iwasak Y., Abe H., Imura H. (1976).* “Growth hormone and prolactin release by substance P in rats”. *Life Science*, 19:441-446.

- Kawakami M., Arita J., Yoshioka E. (1980).* “Loss of estrogen-induced daily surges of prolactin and gonadotropins by suprachiasmatic nucleus lesions in ovariectomized rats”. *Endocrinology*, 106:1087-1092.
- Kawano H., Daikoku S. (1987).* “Functional topography of the rat hypothalamic dopamine neuron systems: retrograde tracing and immunohistochemical study”. *J. Comp. Neurol.*, 265:242-253.
- Klibanski A., Biller B.M.K., Rosenthal D.I., Schoenfeld D.A., Saxe V. (1988).* “Effects of prolactin and estrogen deficiency in amenorrheic bone loss”. *J. Clin. Endocrinology. Metab.*, 67:124-130.
- Kiss J., Csaky A., Halasz B. (1988).* “Demonstration of serotonergic axon terminals on somatostatin immunoreactive neurons of the anterior periventricular nucleus of the rat hypothalamus”. *Brain Res.*, 23(1):23-32.
- Kissinger P.T., Hart J.B., Adams R.N. (1973).* “Voltammetry in brain tissue-a new neurophysiological measurement”. *Brain Research*, 55(1):209-213.
- Kizer J.S., Zivin J.A., Jacobowitz D.M., Koplin L.J. (1975).* “The nyctohemeral rhythm of plasma prolactin: effects of ganglionectomy, pinealectomy, constant light, constant darkness of 6-OH-dopamine administration”. *Endocrinology*, 96:1230-1240.
- Klibanski A., Biller B.M.K., Rosenthal D.I., Schoenfeld D.A., Saxe V. (1988).* “Effects of prolactin and estrogen deficiency in amenorrheic bone loss”. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 67:124-130.
- Kolker D., Turek F. (2001).* “Circadian rhythms and sleep in aging rodents”. In *functional Neurobiology of Aging*. Edited by Hof P.R., Mobbs C.V. San Diego: Academic Press, pp: 869-882.
- Koulu M., Bjerlogrlic n., Agren H., Saavedra J.M., Potter W.Z., Linnoila M. (1989).* “Diurnal variation in the concentration of catecholamines and indolamines in the median eminence and in the intermediate and posterior lobes of the pituitary gland of the male rats”. *Brain Res.*, 503(2):246-252.
- Krey L.C., Bulter W.R., Knobil E. (1975).* “Surgical disconnection of the medial basal hypothalamus and pituitary function in the rhesus monkey I. Gonadotropin secretion”. *Endocrinology*, 96(5):1073-1083
- Krulich L., Coppins R.J., Giachetti A., McCann S.M., Mayfield M.A. (1980).* *Neuroendocrinology*, 30:133-138.
- Labunet's I.F. (2001).* “Age-related changes in circadian and circannual responses and the number of cells in lymphoid organs of animals: a possible connection to thymic factors”. *Fiziol.*, 47(5):54-62.
- Lafuente A., Marcó J., Esquifino A.I. (1993).* “Pulsatile prolactin secretory patterns throughout the oestrus cycle in the rat”. *Journal of Endocrinology*, 137:43-47.



- Lafuente A., Marcó J., Esquifino A.I. (1994).* “Opioids and the pulsatile prolactin pattern: Effects of hyperprolactinemia”. *Veterinary and Human Toxicology*, 36:524-528.
- Lafuente A., González-Carredo A., Romero A., Esquifino A.I. (2002).* “Effect of cadmium on 24-hour variations in hypothalamic norepinephrine, dopamine and serotonin contents in adult male rats”. *Exp. Brain Res.*, en prensa.
- Lai H.L., Yang T.H., Messing R.O., Ching Y.H., Lin S.C., Chern Y.J. (1997).* “Protein kinase C inhibits adenylyl cyclase type VI activity during desensitisation of the A2a-adenosine receptor-mediated camp response”. *J. Biol. Chem.*, 272:4970-4977.
- Lamberts S.W., MacLeod R.M. (1978).* “The interaction of the serotonergic and dopaminergic systems on prolactin secretion in the rat. The mechanism of action of the “specific” serotonin receptor antagonist, methysergide”. *Endocrinology*, 103:287-295.
- Langelier P., McCann S.M. (1977).* “The effects of interruption of the ventral noradrenergic pathway on the proestrous discharge of prolactin in the rat”. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 154:553-557.
- Lawson D.M., Gala R.R. (1975).* “The influence of adrenergic, dopaminergic, cholinergic and serotonergic drugs on plasma prolactin levels in ovariectomized, estrogen-treated rats”. *Endocrinology*, 96:313-318.
- Lee S.C., Shin S.H. (1996).* “Somatostatin does not inhibit prolactin synthesis in normal male rat pituitary cells but inhibits prolactin synthesis in estradiol-primed pituitary cells”. *J. Endocrinol.*, 148:69-76.
- Lee T.Y., Pan J.T. (2001).* “Involvement of central GABAergic neurons in basal and diurnal changes of tuberoinfundibular dopaminergic neuronal activity and prolactin concentration”. *Life Science*, 68(17):1965-1975.
- Leong D., Frawley L., Neill J. (1983).* “Neuroendocrine control of prolactin secretion”. *Annu. Rev. Physiol.*, 45:109-127.
