



# **Universidad Austral de Chile**

Facultad de Ciencias  
Escuela de Química y Farmacia

**PROFESOR PATROCINANTE:** Dr. Leopoldo Ardiles A.  
**INSTITUTO:** Medicina.  
**FACULTAD:** Medicina.

**PROFESOR COPATROCINANTE:** Dra. Sara Rodríguez C.  
**INSTITUTO:** Histología y Patología.  
**FACULTAD:** Medicina.

**“INFLUENCIA DE LA PINEALECTOMÍA Y LA ADMINISTRACIÓN DE  
MELATONINA SOBRE LA PRESIÓN ARTERIAL EN RATAS SPRAGUE DAWLEY”**

Tesis de Grado presentada como  
parte de los requisitos para optar  
al Título de Químico Farmacéutico.

**FRANCISCO JAVIER OYARZÚN RODRÍGUEZ**

VALDIVIA – CHILE  
2005

*A Dios, a mis queridos padres  
y a mi hermana.*

## *Agradecimientos:*

*A mi madre y a mi padre por todo el cariño y amor que me han dado y por la oportunidad y el sacrificio que han significado darme una educación. A mi hermana por todo el apoyo y todo lo que me ha enseñado, por haberme inspirado a estudiar esta carrera y por ser la mejor hermana mayor que Dios pudo darme.*

*Quisiera dar las gracias de manera muy especial al Doctor Leopoldo Ardiles, por darme la oportunidad de realizar mi tesis con él, por enseñarme tantas cosas y por ayudarme en todo lo que fuera posible, por la paciencia y por hacernos sentir parte del equipo desde el primer día y hacerme comprender que soy capaz de alcanzar los objetivos trazados.*

*Quiero dar las gracias especialmente a la Doctora Sara Rodríguez por enseñarme tantas cosas durante esta tesis y por incentivar me junto con mis padres el amor por la ciencia y por ser fuente de inspiración para llegar a ser tan bueno en mi trabajo como ellos.*

*Además quisiera agradecer a todos los docentes del Instituto de Farmacia en especial a profesores como el Doctor Humberto Dölz, a las profesoras Carin Åkesson, Annemarie Nielsen y Eliana Sánchez por enseñarme lo hermosa que es esta carrera y a aprender de todo el cuerpo docente lo importante que es ser Químico Farmacéutico y la labor social que esto implica y agradecer también a todos los docentes y funcionarios del Instituto de Histología y Patología, por prestarme sus dependencias para ejecutar mis experimentos.*

*A todas aquellas personas que me ayudaron en realizar la parte práctica y teórica de mi tesis, en especial a Fernando Gaete, pues su colaboración fue vital para llevar a cabo algunos experimentos y a Fernando Loyola quien me enseñó todo lo referente al manejo del equipo doppler.*

*A mis familiares y mis amigos Ada, Anita María, Alex, Alejandra, Jeannette, Mirna, Antonia, Carolina y Natalia, Iván, Macarena, Marcia, Paulina, Yerlinne y Yohanna, gracias por brindarme su amistad y estar conmigo incluso en los momentos más difíciles, no habría sido lo mismo recorrer este largo camino sin ustedes. En especial quisiera dar gracias a mi primo Jorge por ser como un hermano para mí y por acompañarme a la universidad durante algunas mediciones de presión arterial.*

*Quisiera dar las gracias a don Alfredo por toda la ayuda en la observación de los animales. De manera especial quisiera dar las gracias por todo lo que don Manuel Navarro me enseñó a cerca de los animales y por ser siempre tan buena persona.*

*Además quisiera agradecer a todo el equipo del Laboratorio de Nefrología del Hospital Clínico Regional de Valdivia, por toda la ayuda y los consejos que me dieron.*

*Por último quiero dar las gracias a todas las personas involucradas en mi práctica hospitalaria en especial a las Doctoras Gloria Muñoz, Lily Acuña y Mónica Kyonen. Además a la Doctora Paola Espinoza y todo el equipo con quien realice mi práctica profesional.*

## ÍNDICE

RESUMEN.....	2
SUMMARY.....	3
INTRODUCCIÓN.....	4
MATERIAL Y MÉTODOS.....	18
RESULTADOS.....	24
DISCUSIÓN.....	33
CONCLUSIONES.....	43
ANEXOS.....	44
BIBLIOGRAFÍA.....	48

## **1. RESUMEN**

Los niveles humanos de presión arterial (PA) siguen un ritmo circadiano propio, siendo más bajos en la noche que en el día. La melatonina es una hormona producida y secretada por la glándula pineal durante los períodos de oscuridad. Melatonina es la principal hormona pineal y se está utilizando en pacientes humanos con diversos propósitos, entre ellos como antioxidante. Con el objeto de demostrar la participación de la melatonina endógena en la regulación de la PA, se midió la presión arterial sistólica (PAS) con un manguito en la cola usando un detector ultrasónico de flujo doppler en ratas Sprague-Dawley, mantenidas a temperatura constante con un ciclo de 12 horas luz/oscuridad, alimentadas con pellet normosódico y acceso libre al agua. Las ratas normales mostraron niveles de PA significativamente más bajos a las 02:00 h ( $128,4 \pm 3,79$  mmHg) comparado con los obtenidos a las 18:00 h ( $134,9 \pm 4,0$  mmHg),  $p < 0,05$ . La extracción quirúrgica de la glándula pineal indujo un aumento significativo en la PA, y pérdida de las variaciones día / noche ( $156,6 \pm 9,2$  mmHg a las 02:00 h y  $152,4 \pm 8,9$  mmHg a las 18:00 h),  $p < 0,05$ . La administración de melatonina por 4 semanas después de la pinealectomía (30 mg/kg en agua potable), indujo una disminución gradual de la PA, ( $130,4 \pm 0,7$  mmHg a las 02:00 h y  $133,1 \pm 2,9$  mmHg a las 18:00 h) de la 4ª semana, sin observarse recuperación del deep nocturno. Estos resultados sugieren que: (i) la glándula pineal puede tener un rol en las variaciones circadianas fisiológicas de la PA, (ii) la administración crónica de dosis farmacológicas de melatonina podría afectar el ritmo circadiano de la PA.

## **2. SUMMARY**

The human levels of the arterial blood pressure (BP) follow a characteristic circadian rhythm, being lower at night. Melatonin is a hormone produced and secreted by the pineal gland during darkness periods. At the moment, melatonin is being used in human patients with diverse purposes. With the aim to demonstrate the participation of the endogenous melatonin in the regulation of the BP, the systolic arterial pressure (SBP) was measured with a sleeve in the tail using an ultrasonic detector of the doppler flow in Sprague-Dawley rats, kept at constant room temperature, with a cycle of 12 hours light/dark, fed with normosodic pellet and free access to water. Normal healthy rats demonstrated levels of the SBP perceptibly lower at 02:00 h ( $128.4 \pm 3.79$  mmHg) compared with the obtained at 18:00 h ( $134.9 \pm 4.0$  mmHg). Surgical extraction of the pineal gland induced a significant increase in the SBP, without changes in light/dark period ( $156.6 \pm 9.2$  mmHg to 02:00 h and  $152.4 \pm 8.9$  mmHg to the 18:00 h). The administration of melatonin for 4 weeks after the pinealectomy (30 mg/kg in tap water), induced a gradual diminution of the SBP, ( $130.4 \pm 0.7$  mmHg to 02:00 h and  $133.1 \pm$  mmHg to the 18:00 h) at the 4<sup>th</sup> week, but no recovery of nocturnal deep was observed. These results suggest that: (i) the pineal gland can play a role in the physiological circadian variations of the SBP, by effect of the melatonin; (ii) the chronic administration of pharmacological doses of melatonin can affect the circadian rhythm of the PA.

### **3. INTRODUCCIÓN**

La **Presión Arterial (PA)** se define como la fuerza ejercida por la sangre contra cualquier área de la pared arterial. La presión arterial es controlada por el “gasto cardíaco” y la “resistencia periférica”, por lo que podríamos representarla de la siguiente forma:

$$PA = \text{Gasto Cardíaco} \times \text{Resistencia Periférica}$$

$$\text{Gasto Cardíaco} = \text{Frecuencia} \times \text{Volumen Sistólico}$$

El volumen sistólico depende de la fuerza de contracción del corazón y del retorno venoso. El retorno venoso a su vez depende de la actividad de las venas y el volumen sanguíneo. La resistencia periférica depende fundamentalmente del estado de contracción de las arteriolas.

La presión arterial es controlada por una gran cantidad de mecanismos, que podemos clasificar en: i) Control nervioso, ii) Control local y iii) Control humoral de la presión arterial

#### **Control nervioso de la Presión Arterial:**

El efecto de la regulación nerviosa de la PA es mediado principalmente por adrenalina y acetilcolina aunque otros neurotransmisores también son importantes, como por ejemplo serotonina e histamina (Houssay, 2000).

## **Control local de la Presión Arterial:** (Autorregulación del Flujo Sanguíneo)

### **Oxido Nítrico:**

Formado a partir de la L-Arginina, es un radical libre que se forma de manera continua en las células endoteliales por acción enzimática de la oxido nítrico sintetasa endotelial produciendo relajación del músculo liso vascular, natriuresis por vasodilatación renal y disminución de la reabsorción de sodio en el túbulo. Su disminución genera vasoconstricción de las arteriolas aferentes y eferentes del glomérulo renal (Houssay, 2000).

### **Eicosanoides:** ( *Prostaglandinas, Tromboxanos, Leucotrienos y Epoxiácidos* )

Son sintetizados a partir de ácidos grasos esenciales poliinsaturados (AGEPI), siendo el más abundante en el ser humano el ácido araquidónico (AA). A partir de ellos se sintetizan los eicosanoides que pueden ser: prostaglandinas, tromboxano A, leucotrienos y epoxiácidos (Houssay, 2000).

La PGE<sub>2</sub> es vasodilatadora, diurética y natriurética; la PGI<sub>2</sub> o prostaciclina es vasodilatadora, antiagregante y desagregante plaquetaria; en cambio las PGG<sub>2</sub>, PGH<sub>2</sub> y la PGF<sub>2</sub> $\alpha$  poseen acción vasoconstrictora. El tromboxano A<sub>2</sub> es vasoconstrictor y agregante plaquetario y los leucotrienos actúan como vasoconstrictores (Houssay, 2000).

## **Control humoral de la Presión Arterial**

**Catecolaminas Suprarrenales:** El 80% de las catecolaminas secretadas por la médula suprarrenal corresponde a adrenalina y el 20% a noradrenalina. Su participación en la regulación de la PA se realiza por medio de los receptores  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  y

$\beta_2$  adrenérgicos; la acción vasoconstrictora es mediada por los receptores  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$  mientras que la acción vasodilatadora, capaz de generar hipotensión y aumento del flujo en el músculo esquelético, es mediado por el receptor  $\beta_2$ .

**Serotonina:** La 5-hidroxitriptamina tiene un efecto vasoconstrictor, pero en determinadas áreas genera vasodilatación a dosis bajas. Se origina mayoritariamente de la síntesis y secreción de las células enterocromafines del tracto gastrointestinal y una pequeña parte a partir de las neuronas aminérgicas del SNC. La serotonina se encuentra en un nivel muy bajo en la sangre ya que está de manera inactiva dentro de las plaquetas, por lo que cumple un papel preponderante en casos de tromboembolismo donde las plaquetas liberan serotonina durante el proceso de coagulación (Houssay, 2000).

**Vasopresina:** Es sintetizada en las neuronas magnocelulares de los núcleos paraventricular y supraópticos y es transportada hasta la hipófisis posterior donde se almacena y posteriormente se libera a la circulación general. Genera vasoconstricción arteriolar y venosa a concentraciones suprafisiológicas. Su función principal es la mantención del balance hídrico ya que ejerce su acción sobre los epitelios de los túbulos renales distales y sobre el túbulo colector haciéndolos más permeables al agua (Houssay, 2000).

**Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona:** Es el mecanismo humoral más importante para el control cardiovascular. La renina (enzima proteolítica de 41 kDa y vida media de 60 min.) se elabora a partir de la prorenina en las células yuxtglomerulares que se localizan en la pared de la arteriola aferente a su entrada en el glomérulo renal. La renina posee un sustrato, el angiotensinógeno, una glicoproteína

sintetizada en el hígado que pertenece a la familia de las  $\alpha$ -2 globulinas plasmáticas, que al ser hidrolizado por la renina libera un decapeptido llamado angiotensina I (ANG I) con débil efecto presor y que es hidrolizado por una enzima de la membrana de las células endoteliales, *la Enzima Convertidora de Angiotensina (ECA)*, generando el octapeptido angiotensina II (ANG II), una de las sustancias vasoconstrictoras más potentes. La ANG II es inactivada por una serie de peptidasas (angiotensinasas) generando Angiotensina III cuya potencia vasoconstrictora un 50 % menor que la ANG II. Es capaz de estimular la secreción de aldosterona la que produce retención de sodio y agua con el consiguiente aumento del gasto cardíaco (Houssay, 2000; Guyton 2001; Berne 1996).

El control a largo plazo de la presión arterial se lleva a cabo mediante el efecto vasoconstrictor generalizado que genera angiotensina II sobre arteriolas y capilares produciendo un aumento en la resistencia vascular periférica total y además, por una acción directa sobre el riñón, provocando una retención de sodio y agua. Esto hace que aumente el volumen sistólico, el retorno venoso, y por tanto, el gasto cardíaco. Angiotensina II estimula la corteza suprarrenal provocando un aumento en la secreción de aldosterona, esto ocasiona a nivel del túbulo contorneado distal un intercambio de sodio por potasio y con esto la retención de agua, con el consiguiente aumento del gasto cardíaco (Infomed 1998; <http://www.sld.cu/libros/hiperten/desarrollo.html>).

Otro factor que potencia el mecanismo renal es la excitación o inhibición del sistema simpático, el que una vez estimulado es capaz de aumentar o disminuir el flujo renal, con la consiguiente estimulación del sistema renina – angiotensina - aldosterona y la

puesta en marcha de los diferentes procesos hemodinámicos ya analizados (Infomed 1998; <http://www.sld.cu/libros/hiperten/desarrollo.html>).

### **Sistema Calicreína-Cininas:**

Las evidencias indican que las irregularidades en este sistema pueden tener importancia en la patogenia de la hipertensión arterial. Las calicreínas son proteasas de serina que actúan sobre sustratos proteicos, los cininógenos, para liberar péptidos biológicamente activos denominados cininas. Existen dos variedades de calicreinas: una glandular que se halla en los riñones, glándulas sudoríparas, páncreas, glándulas salivales e intestinos y otra llamada calicreína plasmática o también conocida como "Factor de Fletcher" que constituye un importante mediador de la inflamación y de la coagulación sanguínea (Nefrored <http://nefrored.edu.bo/hormonas2.htm#Sistema>)

En el plasma podemos encontrar cininógeno de alto y bajo peso molecular como también en plaquetas y neutrófilos.

La Calicreína, es una enzima sintetizada a partir de precalicreina que actúa sobre el cininógeno de bajo peso molecular para dar origen a la calidina (lisilbradicinina) y sobre el cininógeno de alto peso molecular para generar bradicinina; ambos productos son inactivados por las cininasas I y la cininasa II (Enzima Convertidora de Angiotensina). Estas cininas, que poseen un potente efecto vasodilatador, producen incremento en la liberación de histamina, aumento de la permeabilidad vascular, disminución de la resistencia periférica y por lo tanto disminución de la presión arterial (Elghozi, 1988).

## **Ritmo Circadiano de la Presión Arterial**

La existencia de un patrón circadiano de la presión arterial se conoce desde hace tiempo, pero fue descrita de manera detallada en los años 70, tras el registro intrarterial ambulatorio continuo de la presión arterial en individuos normales como hipertensos. Se ha observado un patrón cíclico de 24 horas paralelo en las actividades de diversos parámetros fisiológicos, como frecuencia cardíaca, actividad del sistema nervioso simpático y adhesividad plaquetaria.

La presión arterial sigue un ritmo circadiano estrechamente asociado al ciclo sueño / vigilia. Por la noche se produce una caída entre 10 - 20 % con respecto a los valores diurnos; por la mañana se experimenta un aumento notable coincidente con el despertar y el inicio de la actividad, y en las horas de vigilia se observan amplias oscilaciones de la presión arterial que podrían estar asociadas a las condiciones ambientales.

Aunque no se ha establecido aún una relación directa, puede plantearse la posibilidad de que la elevación de la presión arterial de primera hora de la mañana sea uno de los factores desencadenantes de los episodios cardiovasculares agudos.