- Lerant A., Freeman M.E. (1998).* “Ovarian steroids differentially regulate the expression of PRL-R in neuroendocrine dopaminergic neuron populations: a double label confocal microscopic study”. *Brain Res.*, 802:141-154.
- Liang S.L., Pan J.T. (2000).* “An endogenous serotonergic rhythm acting on 5HT(2A) receptors may be involved in the diurnal changes in tuberoinfundibular dopaminergic neuronal activity and prolactin secretion in female rats”. *Neuroendocrinology*, 72(1):9-11.
- Lin J.Y., Li C.J., Pan J.T. (1993).* “Effects of various neuroactive substance on single-unit activities of hypothalamic arcuate neuron in brain slice”. *Brain Res.*, 31(5):587-594.
- Liposits Z.S., Merchenthaler I., Paull W.K., Flerko B. (1988).* “Synaptic communications between somatostatinergic axons and growth hormone-releasing factor synthesizing neurons in the arcuate nucleus of the rat”. *Histochemistry*, 89:247.

- Lkhider M., Delpal S., Bousquet M.O. (1996).* “Rat prolactin in serum, milk and mammary tissue: characterization and intracellular localization”. *Endocrinology*, 137:4969-4979.
- Locatelli V., Cocchi D., Frigerio C., Betti R., Krogsgaard-Larsen P., Racagni g., Muller E.E. (1979).* “Dual  $\gamma$ -aminobutyric acid control of prolactin secretion in the rat”. *Endocrinology*, 105:778-785.
- Loeffler J., Kley N., Pittius C., Almedida O., Hollt V. (1986).* “In vivo and in vitro studies of GABAergic inhibition of prolactin biosynthesis”. *Neuroendocrinology*, 43:504-510.
- Login I.S. (1990).* “Direct stimulation of pituitary prolactin release by glutamate”. *Life Sci.*, 47:2269-2275.
- Lombardini J.B. (1976).* “Regional and subcellular studies on taurine in the central nervous system”. In: Huxtable A., Barbeau A (eds), *Taurine*. Raven Press., New York, pp311-326.
- López F.J., Dominguez J.R., Sánchez-Criado J.E., Negro-Vilar A. (1989).* “Distinct pulsatile prolactin secretion patterns during the estrous cycle, possible encoding for diverse physiological responses”. *Endocrinology*, 124:536-542.
- Lowry O.H., Rosebrough N., Farr A.L., Randall R.J. (1951).* “A protein measurement with the Folin reagent”. *J. Biol. Chem.*, 193:265-275.
- Lu K.H., Meites J. (1973).* “Effects of serotonin precursors and melatonin on serum prolactin release in rats”. *Endocrinology*, 93:152-155.
- Luboshitzky R. (2000).* “Endocrine activity during sleep”. *J. Pediatric Endocrinol. Metab.*, 13(1):13-20.
- Machado A., Cano J., Santiago M. (1986).* “The change with age in biogenic amines and their metabolites in the striatum of the rat “. *Arch. Gerontol. Geriatr.*, 5:333-342.
- MacLeod R.M. (1969).* “Influencie of norepinephrine and catecholamine-depleting agents on the synthesis and release of prolactin and growth hormone”. *Endocrinology*, 85:916-923.
- MacLeod R.M., Fontham E.H., Lehmaeyer J.E. (1970).* “Prolactin and growth hormone production as influenced by catecholamines and agents that affect brain catecholamines”. *Neruroendocrinology*, 6:283-294.
- Maeda K., Frohman L.A. (1980).* “Release of somatostatin and thyrotropin-releasing hormone from rat hypothalamic fragments in vitro”. *Endocrinology*, 106:1837-1842.

- Mai L.M., Shieh K.R., Pan J.T. (1994).* “Circadian changes of serum prolactin levels and tuberoinfundibular dopaminergic neuron activities in ovariectomized rats treated with or without estrogen: the role of the suprachiasmatic nuclei”. *Neuroendocrinology*, 60:520-526.
- Makinen M., Ahtee L., Rosengvist K., Toumeinen R.K., Mannisto P. (1993).* “Effects of intraventricular taurine, homotaurine and GABA on serum prolactin and thyrotropin levels in female and in male rats”. *J. Neural Transm. Gen. Sect.*, 94(3):155-163.
- Mallmann E.S., Ribeiro M.F., Spritzer P.M. (2001).* “Effects of serotonin depletion by p-chlorophenylalamine on serum prolactin levels in estrogen-treated ovariectomized rats; insights concerning the serotonergic, dopaminergic and opioid systems. *Horm. Metab. Res.*, 33(6):337-342.
- Marchalonis J.J. (1969).* “An enzyme method for the trace iodination of immunoglobulins and other proteins”. *The Biochemical Journal*, 113(2):299-305.
- Matsushita N., Kato Y., Shimatsu A., Katakami H., Yanaihara N., Imura H. (1983).* “Effect of VIP, TRH, GABA and dopamine on prolactin release from superfused rat anterior pituitary cells”. *Life Sci.*, 32:1263-1269.
- Mayo K.E., Godfrey P.A., Suhr S.T., Kulik D.J., Rahal J.O. (1995).* “Growth hormone-releasing hormone: synthesis and signalling”. *Rec. Prog. Hor. Res.*, 50:35.
- Mazzocchi G., Robba C., Rebuffat P., Nussendorfer G.G. (1986).* “Effects of prolactin administration on the zona glomerulosa of the rat adrenal cortex: Stereology and plasma hormone concentrations”. *Life Science*, 32:1263-1269.
- Meites J. (1967).* “Assay of prolactin and luteotropic effects”. *Arch. Anat. Microsc. Morphol. Exp.*, 56(3):401-412.
- Meites J., Huang H.H., Simpkins J.W. (1978).* “Recent studies on neuroendocrine control of reproductive senescence”. In: *The aging reproductive system*. Schneider E.L. (ed), pp:213-236.
- Meites J. (1982).* “Changes in neuroendocrine control of anterior pituitary function during aging”. *Neuroendocrinology*, 34:151-156.
- Meites J. (1991).* “Role of hypothalamic catecholamines in aging processes”. *Acta endocrinologica*, 125:98-103.
- Meek J.L., Bertilsson L., Cheney D.L., Zsilla G., Costa E. (1977).* “Aging induced change in acetylcholine and serotonin content of discrete brain nuclei”. *J. Gerontol.*, 32:129-131.
- Míguez J.M., Recio J., Sánchez-Barcelo E., Aldegunde M. (1998).* “Changes with age in daytime and nighttime contents of melatonin, indoleamines and catecholamines in the pineal gland: a comparative study in rat and Syrian hamster”. *J. Pineal Res.*, 25:106-115.

- Míguez J.M., Aldegunde M., Paz-Valiñas L., Recio J., Sánchez-Barceló E. (1999).* “Selective changes in the contents of noradrenaline, dopamine and serotonin in rat brain areas during aging”. *J. Neural Transm.*, 106:1089-1098.
- Mills D.E., Ward R.P. (1986).* “Effect of prolactin on blood pressure and cardiovascular responsiveness in the rat”. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 181 :3-8.
- Minors D.S., Waterhouse J.M. (1986).* “Circadian rhythms and their mechanisms”. *Experientia*, 42:1-11.
- Mol J.A., Van Garderen E., Selman T.J., Wolfswinkel J., Rijnberk A., Rutteman G.R. (1995).* “Growth hormone mRNA in mammary gland tumours of dogs and cats”. *J. Clin. Invest.*, 95:2028-2034.
- Monhankumar P.S., Mohankumar S.M., Quadri S.K., Voogt J.L. (1998).* “Responsiveness of tuberoinfundibular dopaminergic neurons to 5-hydroxytryptophan: effects of aging”. *Endocrine*, 9(1):33-37.
- Moore R.Y. (1999).* “Circadian Timing”. En: *Fundamental Neuroscience*. Zigmond M.J., Bloom F.E., Landis S.C., Roberts J.L., Squire L.R. (eds). “Academic Press, San Diego, pp: 1189-1206.
- Morimoto N., Kawakami F., Makino S., Chihara K., Hasegawa M., Ibata Y. (1988).* “Age-related changes in growth hormone-releasing factor and somatostatin in the rat hypothalamus”. *Neuroendocrinology*, 47:450.
- Moss R.L., Kelly M., Riskind P. (1975).* “Tuberoinfundibular neurons: dopaminergic and noradrenergic sensitivity”. *Brain Res.*, 89(2):265-277.
- Müller E.E., Celle S.G., Parenti M., Deghenghi R., Locatelli V., De Gennaro Colonna V., Torsello A., Cocchi D. (1995).* “Somatotropic dysregulation in old mammals”. *Horm. Res.*, 43(1-3):39-45.
- Müller E.E., Locatelli V., Cocchi D. (1999).* “Neuroendocrine control of growth hormone secretion”. *Physiological Reviews*, 79(2):511-606.
- Nagalo M., Kelly P.A. (1994).* “Tissue distribution and regulation of rat prolactin receptor gene expression. Quantitative analysis by polymerase chain reaction”. *J. Biol. Chem.*, 269:13337-13345.
- Nakagawa K., Ishizuka T., Obara T., Matsubara M., Akikawa K. (1987).* “Dichotomic action of glucocorticoids on growth hormone secretion”. *Acta Endocrinol.*, 116:165-171.
- Nakane P.K. (1970).* “Classification of anterior pituitary cell types with immunoenzyme histochemistry”. *J. Histochem. Cytochem.*, 18:9-21.
- Nansel D.D., Gudelsky G.A., Porter J.C. (1979).* “Subcellular localization of dopamine in the anterior pituitary gland of the rat: apparent association of dopamine with prolactin secretory granules”. *Endocrinology*, 105:1073.

- Negro-Vilar A., Ojeda S.R., Advis J.P., McCann S.M. (1979).* "Evidence for noradrenergic involvement in episodic prolactin and growth hormone release in ovariectomized rats". *Endocrinology*, 105:86-91.
- Neil J.D., Frawley L.S. (1983).* "Detection of hormone release from individual cells in mixed populations using a reverse hemolytic plaque assay". *Endocrinology*, 112:1135-1137.
- Neill J.D., Smith P.F., Luque E.H., Muñoz de Toro M., Nagy G., Mulchahey J. (1987).* "Detection and measurement of hormone secretion from individual pituitary cells". *Recent Progress in Hormone Research*, 43:175-180.
- Nelson W.Q., Gaunt R. (1936).* "Initiation of lactation in the hypophysectomized guinea pig". *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 34:671-673.