La existencia de dispositivos de monitorización ambulatoria de la presión arterial (MAPA) automáticos y no invasivos ha permitido determinar de manera segura y cómoda la presión arterial a lo largo de un período de 24 horas. Las observaciones intraarteriales iniciales de (Millar-Craig y col 1978) han sido validadas por estudios con MAPA, que han mostrado un patrón circadiano bien definido y reproducible de la presión arterial en la mayor parte de individuos.

El patrón circadiano de la presión arterial se mantiene en los pacientes con hipertensión esencial, aunque se aprecia un desplazamiento de la curva de presión hacia arriba durante todo el período de 24 horas, en comparación con los individuos normotensos, y la amplitud del ritmo puede estar alterada. Adicionalmente, algunos pacientes con hipertensión no presentan reducción nocturna normal de la presión arterial. Estos individuos, a los que a veces se describe como "nondippers", son importantes clínicamente porque tienden a presentar una lesión más grave de los órganos diana que los demás individuos hipertensos, pudiendo ello deberse a que su valor medio global de presión arterial durante las 24 horas es superior.

Normalmente la PA desciende durante la noche, fenómeno que está preservado en la mayoría de los pacientes hipertensos. El descenso nocturno de la PA promedio ha llevado a varios autores a categorizar los pacientes en 2 grupos: i) los que presentan una caída menor al 10% respecto a la PA promedio diurna (*non-dippers*), ii) y los que presenta una caída mayor al 10% durante la noche («*dippers*»).

Además, según diferentes estudios aporta argumentos para afirmar que la presión de pulso es un elemento adicional para precisar el riesgo cardiovascular de los pacientes hipertensos. De acuerdo a un planteamiento reciente, los sujetos hipertensos con mayor riesgo cardiovascular, serían aquellos que, además de hipertensión arterial diagnosticada con la monitorización ambulatoria de la presión arterial (MAPA), son «*non-dippers*» y/o tienen una presión de pulso promedio en 24 horas >53 mmHg.

(Michael A. Weber 2002; MC-NAB M, Paul y col. 2005)

### **Presión arterial y frecuencia cardíaca**

La presión arterial (PA) y la frecuencia cardíaca (FC) siguen un ritmo circadiano que está estrechamente asociado al ciclo de sueño-vigilia. Por la noche, durante el reposo, se produce una disminución importante de la PA y la FC (Mulicahy D y col, 1988; Portaluppi F y col, 1997).

La PA y la FC varían constantemente a lo largo del período de sueño. Durante los estadios más profundos (3 y 4 no-REM) se observan valores más bajos, mientras que en los estadios menos profundos (1 y 2 no-REM) y en el sueño REM se observan valores de PA y FC más elevados, pero aun así, más bajos que los que se observan durante el día (Portaluppi F y col, 1997).

La PA y la FC aumentan de manera brusca en las primeras horas de la mañana, coincidiendo con la hora del despertar (Mora J y col, 1987), sugiriendo que es consecuencia del inicio de la actividad física (Athanassiadis D y col, 1969; Mancina G y col, 1983). Este aumento parece ser gradual y suave en los jóvenes y más acentuado en las personas mayores. Esta diferencia podría depender de las características estructurales y funcionales de las arterias, más rígidas y menos distensibles a medida que la edad avanza. Las variaciones de la PA y la FC durante el día parecen estar relacionadas con la actividad física y mental o con factores ambientales y situaciones de estrés (Suzuki Y y col, 1993).

Los estudios realizados en personas que cambian frecuentemente de turno de trabajo sugieren que los perfiles circadianos de PA y FC se ven afectados fundamentalmente por las condiciones ambientales y por el sistema nervioso simpático más que por los ritmos circadianos endógenos (Sundberg S y col, 1988). La PA y la FC se sincronizan

estrechamente con los niveles de actividad y los horarios de trabajo. Se ha demostrado que el cambio del perfil circadiano de la PA y la FC ocurre rápidamente, alrededor de 24 horas después del cambio de turno. No obstante, no se puede descartar totalmente la existencia de un ritmo circadiano intrínseco para la PA y la FC en los seres humanos, que podría estar enmascarado por las múltiples influencias externas (Sundberg S y col, 1988; Baumgart P y col, 1989).

De hecho, en las ratas en las que se secciona el núcleo supraquiasmático se suprime el ritmo circadiano de la PA y la FC sin afectar al ciclo sueño-vigilia y a los ciclos de actividad motora. Los factores responsables de las variaciones de la PA y la FC en los períodos sueño-vigilia son principalmente el sistema nervioso simpático y las catecolaminas adrenomedulares y otros sistemas presores como el eje renina-angiotensina-aldosterona, la vasopresina, etc. Asimismo diversos mecanismos de regulación neuroendocrinos pueden tener un importante papel en la variación circadiana global de la PA y la FC, aunque su importancia en el reajuste de estas variables queda aún por establecer (Cugini P y col, 1980; Lightman SL y col, 1981).

En la hipertensión arterial se puede modificar, en cierta medida, el perfil circadiano de la PA. Así, diferentes formas de hipertensión pueden mostrar patrones circadianos distintos entre sí y al de los sujetos normotensos. En normotensos y en hipertensos esenciales generalmente se observa una caída de la presión arterial durante la noche, mientras que en ciertas formas de hipertensión secundaria (enfermedad de Cushing) el ritmo de la PA está abolido casi hasta en el 70% de los casos, e incluso en algunos pacientes los niveles más altos de PA se presentan durante la noche. Este aspecto tiene una gran relevancia para las consecuencias de la propia hipertensión,

independientemente de su origen, ya que la pérdida de la caída normal de presión arterial por la noche parece acompañarse de una mayor afectación orgánica en el corazón, cerebro, vasos y riñón (Cugini P y col, 1989; Middeke M y col, 1994; Lemmer B y col, 1997).

## **Melatonina**

### Características químicas:

N – Acetil – 5 – metoxitriptamina; N – [2-(5 – Metoxiindol – 3 – il) – etil ] acetamida.

$C_{13}H_{16}N_2O_2 = 232.3$  gramos / mol.

C 67.22 % ; H 6,94 % ; N 12.06 % ; O 13.78 % ( Martindale 2002).

### Solubilidad:

Agua..... 0,1 mg / ml.

0,1 N NaOH..... 0,2 mg / ml.

0,1 N HCl..... 0,8 mg / ml.

Etanol..... 8 mg / ml ( SIGMA 2002 – 2003 ).

### Estructura: (ver anexo; figura N°1)

La melatonina es una hormona producida por la glándula pineal (ver anexo, figura N°2), que está situada por encima del techo del diencéfalo en el extremo posterior del tercer ventrículo. Es un pequeño receso del tercer ventrículo, recubierto de epéndimo, que emite un corto tallo que une su cuerpo con el techo del diencéfalo. La glándula está constituida por células parenquimatosas en un 85 % y un 15 % restante de células gliales y terminaciones nerviosas. En las células parenquimatosas conocidas también como pinealocitos, se produce serotonina la que se transforma posteriormente en melatonina (Houssay, 2000).

**Biosíntesis de Melatonina:** La Melatonina es producida a partir de serotonina (5-hidroxitriptamina), siendo ésta generada por la hidroxilación del triptófano produciéndose 5- hidroxitriptófano y luego por descarboxilación es transformado a 5- hidroxitriptamina (serotonina) por medio de la L- aminoácido-aromático-descarboxilasa. Una parte de la serotonina es oxidada por la mono amino oxidasa (MAO) a ácido 5- hidroxiindolacético, otra porción es captada por las terminaciones simpáticas de la glándula y el resto es N- acetilado en el pinealocito a N- acetilserotonina por la serotonina- N- acetiltransferasa (SNAT). La N- acetilserotonina es metoxilada a N- acetil- 5- metoxitriptamina por la enzima Hidroxiindol- oximetiltransferasa (HIOMT); las etapas limitantes de la síntesis de melatonina depende de las enzimas SNAT y HIOMT ( ver anexo, figura N°2) (Florez J., 1997; Houssay, 2000; Goodman & Gilman, 2001; Katzung 2005).

La actividad de la glándula pineal en mamíferos es dependiente de los períodos de luz / oscuridad llamados ciclos circadianos pineales. El haz de luz retinohipotalámico lleva la señal luminosa al núcleo supraquiasmático del hipotálamo que es el reloj biológico y desde allí la señal es transmitida hacia el núcleo paraventricular del tálamo, al hipotálamo lateral, formación reticular y a células del asta intermedio lateral de la parte superior de la médula dorsal donde se encuentran las neuronas preganglionares que llegan al ganglio cervical superior y finalmente a la glándula pineal (Houssay, 2000).

**Secreción de Melatonina:** La Melatonina se secreta a la sangre y al líquido cefalorraquídeo en una concentración plasmática que va desde los 10 a 300 pgrs / ml, observándose su mayor peak en la época prepubertad. Su circulación en el torrente sanguíneo es unida a la albúmina.

La melatonina posee un patrón circadiano de secreción, baja de día y alta de noche. Esta última coincide con un peak nocturno de baja de la presión arterial. Tanto su concentración en sangre, LCR, orina y saliva exhibe ritmos circadianos, peak nocturno y bajos niveles diurnos.

**Farmacocinética:** La melatonina exógena se absorbe bien por vía oral, distribuyéndose uniforme y rápidamente por todos los fluidos del organismo. Es rápidamente biotransformada, siendo su principal metabolito el sulfato 6-hidroxilado, el cual se elimina por vía urinaria. (Florez J., 1997; Goodman & Gilman, 2001; Katzung 2005). La hormona atraviesa la barrera hematoencefálica y placentaria.

**Farmacodinámica:** La melatonina ejerce su acción por medio de receptores de membrana conocidos como MT1 y MT2 cuya expresión se regula dependiendo de la cantidad de Melatonina circulante.

Estos receptores están distribuidos de la siguiente manera:

Receptor	Ubicación	Inhibición AMP <sub>c</sub>
MT1	Cerebro: hipotálamo, NSQ, pars tuberalis, cerebelo. Ovario: cuerpo lúteo. Testículo: células de Leydig y células germinales. Zona cortical de glándula adrenal y Páncreas endocrino.	SI
MT2	Cerebro: hipocampo. Ojo: retina. Testículo: células de Leydig y células germinales. Zona medular de glándula adrenal. Páncreas endocrino. <b>Riñón: zona vascular yuxtglomerular.</b>	SI
MT3	Cerebro y riñón de hamster.	-

(Paul P y col 1999; Guerra M 2004; Kato K. y col 2005 ).

### **Recientes evidencias de la posible acción de Melatonina sobre la PA**

Evidencias experimentales han permitido postular la participación de melatonina en la regulación de la presión arterial. La administración de melatonina durante 6 semanas en el agua de bebida (*10mg / 100 ml*) a ratas espontáneamente hipertensas (SHR) indujo una significativa reducción en los niveles tensionales, comparados con controles SHR no tratados (Nava y col, 2003).

En el Instituto de Histología y Patología de la Facultad de Medicina de la Universidad Austral de Chile, al realizar un estudio sobre la presencia de receptores de Melatonina MT1 y MT2 en distintos órganos de rata (riñón, testículo, tiroides y otros), con técnicas de inmunocitoquímica, se pudo localizar una fuerte inmunoreactividad para el receptor MT2 en células ubicadas en el polo vascular del corpúsculo renal. Se sabe que estas células yuxtaglomerulares secretan renina. Es muy razonable entonces relacionar la melatonina, y específicamente estos receptores MT2, con la renina y por medio de este mecanismo postular una influencia sobre la regulación de la presión arterial. Es probable que las acciones específicas de melatonina se den a nivel de los receptores MT1 y MT2.

## **RESUMEN DE LOS ANTECEDENTES Y PROPUESTA DE LA HIPOTESIS**

- La secreción de melatonina está muy aumentada durante la noche. (Guerra M, Rodríguez E. resultados aún no publicados).
- Se ha descrito una relación inversa entre los niveles de melatonina y presión arterial, de manera tal que cuando ocurre el peak de melatonina en la noche la presión arterial está mas baja (Nava y col, 2003).
- En un estudio preliminar realizado en el Instituto de Histología y Patología de la UACH, se han demostrado la presencia de receptores a Melatonina del tipo MT2 en las zona yuxtglomerular vascular del riñón de rata (Guerra M, Rodríguez E. resultados aun no publicados)

De acuerdo a los antecedentes recientemente expuestos hemos propuesto la siguiente

### **Hipótesis:**

***“Los niveles sanguíneos de melatonina de origen pineal, inducen cambios en la presión arterial”***

### **Objetivo General:**

“Investigar la relación de la glándula pineal y su principal producto de secreción, la melatonina, sobre la presión arterial”.

### **Objetivos Específicos**

- 1.- Conocer los valores de la presión arterial en distintos momentos del ritmo circadiano en ratas normales.
- 2.- Estudiar el efecto de la pinealectomía sobre la presión arterial en ratas.
- 3.- Estudiar los efectos de la administración exógena de melatonina en ratas pinealectomizadas.

#### **4. Material y Método**

El modelo experimental se realizó utilizando 20 ratas machos de la cepa Sprague Dawley de 4 semanas de edad y entre 140-170 gramos de peso corporal. Estas ratas fueron obtenidas del Bioterio del Instituto de Histología y Patología de la Facultad de Medicina de la Universidad Austral de Chile. Las ratas permanecieron con un ciclo luz-oscuridad de 12:12 horas, alimentación normosódica y agua “*ad libitum*”.

##### **Material Farmacológico:**

Melatonina M-5250 Sigma

Ketamina Base, Ketostop

Pacifor (Acepromazina Maleato 1%)

##### **Material Quirúrgico**

##### **Material para medir la Presión Arterial**

Equipo Ultrasonido Doppler modelo 811- B.

Gel para ultrasonido.

Esfingomanómetro y manguito inflable.

Calefactor eléctrico como fuente de calor.

Cubículo de inmovilización.

##### **Otros Materiales**

Jeringa.

Balanza Söehle.

Papel absorbente (Nova).

Guantes quirúrgicos.

## **4.1 Métodos**

### Determinación de la Presión Arterial mediante equipo Doppler

Para controlar la presión arterial de las ratas, estas debieron ser expuestas a un ambiente templado para generar una correcta vasodilatación. Luego fueron puestas en un cubículo donde quedaron inmobilizadas con la cola libre para poder efectuar la medición.

La presión arterial se midió con un esfigmomanómetro y un equipo de ultrasonido Doppler Modelo 811- B el cual detecta solo la presión sistólica (ver anexo, figura N°4).

#### *Fundamento del equipo Doppler:*

Este equipo emite ondas de ultrasonido que son dirigidas hacia el torrente sanguíneo; al llegar ahí, una pequeña parte de la energía es reflejada por los eritrocitos y retorna a una onda de diferente magnitud a la emitida por el equipo la que es captada por el transductor de señal y traducida por el equipo como un sonido semejante al de una máquina a vapor. Por lo tanto la intensidad del sonido va a depender de la diferencia entre la onda emitida y la onda recibida por el Doppler, siendo esta diferencia proporcional a la velocidad del torrente sanguíneo.

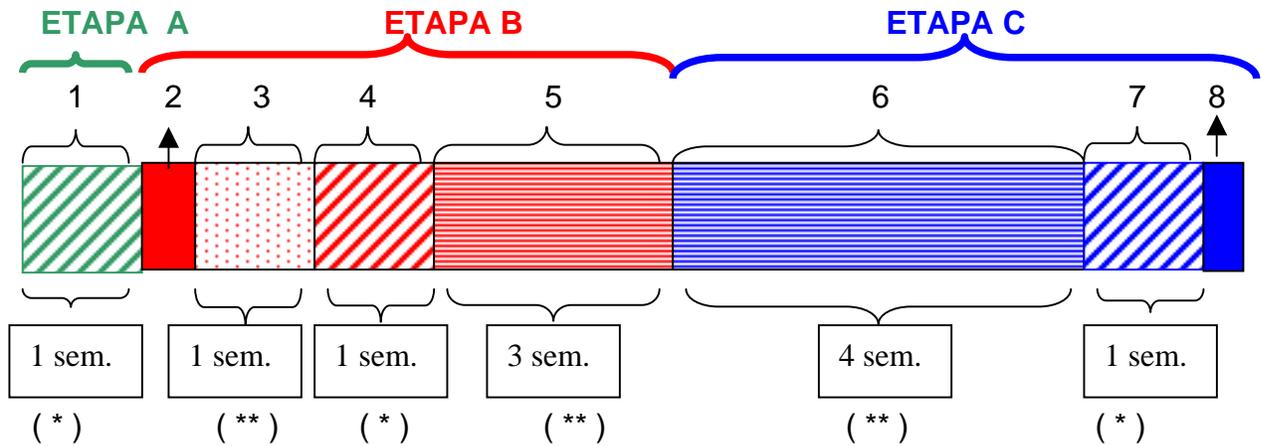
En suma, cuando comenzamos a insuflar el manguito llega un momento en que el flujo sanguíneo se detiene y el ruido desaparece, porque las frecuencias emitidas y recibidas son iguales ya que no hay movimiento sanguíneo. La presión sistólica corresponde entonces al momento en que desaparece el ruido al insuflar el manguito.