- Nelson R.J., Demas G.E., Klein S.L., Kriegsfeld L.J. (1995).* "The influence of season, photoperiod and pineal melatonin on immune function ". *J. pineal Res.*, 19(4):149-165.
- Nevalainen M.T., Valve E.M., Ingleton P.M., Nurmi M., Martikainen P.M., Harkonen P.L. (1997).* "Prolactin and prolactin receptors are expressed and functioning in human prostate". *J. Clin. Invest.*, 15(4):618-627.
- Nicholson S.A., Adrian T.E., Bacarese-Hamilton A.J., Gillhan B., Jones M.T., Bloom S.R. (1983).* "24-hour variation in content and release of hypothalamic neuropeptides in the rat". *Regul. Pept.*, 7(4):385-397.
- Nidolics K., Mason A.J., Szonyi E., Ramachandran J., Seeburg P.H. (1985).* "A prolactin inhibiting factor withing the precursor for human gonadotropin releasing hormone". *Nature*, 316:511-517.
- Noel G.L., Suh H.K., Frantz, A.G. (1974).* "Prolactin release during nursing and breasta stimulation in postpartum and nonpostpartum sujetcs". *J. Clin. Endocr. Metab.*, 38:413-423.
- Ondo J.G., Dom R. (1986).* "The arcuate nucleus: a site for g-aminobutyric acid regulation of prolactin secretion". *Brain Research*, 381:43-8.
- Pang S.F., Tang F., Tang P.L. (1984).* "Negative correlation of age and the levels of pineal melatonin, pineal N-acetylserotonin and serum melatonin in male rats". *J. Exp. Zool.*, 229:41-47.
- Parenti M., Dall'ara A., Rusconi L, Cocchi D., Müller E.E. (1987).* "Different regulation of growth hormone-releasing factor-sensitive adenylate-cyclase in the anterior pituitary of young and aged rats". *Endocrinology*, 121:1649.
- Parker D.C., Rossman L.G., Van Der Laan E.F. (1974).* "Relation of sleep-entrained human prolactin release to REM-nonREM cycles". *J.Clin. Endocrinol. Metab.*, 38:646-651.

- Pass K.A., Gondo J. (1977).* “The effects of gamma-aminobutyric acid on prolactin and gonadotropin secretion in the unanesthetized rat”. *Endocrinology*, 100:1437-1442.
- Patel Y.C., Srikant C.B. (1986).* “Somatostatin mediation of adenohipophyseal secretion”. *Annu. Rev. Physiol.*, 48:551-567.
- Pazo D., Cardinali D.P., García-Bonacho M., Toso C.R., Esquifino A.I. (2000).* “Effect of melatonin treatment on 24-hour variations in hypothalamic serotonin and dopamine turnover during the preclinical phase of Freund’s adjuvant arthritis in rat”. *Biological Rhythms Research*, 31:202-211.
- Pazo D. (2002).* “Estudio cronobiológico del papel de la intervención simpática en la modulación de la respuesta inmunológica de los ganglios linfáticos submaxilares. Efecto de la melatonina. Tesis doctoral, Directora: Ana I. Esquifino.
- Pérez Méndez L.F., (1992).* “Neuropéptidos”. En: neurotransmisión y Endocrinología, Alfonso M., Andrade M.A., Durán R., García-Mayor R.V. (Eds), pp 31-38. Torculo, Santiago.
- Pittendrigh C.S. (1960).* “Circadian rhythms and the circadian organization of living system”. *Cold Spring Harbor Symposium. Quant. Biology*, 25:159-184.
- Pittendrigh C.S., Daan S. (1974).* “Circadian oscillations in rodents: A systematic increase of their frequency with age”. *Science*, 186: 548-551.
- Plotsky P. Vale W. (1985).* “Patterns of growth hormone-releasing factor and somatostatin secretion into the hypophyseal-portal circulation of the rat”. *Science*, 230:461.
- Poncet L., Pequirot J.M., Cottet-Emard J.M., Dalma Z.Y., Demoroy L. (1999).* “Altered daily rhythms of brain and pituitary indolamines and neuropeptides in long-term, hypoxia rats”. *Am. J. Physiolol.*, 277(1 Pt 2): R66-75.
- Popa G., Fielding U.(1930a).*”The vascular link between the pituitary and the hypothalamus.”*Lancet*, 2:238-240.
- Popa G., Fielding U. (1930b).*”A portal circulation from the pituitary to the hypothalamic region”. *J.Anat.*, 65:88-91.
- Pradhan S.N. (1980).* “Central neurotransmitters and aging”. *Life Sci.*, 26:1643-1656.
- Price M.T., Olney J.W., Mitchell M. V., Fuller T., Cicero T.J. (1978).* “Luteinizing hormone releasing action of N-methyl aspartate is blocked by GABA o taurine but not by dopamine antagonist”. *Brain Res.*, 158:461-465.
- Ratajczak H.V., Lange R.W., Sothern R.B., Hagen R.B., Vescei P., Wu J., Halberg F., Thomas P.T. (1992).* “Surgical influence on murine immunity and tumor growth: relationship of body temperature and hormones with splenocytes”. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 199 :432-440.

- Rawlings S. R., Hezareh M. (1996).* "Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)/vasoactive intestinal polypeptide receptors: actions on the anterior pituitary gland". *Endocr. Rev.*, 17:4-29.