## Técnica de la Pinealectomía

La rata se anestesió con nembutal utilizando una dosis de 4,8 mg / 100 grs de peso corporal; luego se practicó una trepanación en el cráneo, que consistió en extraer un trocito de hueso de forma rectangular de más o menos 4 mm de largo por 3 mm de ancho. La extracción de este trozo de hueso dejó en evidencia el seno longitudinal superior, el cual se ligó en su porción anterior y luego en su porción posterior, para enseguida, con una tijera muy fina, cortar el seno venoso entre las dos ligaduras. Se levantó la liga caudal (con lo cual se levanta el seno longitudinal) y se visualizó la pineal, para extraerla con una pinza curva muy fina. Luego se colocó el hueso y se procedió a suturar. La rata volvió a su jaula donde siguió recibiendo comida y agua “*ad libitum*” (ver anexo figura N°5 ).

## 4.2 Diseño Experimental

Se utilizó ratas machos de la cepa Sprague Dawley las que fueron estudiadas en varias etapas.



- 1.- Ciclo circadiano basal.
- 2.- Pinealectomía y ratas Sham operated.
- 3.- Período de reposo.
- 4.- Ciclo circadiano post – Pinealectomía.
- 5.- Control de PA post – Pinealectomía.
- 6.- Control de PA post – Pinealectomía + Melatonina.
- 7.- Ciclo circadiano post – Pinealectomía + Melatonina.
- 8.- Día de sacrificio.

(\*) El control de la PA se realizó a las 18:00; 22:00; 02:00; 06:00; 10:00 y 14:00 horas.

(\*\*) El control de la PA se realizó a las 18:00 y 02:00 horas.

### **ETAPA A:**

Estudio del ritmo circadiano de la presión arterial normal. A las ratas se les midió la presión arterial cada 4 horas durante 3 días seguidos (18:00; 22:00; 02:00; 06:00; 10:00 y 14:00 horas). Terminado este período las ratas entraron a la siguiente etapa.

### **ETAPA B:**

Efecto de la pinealectomía sobre la presión arterial. Un grupo de ratas fue pinealectomizada, mientras que a otro grupo de animales se les realizó la cirugía pero sin extraer la glándula pineal; [ratas "sham operated" (Sham)]. Se les dejó reposar en sus jaulas durante una semana y a la semana siguiente se les registró el ritmo circadiano de la presión, siguiendo la metodología utilizada en la etapa A, hasta la 5ª semana post-pinealectomía. Terminado este período las ratas entraron a la siguiente etapa.

### **ETAPA C:**

Estudio del efecto de la administración exógena de melatonina. A las ratas se les administró melatonina 30 mg/kg de peso corporal en el agua de bebida durante cinco semanas. Se les midió la presión arterial a las 18:00 y 02:00 horas hasta la cuarta semana de tratamiento y a la quinta semana se le hizo un registro circadiano de la presión arterial siguiendo el modelo de la etapa A.

Terminadas las tres etapas, los animales fueron sacrificados bajo anestesia y exanguinización.

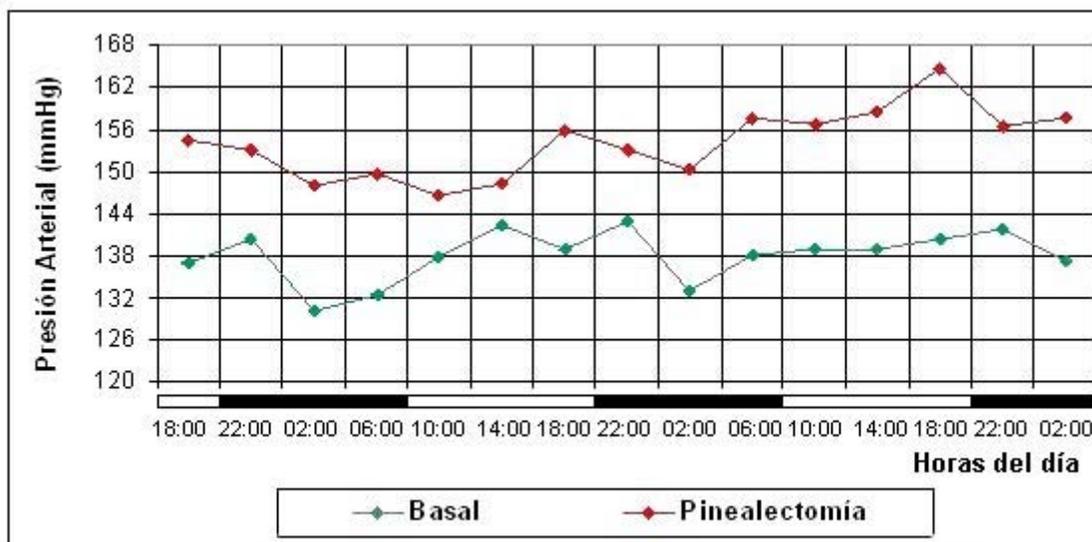
### **4.3 Procedimiento Estadístico**

Los datos obtenidos durante este estudio se expresaron como promedio con su respectiva desviación estándar. Para las comparaciones inter e intra grupos, se utilizaron tests estadísticos no paramétricos de Mann-Whitney y Wilcoxon. El nivel de significancia utilizado fue un valor de  $P < 0,05$ . Se utilizó el programa computacional de análisis GraphPad InStat versión 3.06, para Windows.

## 5. RESULTADOS

Mediante la medición de la presión arterial sistólica se realizaron ciclos circadianos basales, post-pinealectomía y post – pinealectomía + tratamiento con Melatonina 30 mg/kg.

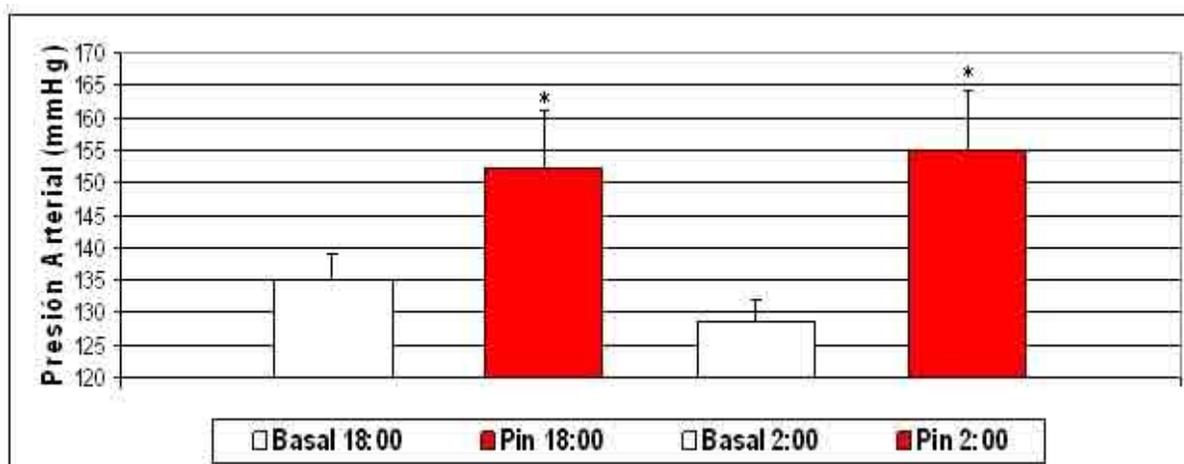
**Gráfico N° 1.** Ciclo Circadiano de la Presión arterial sistólica Basal y Post – pinealectomía.



La medición en condiciones basales mostró resultados significativamente más bajos a las 02:00 horas con valores promedio de  $(128,4 + 3,79 \text{ mmHg})$  comparados con aquellos encontrados a las 18:00 horas  $(134,9 + 4,0 \text{ mmHg})$  ( $p < 0,05$ ).

Una vez realizada la **pinealectomía** se observó una elevación significativa y persistente de la PA con pérdida del descenso nocturno tanto a las 02:00 como a las 18:00 horas  $(156,6 + 9,2 \text{ mmHg}$  a las 02:00 horas y  $152,4 + 8,9 \text{ mmHg}$  a las 18:00 horas) ( $p < 0,05$ ).