- Rage f., Benyassi A., Arancibia S., Tapia-Arancibia L. (1992).* "Gamma-aminobutyric acid glutamate interactions in the control of somatostatin release from hypothalamic neurons in primary culture in vivo corroboration". *Endocrinology*, 130(2):1056-1062.
- Rehman H.V., Masson E.A. (2001).* "Neuroendocrinology of ageing". *Age Aging*, 30(4):279-287.
- Reichlin S. (1983).* "Somatostatin". *N. Engl. J. Med.*, 309:910.
- Reiter R.J. (1983).* "The role of light and age in determining melatonin production in the pineal gland". En: *The pineal and its endocrine role*. Axelrod J., Fraschini F., Velo G.P., Editor, pp:227-241.
- Reiter R.J. (1991).* "Pineal melatonin: Cell biology of its synthesis and of its physiological interactions". *Endocrine Reviews*, 12:151-180.
- Reuss S., Hermes B., Fuchs E., Hiemke C. (1999).* "Day-and night-time contents of monoamines and their metabolites in the medial preoptic area of the rat hypothalamus". *Neurosciences letters*, 266: 29-32.
- Reymond M.J., Arita J., Dudley C.A., Moss R.L., Porter. (1984).* "Dopaminergic neuron in the mediobasal hypothalamus of old rats: evidence for decrease affinity of tyrosine hydroxylase for substrate and cofactor". *Brain Res.*, 304(2):215-223.
- Rice R.W., Kroning J., Critchlow V. (1976).* "Sex differentes in the effects of surgical isolation of the medial basal hypothalamus on linear growth and plasma growth hormone in the rat". *Endocrinology*, 98(4): 982-990.
- Rodriguez Castañeda T. (2001).* "Ritmos circadianos y neurotransmisores: estudios en el cerebro de la rata despierta". Tesis doctoral. Director: Dr. Francisco Mora Teruel.
- Rodríguez-Gómez J.A., de la Roza C., Machado A., Cano J. (1995).* "The effect of age on the monoamines of the hypothalamus". *Mechanisms of Ageing and Development*, 77:185-195.
- Roth M. (1971).* "Fluorescence reaction for amino acids". *Anal. Chem.*, 43:880-882.
- Rozsahegyi G., Telegdy G., Lissak K. (1973).* "Diurnal changes in hypothalamic serotonin content and its correlation with adrenal function in the rat during the oestrus cycle". *Acta Physiol. Acad. Sci. Hung*, 94(2):125-131.
- Sacca L., Cittadini A., Fazio S. (1994).* "Growth hormone and the heart". *Endocrine Rev.*, 15:555.

- Sanvisens A. (1989).* “Ritmos y relojes biológicos: Introducción a la cronobiología”. Promociones y publicaciones universitarias, Barcelona.
- Said S.I., Porter J.C. (1979).* “Vasoactive intestinal polypeptide release into hypophysial portal blood”. *Life Science*, 24:227-230.
- Sakurai T., Seo H., Yamamoto. (1988).* “Detection of mRNA of prolactin and ACTH in clinically nonfunctioning pituitary adenomas”. *J. Neurosurg.*, 69:653-659.
- Scarbrough K., Wise P.M. (1991).* “Diurnal rhythmicity of norepinephrine activity associated with the estradiol stimulated luteinizing hormone surge: effect of age and long-term ovariectomy on hemispheric asymmetry”. *Biol. Reprod.*, 44(5):769-775.
- Schally A.V., Bowers C.Y., Redding T.W., Baret J.F. (1966).* “Isolation of thyrotropin releasing factor (TRF) from porcine hypothalamus”. *Biochem. Biophys Res. Commun.*, 25:165-169,
- Schally A.V., Arimura A., Kastin A.J. (1973).* “Hypothalamic regulatory hormones”. *Science*, 179:341-350.
- Scheibel J., Elsasser T., Ondo G. (1980).* “Stimulation of prolactin secretion by taurine, a neurally depressant amino acid”. *Neuroendocrinology*, 30:350-354.
- Schonbrunn, A. (1982).* “Glucocorticoids down-regulate somatostatin receptors on pituitary cells in culture”. *Endocrinology*, 110:1147-1154.
- Schwartz V., Gainer H. (1977).* “Suprachiasmatic nucleus; use of <sup>14</sup>C-labelled deoxyglucose uptake as a functional marker”. *Science*, 197:1089-1091.
- Schweiger H.G., Hartwig R., Schwiger M. (1986).* “Cellular aspects of circadian rhythms”. *Journal of Cellular Science Supplement*, 4:181-200.
- Segovia G., Del Arco A., Mora F. (1999).* “Effects of ageing on the interaction between glutamate, dopamine and GABA in striatum and nucleus accumbens of the awake rat”. *J. Neurochem*, 73(5):2063-2072
- Segovia G., Porrás A., Del Arco A., Mora F. (2001).* “Glutamatergic neurotransmission in aging: a critical perspective”. *Mech. Ageing Dev.*, 122(1):1-29.
- Seifert H., Perin M., Rivier J., Vale W. (1984).* “Binding sites for growth hormone-releasing factor on rat anterior pituitary cells”. *Nature*, 313:487-489.
- Selgas L., Arce A., Esquifino A.I., Cardinali D.P. (1997).* “Twenty-four hour rhythms of serum ACTH, prolactin, growth hormone and thyroid-stimulating hormone, and of median eminence norepinephrine, dopamine and serotonin, in rats injected with Freund’s adjuvant”: *Chronobiology International*, 14(3):253-265.
- Selgas L., Pazo D., Arce A., Esquifino A.I., Cardinali D.P. (1998).* “Circadian rhythms in adeno-hypophysial hormone levels and hypothalamic monoamine turnover in mycobacterial-adjuvant-injected rats”. *Biological Signals and Receptors*, 7:15-24.



- Shepard M.C., Kronheim S., Pimstone B.L. (1978).* “Stimulation by growth hormone of somatostatin release from the rat hypothalamus in vitro”. *Clin. Endocrinol.*, 9:583.
- Shibasaki T., Yamauchi N., Hotta M., Masuda A., Imaki t., Demura H., Ling N., Shizume K. (1986).* “In vitro release of growth hormone releasing factor from rat hypothalamus:effect of insulin-like growth factor I”. *Regul. Pep.*, 15:47-53.
- Shieh K.R., Chu Y.S., Pan J. T. (1997).*”Circadian change of dopaminergic neuron activity: effects of constant light and melatonin.”. *Neuronreport*, 8(9-10):2283-2287.
- Shieh K.R., Pan J.T. (1999).* “Stimulatory role of prolactin on the development of tuberoinfundibular dopaminergic neuron in prepuberal female rats: studies with cysteamine and somatostatin”. *J. Neuroendocrinology*, 11(12):907-917.
- Shin S.H., Reifel C.W. (1981).* “Adenohypophysis has a inherent property for pulsatile prolactin secretion”. *Neuroendocrinology*, 32,139.
- Shioiri T., Takahashi K., Yamada N., Takahashi S. (1991).* “Motor activity correlates negatively with free-running period, while positively with serotonin contents in SCN in free- running rats”. *Physiol. Behav.*, 49(4):779-786.
- Shoichiro I., Taiichiro O., Ken-ichi K., Hiroshi I (1988).* “Effect of taurine on growth hormone and prolactin secretion in rats: possible interaction with opioid peptidergic system”. *Life Science*, 43:807-812.
- Snyder J.M., Wilfonger W.W., Hymer W.C. (1976).* “Maintenance of separated rat pituitary mammothrophs in cell culture”. *Endocrinology*, 98:25-32.
- Simpkins J.W., Mueller G.P., Huang H.H., Meites J. (1977).* “Evidence for depressed catecholamine and enhanced serotonin metabolism in aging male rats: possible relation to gonadotropin secretion”. *Endocrinology*, 100:1672-1678.
- Simpkins J.(1984).* “Regional changes in monoamine metabolism in the aging constants estrous”. *Neurobiol. Aging*, 4: 3309-3314.
- Smriga M., Mori M., Torii K. (2000).* “Circadian release of hypothalamic norepinephrine in rats in vivo is depressed during early L-lysine deficiency”. *J. Nutrition*, 130(6):1641-1643.
- Sonntag W.E., Steger R.W., Forman L.J., Meites J. (1980).* “Decrease pulsatile release of growth hormone in old male rats”. *Endocrinology*, 107(6):1875-1879.
- Sonntag W.E., Boyd R.L., Booze R.M. (1990).* “Somatostatin gene expression in hypothalamus and cortex of aging male rats”. *Neurobiol. Aging*, 11:409.
- Spangelo B.L., Judd A.M., Isakson P.C. MacLeod R. M. (1989).* “Interleukin-6 stimulates anterior pituitary hormone release in vitro”. *Endocrinology*, 125:575-577.
- Spangelo B.L., MacLeod R.M., Isakson P.C. (1990).* “Production of interleukin-6 by anterior pituitary cells in vitro”. *Endocrinology*, 126(1):582-586.

- Spangelo B.L., Gorospe W.C. (1995).* “Role of the cytokines in the neuroendocrine-immune system axis”. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 16(1):1-22.
- Steger R.W., Bartke A., Goldman B.D. (1982).* “Alterations in neuroscience function during photoperiod induced testicular atrophy and recrudescence in the golden hamster”. *Biol. Reprod.*, 26(3):437-444.
- Steinbusch H.W.M. (1981).* “Distribution of serotonin-immunoreactivities in the central nervous system of the rat-cell bodies and terminals”. *Neuroscience*, 6:557-618.
- Stelle M.K., Negro-Vilar A., McCann S.M. (1980).* “Effect of central injection of bradykinin potentiating factor upon release of anterior pituitary hormones in ovariectomized female rats”. *Peptides*, 1:201-205.
- Strobl J.S., Thomas M.J. (1994).* “Human growth hormone”. *Pharmacological Rev.*, 46:1
- Sun Y.K., Xi Y.P., Fenoglio C.M. (1984).* “The effect of age on the number of pituitary cells immunoreactive to growth hormone and prolactin”. *Hum. Pathol.*, 15:169.
- Sun X., Dang J., Liu T., Borjigin J. (2002).* “Circadian 5HT production regulated by adrenergic signalling”. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2:99(7):4686-4691.
- Takahara J., Yunoki S., Hosogi H., Yakushiji W., Yamauchi J., Hosaga H., Ofuji T. (1980).* “Stimulatory effects of gamma-aminohydroxybutyric acid (GABOB) on growth hormone, prolactin, cortisol release in man”. *Horm. Metab. Res.*, 12:31-34.