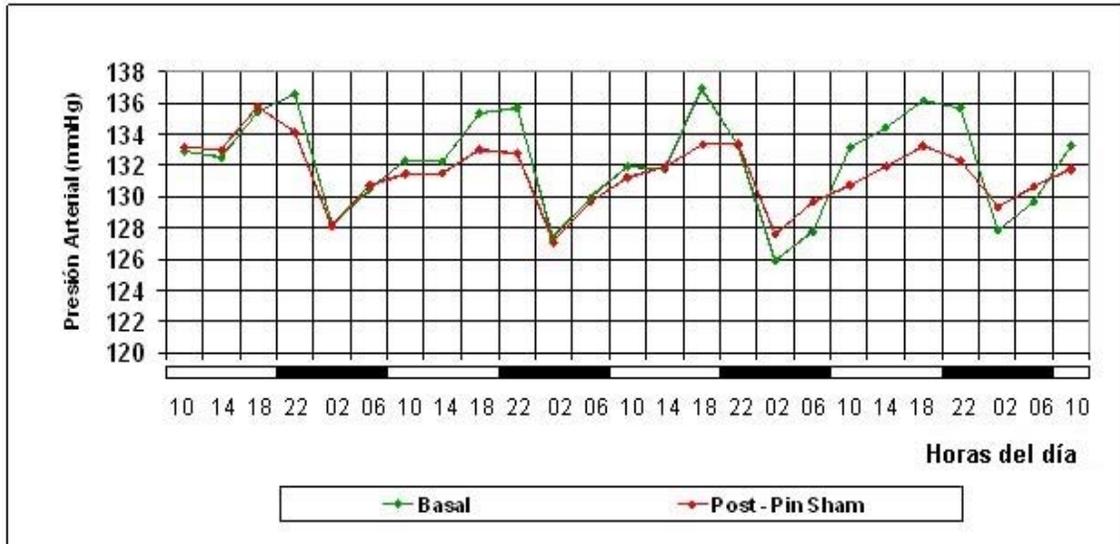
**Grafico N°2.** Comparación de la presión arterial sistólica a las 18:00 y 02:00 horas basal y post-pinealectomía.



\* basal comparado con post – pinealectomía ( $p < 0,0001$ ).

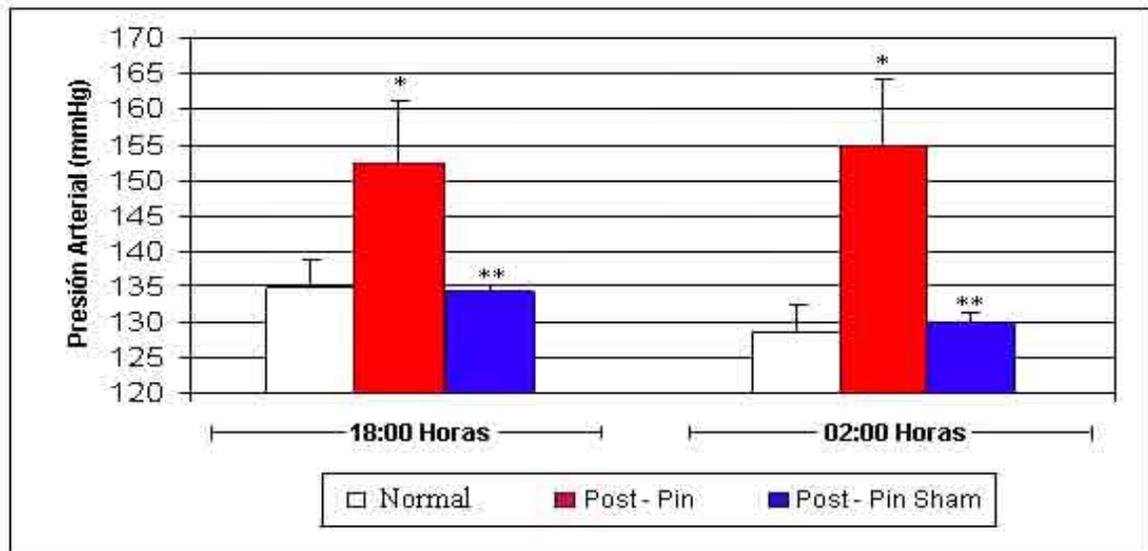
Una vez realizada la pinealectomía se puede ver un marcado ascenso en la PA tanto a las 18:00 como a las 02:00 horas, perdiéndose la diferencia observada entre estas.

**Gráfico N° 3.** Ciclo Circadiano de la Presión arterial sistólica en un grupo de ratas normales comparado con el obtenido después de la Pinealectomía Sham.



Se observa que, los registros obtenidos a las 02:00 horas (128,64 + 3,24 mmHg ) son significativamente más bajos que los obtenidos a las 18:00 horas (133,96 + 0,5 mmHg) en ambas condiciones. La falsa pinealectomía no modificó la PA, manteniéndose el ritmo circadiano observado sin cirugía.

**Grafico N° 4.** Comparación de la presión arterial sistólica en ratas normales, pinealectomizadas y sham.



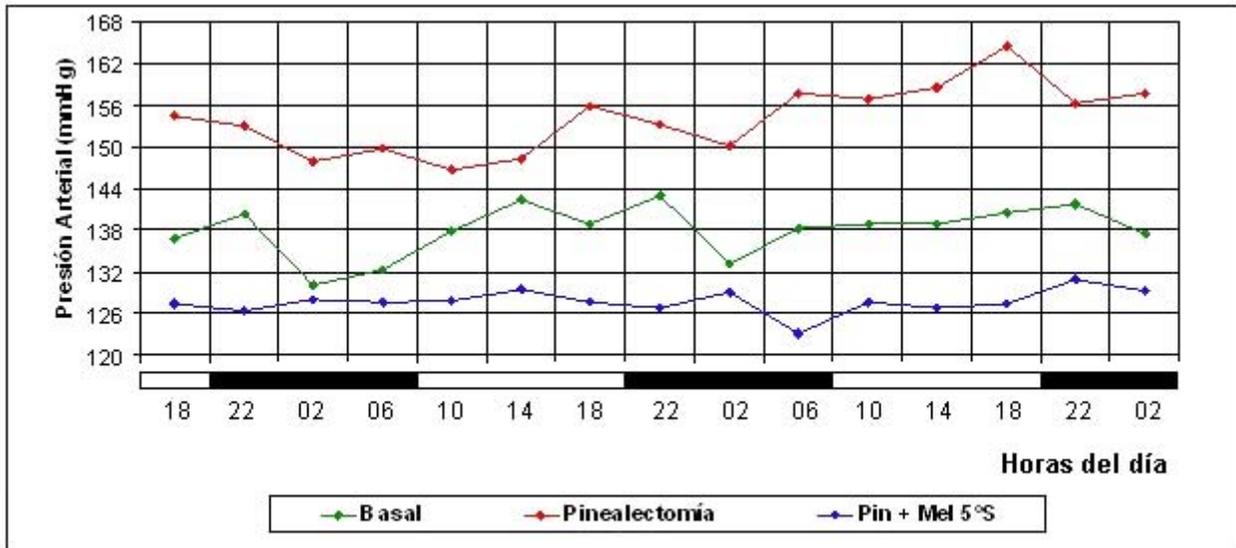
\* ( $p < 0,0001$ ) comparado con basal.

\*\* ( $p < 0,0001$ ) comparado con post - pinealectomía.

Los animales sham no muestran cambios en los niveles de PAS después del procedimiento, semejándose a los valores normales de PAS.