- Takahashi J.S. (1995).* “Molecular neurobiology and genetics of circadian rhythms in mammals”. *Annual Reviews of Neuroscience*, 18:531-553.
- Tamaki M., Sato M., Matsubar S., Wada Y., Takahara J. (1996).* “Dexamethasone increases growth hormone (GH)-releasing hormone (GRH) receptor mRNA levels in cultured rat anterior pituitary cells”. *J. Neuroendocrinol.*, 8:475-480.
- Tannebaum G.S., Martin J.B. (1976).* “Evidence for an endogenous ultradian rhythm governing growth hormone secretion in the rat”. *Endocrinology*, 98(3):562-570.
- Tannebaum G.S., Ling N. (1984).* “The interrelationship of growth-hormone (GH) releasing factor and somatostatin in generation of the ultradian rhythms of GH secretion”. *Endocrinology*, 115:1952-1957.
- Tapaz M.L., Wassef M., Oertel W.H., Paut L., Pujol J.F. (1983).* “Light and electron-microscopic immunocytochemistry of glutamic acid decarboxylase (GAD) in the basal hypothalamus: morphological evidence for neuroendocrine  $\alpha$ -aminobutyrate (GABA)”. *Neuroscience*, 9:271-287.
- Tapaz M.L. (1984).* “GABA and anterior pituitary function: anatomical data”. *Psychoneuroendocrinology*, 9:85-95.
- Tellería J.L. (1987).* “Distribución en el espacio y en el tiempo “. En: *zoología evolutiva de los vertebrados. Síntesis*, Madrid, pp: 145-155.

- Thakore J.H., Dinan T.G. (1994).* “Growth hormone secretion: the role of glucocorticoids”. *Life Sci.*, 55: 1083-1099.
- Theill L.E., Karin M. (1993).* “Transcriptional control of GH expression and anterior pituitary development”. *Endocrine Rev.*, 14:670.
- Thienhaus O.J., Zemlan F.P., Bienenfeld D., Hartford J.T., Bosman H.B. (1987).* “Growth hormone to edrophonium in Alzheimer’s disease”. *Am. J. Psychiatry*, 144(8):1049-1052.
- Thorell J.I., Johansson B.G. (1971).* “Enzymatic iodination of polypeptides with <sup>125</sup>I to high specific activity”. *Biochem Biophys Acta*, 251:363-369.
- ThyagaRajan S., Monhankumar P.S., Quadri S.K. (1995).* “Cyclic changes in the release of norepinephrine and dopamine in the medial basal hypothalamus: Effects of ageing”. *Brain Res.*, 689(1): 122-128.
- Timmernan W., Poelman R.T., Westeink B.H., Schuiling G.A.(1995).*”Semicircadian rhythm of dopamine release in the mediobasal hypothalamus in awake rats during pseudopregnancy evidence that a thyrotropin-releasing hormone analogue stimulate dopamine release and thereby inhibits prolactin secretion”. *Neuroendocrinology*, 62(5):434-443.
- Tolis G. (1977)* “Galactorrhoea-amenorrhoea and hyperprolactinemia; pathophysiological aspects and diagnostic tests”. *Clin. Endocr.*, 6:815-897.
- Tougard C., Tixier-Vidal A. (1994).* “Lactotropes y gonadotropes. In: *The physiology of Reproduction*”. Edited by Knobil E. and Neill J. New York: Raven, 1711-1747.
- Tuomisto J., Mannisto P. (1985).* “Neurotransmitter regulation of anterior pituitary hormones”. *Pharmacol. Rev.*, 37:249-332.
- Tresguerres J.A.F., Esquifino A.I., Oriol Bosch A. (1981a).* “Interaction between prolactin and gonadotropin secretion”. *Reproductive processes and contraception*. Mc Kerns KN (eds), Plenum Press, New York, pp 421.
- Tresguerres J.A. F., Esquifino A.I., Pérez-Mendez L.F., López-Caleron A. (1981b).* “Possible role of prolactin in the inhibitory effect of estradiol on the hypothalamic-pituitary-testicular”. *Endocrinology*, 108: 83-87.
- Tresguerres J.A.F., Esquifino A.I. (1983).* “Posibles mecanismos de interacción entre gonadotropinas y prolactina en un modelo de hiperprolactinemia experimental”. *Acta Physiologica Latinoamericana*, 33:257-274.
- Tresguerres J.A.F. (1999).* “Fisiología Humana”. MacGraw-Hill- Interamericana de España, S.A.U.
- Tresguerres J.A.F., Aguilar E., Devesa J., Monero B.(2000).* “Tratado de endocrinología básica y clínica”. Editorial Síntesis S.A., Madrid.,139-162.

- Vale W., Rivier C., Brazeau P., Guillemin R. (1974). "Effects of somatostatin on the secretion of thyrotropin and prolactin". *Endocrinology*, 95:968-977.
- Van Carter E., Copinschi G. (2000). "Interrelationships between growth hormone and sleep". *Growth horm. IGF Res.*, 10B:57-62
- Van den Pol A.N., Tsujimoto K.L. (1985). "Neurotransmitters of the hypothalamic suprachiasmatic nucleus: Immunocytochemical analysis of 25 neuronal antigens". *Neuroscience*, 15: 107-114.