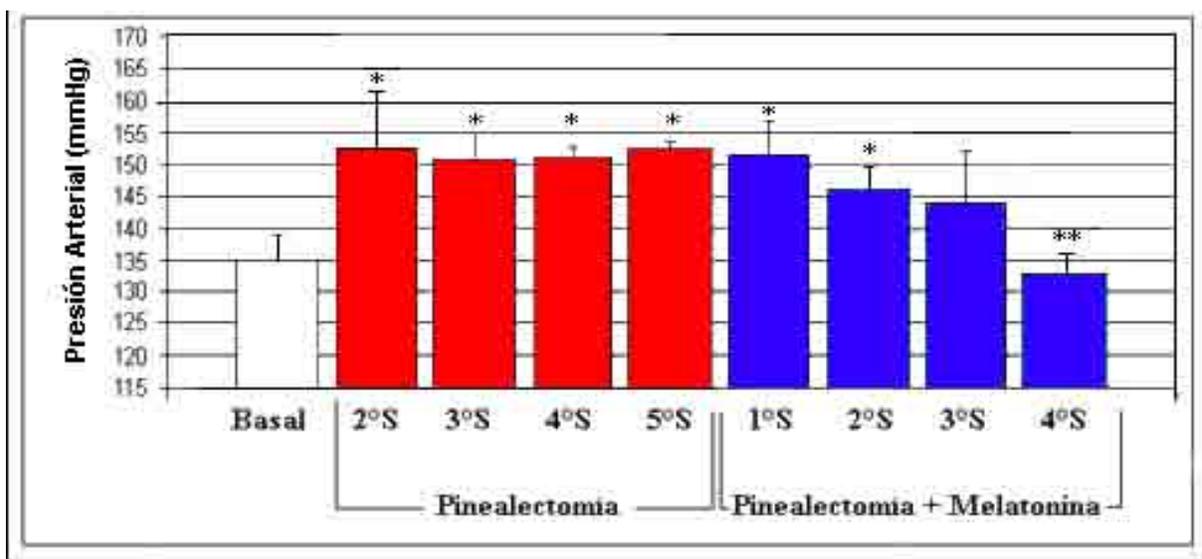
## Efecto del tratamiento con Melatonina

**Gráfico N°5.** Ciclo Circadiano de la Presión arterial sistólica Basal, Post – pinealectomía y post – pinealectomía + melatonina.



La administración de melatonina (30 mg/kg de peso) indujo un significativo descenso de la presión arterial, incluso por debajo de los niveles basales, pero sin recuperar el deep nocturno.

**Gráfico N°6.** Valores de presión arterial a las 18:00 horas en condiciones basales; 2°, 3°, 4° y 5° semana post – pinealectomía y 1°, 2°, 3° y 4° semana de tratamiento con melatonina 30 mg/ kg.

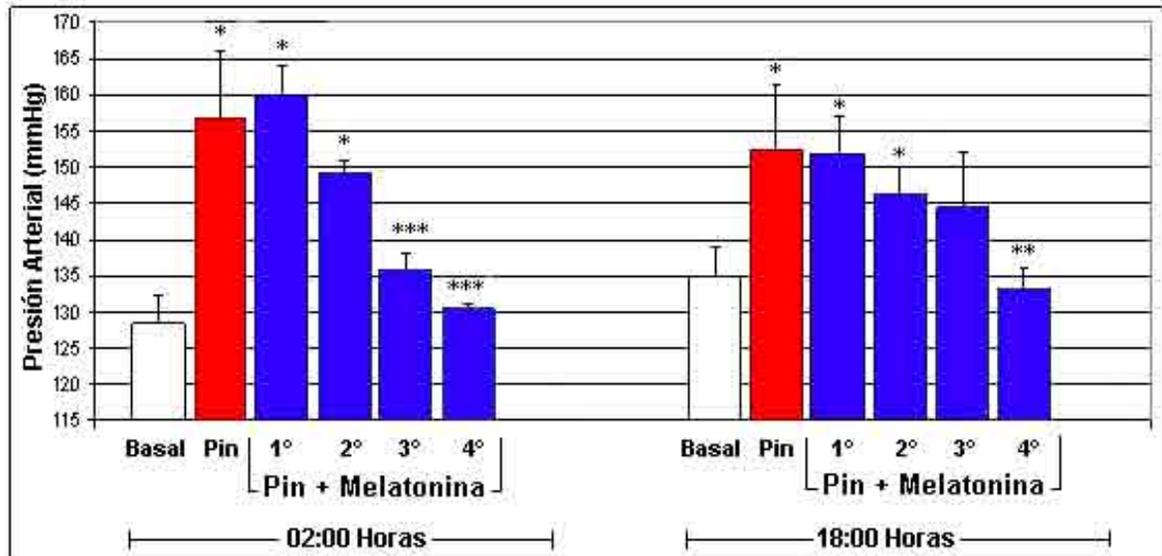


\* (p < 0,0001) comparado con basal.

\*\* (p < 0,0001) comparado con 2° Sem post – pinealectomía.

Al observar este gráfico podemos ver la diferencia significativa existente entre el registro basal y la 2° semana post-pinealectomía, manteniéndose el alza de la PAS durante las cinco semanas de observación post-pinealectomía. El descenso paulatino de la PA durante el tratamiento se asemeja a la PA basal ya desde la 3° semana, siendo a la 4° semana significativamente menor que cualquier valor registrado durante la post-pinealectomía.

**Gráfico N°7.** Presión arterial a las 02:00 y 18:00 horas en ratas normales; 2° semana post-pinealectomía y 1°, 2°, 3° y 4° semana de tratamiento con melatonina.



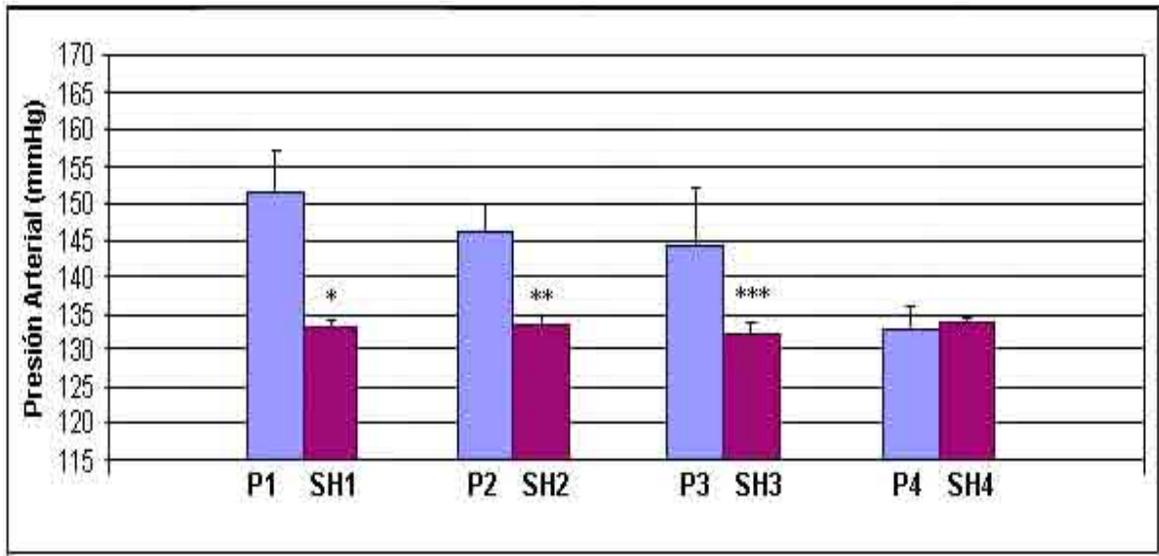
\* (p < 0,0001) comparado con basal.

\*\* (p < 0,0001) comparado con 2° Sem post-pinealectomía.

\*\*\* (p < 0,0044) comparado con 2° Sem post-pinealectomía.

Durante la etapa de tratamiento podemos observar la disminución progresiva de la PA volviéndose esta significativa a la 3° semana de tratamiento a las 02:00 horas y durante la 4° semana a las 18:00 horas, asemejándose al final del tratamiento, en ambos horarios, a la PA basal.

**Gráfico N°8** Efecto del tratamiento con melatonina, en ratas pinealectomizadas y sham a las 18:00 horas, semanas 1-4.



P: Ratas pinealectomizadas  
Sh: Ratas sham

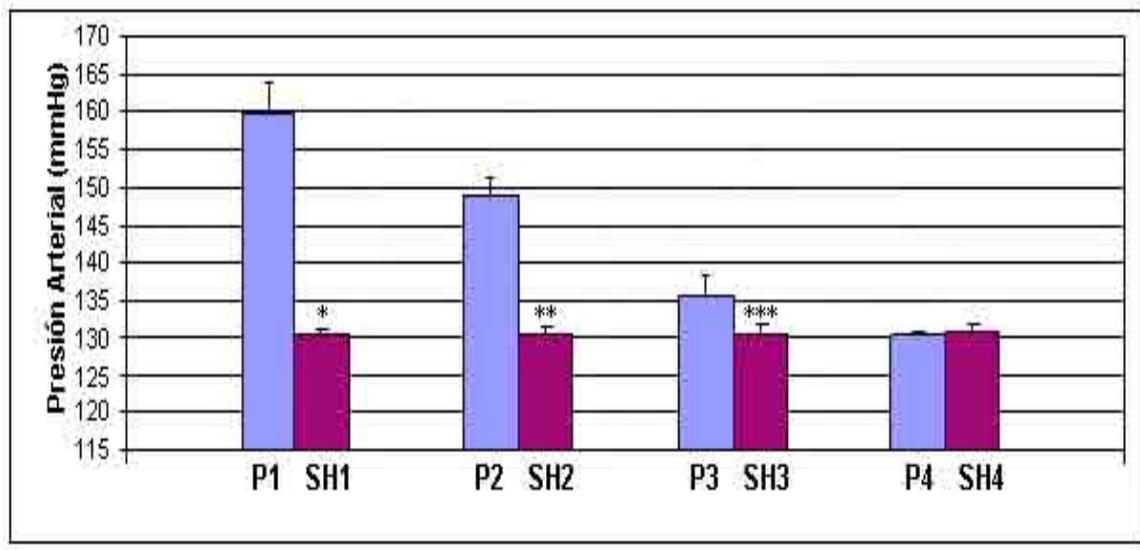
\* (p < 0,0022) comparado con pinealectomía.