- Velkeniers B., Hooghe-Peters E.L., Hooghe R., Belayew A., Smets G., Claeys A., Robberecht P., Vanhaelst L. (1988). "Prolactin cell subpopulations separated on discontinuous percoll gradient: an immunocytochemical, biochemical and physiological characterization". *Endocrinology*, 123: 1619-1630.
- Venero J.L., De la Roza C., Machado A., Cano J. (1993). "Age-related changes on monoamine turnover in hippocampus of rats". *Brain Res.*, 631:89-96.
- Vicent S.R., Hokfelt T., Wu J.Y. (1982). "GABA neuron systems in hypothalamus and pituitary gland. Immunohistochemical demonstration using antibodies against glutamate decarboxylase". *Neuroendocrinology*, 34:117-125.
- Vijayan E., McCann S.M. (1979). "In vivo effects of substance P and neurotensin on gonadotropin and prolactin release". *Endocrinology*, 105:64-68.
- Villanúa M.A., Tresguerres J.A.F., Esquifino A.I. (1987). "Changes in plasma and gonadotropin levels over 24 hours in normal and pituitary grafted male and female rats". *Endocrinol.*, 34:153-157.
- Villanúa M.A., Tresguerres J.A.F., Esquifino A.I. (1988). "Effect of pituitary graft-induced hyperprolactinemia on adrenal circadian rhythmicity". *Chronobiology international*, 5:337-343.
- Villanúa M.A., Agrasal C., Tresguerres J.A.F., Vaughan M.K., Esquifino A.I. (1989). "Melatonin effects on prolactin secretion in pituitary grafted male rats". *Journal Pineal Research*, 6:33-41.
- Wallace D.R., Dawson R. Jr. (1990). "Decreased plasma taurine in aged rats". *Gerontology*, 36:19-27.
- Wang Z.P., Man S.Y., Tang F. (1993). "Age-related changes in the contents of neuropeptides in the rat brain and pituitary". *Neurobiol. Aging*, 14(6):529-534.
- Watanabe M., Ueno Y., Yajima T., Iwano Y., Tsuchiya M., Ishikawa H., Aiso S., Hibi T., Ishii H. (1995). "Interleukin-7 is produced by human intestinal epithelial cells and regulates the proliferation of intestinal mucosal lymphocytes". *J. Clin. Invest.*, 95(6):2945-2953.

- Weigent D.A., Baxter J.B., Wear W.E., Smith L.R., Bost K.L., Blalock J.E. (1988).* “Production of immunoreactive growth hormone by mononuclear leukocytes”. *FASEB J.*, 2:2812.
- Weinert D. (2000).* “Age-dependent changes of the circadian system”. *Chronobiology Int.*, 17(3):261-283.
- Wiersma J., Kastelijn J. (1990).* “Electrophysiological evidence for a key control function of the medial preoptic area in the regulation of prolactin cycling, pregnant and lactating rats”. *Neuroendocrinology*, 51:162-167.
- Willoughby J.O., Menadue M.F., Liebelt H. (1987).* “Activation of serotonin receptors in the medial basal hypothalamus stimulated growth hormone secretion in the unanesthetized rat”. *Brain Res.*, 204(1-2):319-322.
- Wynick D., Hammond P.J., Akinsanya K.O., Bloom S.R. (1993).* “Galanin regulates basal and oestrogen-stimulated lactotroph function”. *Nature*, 364:529-532.
- Wise P.M. (1982).* “Alterations in the proestrous pattern of median eminence LHRH, serum LH, FSH, estradiol and progesterone concentrations in middle-aged rats”. *Life Sci.*, 31(2):165-173.
- Wise P.M. (1987).* “The role of the hypothalamus in aging of the female reproductive system”. *J. Steroid Biochem.*, 27(4-6):713-719.
- Wise P.M. (1994).* “Nathan Shock Memorial Lecture 1991. Changing neuroendocrine function during aging: impact on diurnal and pulsatile rhythms”. *Exp. Gerontol.*, 29(1):13-19.
- Wong C.C., Dohler K.D., Atkinson M.J. (1983).* “Circannual variations in serum concentrations of pituitary, thyroid, parathyroid, gonadal and adrenal hormones in male laboratory rats”. *J.Endocrinol.*, 97:179-85.
- Yamauchi N., Shibasaki T., Ling N., Demura H. (1991).* “In vitro release of growth hormone-releasing factor (GRF) from the hypothalamus: somatostatin inhibits GRF release”. *Regul. Pep.*, 33:71-78.
- Yamauchi K., Murakami Y., Kosimura K., Nishiki M., Tamaka J., Kato Y. (1996).* “Involvement of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in growth hormone secretion by serotonergic mechanisms in the rat”. *Endocrinology*, 137(5):1693-1697.
- Yen S.S.C., Hoff J.D., Lasley B.L., Casper R.F., Sheehan K. (1980).* “Induction of prolactin release by LRF and LRF agonist”. *Life Science*, 26:1963-1967.
- Yoshimoto K., Kato B., Ueda S., Noritake K., Sakai K., Shibata M., Hori M., Kawano H., Takeuchi Y., Wakabayashi Y., Yasuhara M. (2001).* “Dopamine and serotonin uptake inhibitors on the release of dopamine and serotonin in the nucleus accumbens of young and aged rats”. *Mechanisms of Ageing and Development*, 122:1707-1721.