\*\* (p < 0,0022) comparado con pinealectomía.

\*\*\* (p < 0,0022) comparado con pinealectomía.

Comparación de la PA de los animales pinealectomizados y los sham durante las distintas etapas del estudio, pudiendo observarse claramente que los animales pinealectomizados disminuyen progresivamente su PA con el tratamiento con melatonina. Los animales sham en cambio no presentan cambios en la PA en relación al tratamiento, manteniendo sus ciclos en los rangos de normalidad.

**Gráfico N°9.** Efecto del tratamiento con melatonina, en ratas pinealectomizadas y sham a las 02:00 horas, semanas 1-4.



P: Ratas pinealectomizadas  
Sh: Ratas sham

- \* ( $p < 0,0238$ ) comparado con pinealectomía.
- \*\* ( $p < 0,0238$ ) comparado con pinealectomía.
- \*\*\* ( $p < 0,0238$ ) comparado con pinealectomía.

Comparación de la PA de los animales pinealectomizados y los sham durante las distintas etapas del estudio, pudiendo observarse claramente que los animales pinealectomizados disminuyen progresivamente su PA con el tratamiento con melatonina. Los animales sham en cambio no presentan cambios en la PA en relación al tratamiento, manteniendo sus ciclos en los rangos de normalidad.

## **DISCUSIÓN**

Nuestros resultados muestran una variabilidad circadiana de la presión arterial en ratas Sprague Dawley normales, con valores mínimos a las 02:00 horas, provocándose una hipertensión arterial persistente después de efectuar una pinealectomía quirúrgica.

La persistencia de ritmos biológicos en condiciones ambientales constantes, es decir ritmos endógenos, indica la presencia de un reloj interno o marcapasos que controla la periodicidad de ciertas variables. La PA cumple un ritmo circadiano íntimamente relacionado al ciclo sueño-vigilia, produciéndose una disminución considerable de esta variable durante el período de reposo nocturno, y un aumento importante de la PA durante las primeras horas de la mañana, con el despertar y el inicio de la actividad. Esta alza en la PA parece ser gradual y suave en jóvenes y más acentuado en personas mayores (Suzuki y col, 1993) que coincide con un pico de la secreción de melatonina.

El ciclo circadiano es el resultante de un complejo sistema fisiológico encargado de mantener un orden temporal interno. Predice las necesidades del organismo en función del ambiente (externo e interno) que cambia, y se adelanta a estas necesidades mediante la producción de ritmos (endocrinos, fisiológicos y conductuales) que se ajustan diariamente al ciclo de luz/oscuridad, de aproximadamente 24 horas y que corresponde al período de rotación de la tierra. Sus principales componentes son: un oscilador endógeno (reloj central) que genera la oscilación o ritmo, (en mamíferos es el núcleo supraquiasmático (NSQ) del hipotálamo), unas vías de entrada, que sincronizan el reloj, y diferentes vías de salida, que traducen la oscilación del reloj en ritmos (endocrinos, fisiológicos y conductuales). Esto facilita la adaptación del organismo al

medio (interno y externo) que cambia (Gillette, 1997; Roennenber y Merrow, 1999; Korf y Stehle, 2002; Guerra M, Rodríguez EM resultados aun no publicados). Actualmente se plantea que el oscilador central actúa sobre osciladores secundarios (también llamados relojes periféricos) los que a su vez controlan otras estructuras, dentro y fuera del sistema nervioso (Hastings y Maywood, 2000; Basalobre, 2002; Roenneberg y Merrow, 2002; Guerra M, Rodríguez EM resultados aun no publicados). Además del NSQ, otras estructuras cerebrales vinculadas al sistema circadiano son: el núcleo paraventricular del hipotálamo (NPV), la glándula pineal, la habénula lateral y el núcleo paraventricular del tálamo (NPVT).

El ciclo circadiano es uno de los relojes biológicos que permite a los organismos vivir de acuerdo con los ciclos de la naturaleza, concretamente el que sigue los ciclos de día y noche. Se trata de un ciclo que se reproduce más o menos cada 24 horas, y en base al cual se ajustan los biorritmos de los organismos, tales como el hambre, el sueño, presión arterial, etc., incluso en ausencia de indicadores externos como la salida o la puesta del sol. Hay casos como los viajes largos, en que se traspasan varios husos horarios (jet lag) o trabajos en los que se rota en varios turnos, en que este reloj se desfasa produciendo muchas alteraciones en la salud, tales como insomnio, irritabilidad, cefalea, etc ([http://es.wikipedia.org/wiki/Reloj\\_circadiano](http://es.wikipedia.org/wiki/Reloj_circadiano)).

El sueño retrasado aparece en personas que adelantan las fases del ciclo sueño-vigilia y se despiertan y duermen con horarios coherentes aunque retrasados. Puede corregirse por sí mismo, debido a que el reloj biológico interno se adelanta naturalmente con la edad. Por otra parte, las personas que trabajan en horarios nocturnos sufren

trastornos en su ciclo de sueño-vigilia que normalmente se ajustan transcurridas unas semanas desde que se recupera el ritmo normal.

La melatonina es una pequeña molécula (peso molecular 232) de naturaleza lipofílica que deriva de la serotonina. Aunque se produce en diferentes regiones (retina, plaquetas, aparato digestivo, ovarios) en la mayoría de las especies estudiadas, es la glándula pineal, y más específicamente los pinealocitos, los principales productores de la melatonina circulante en plasma y líquido cefalorraquídeo (LCR) (Valladares, 1995; Guerra M, Rodríguez EM resultados aun no publicados).

La actividad secretoria de los pinealocitos se controla por señales rítmicas que dependen del estímulo fotoperiódico que percibe la retina, y que se transmiten neuralmente desde el núcleo supraquiasmático (NSQ) del hipotálamo. Esta regulación provoca un ritmo diario en la secreción de melatonina, cuyos niveles plasmáticos y en LCR son altos durante la noche y disminuyen durante el día (Smith y col, 1976; Adrendt y col, 1977; Reppert y col, 1979; Skinner y Malpoux, 1999; Guerra M, Rodríguez EM resultados aun no publicados).

La utilización de <sup>125</sup>I-melatonina ha permitido localizar, estudiar y caracterizar sus receptores. Aunque su densidad varía según la zona de estudio, los numerosos estudios realizados hasta la fecha confirman que las dos regiones que exhiben mayor densidad de sitios de unión a iodomelatonina son el NSQ del hipotálamo y la pars tuberalis (PT) de la hipófisis (Morgan y Williams, 1989; Pelletier y col, 1990; Stankov y col, 1990; Guerra M, Rodríguez EM resultados aun no publicados). Estos sitios de unión se han caracterizado como receptores de membrana acoplados a proteína G (Reppert, 1997; Guerra M, Rodríguez EM resultados aun no publicados). Se conoce la

existencia de diferentes tipos de receptores (MT1, MT2, MT3) y de diferentes isoformas, así como la existencia de diferentes vías de señalización intracelular a través de las cuales melatonina podría ejercer sus acciones (Barret y col, 1994; McNulty y col, 1994; Brydon y col, 1999; von Gall y col 2001; Guerra M, Rodríguez EM resultados aun no publicados). También se ha descrito la existencia de receptores nucleares que pertenecen a la familia de receptores huérfanos de ácido retinoico (RZR/ROR) (Carlber y col, 1994; Guerra M, Rodríguez EM resultados aun no publicados).

Esta hormona tiene como función biológica modular el sueño, la reproducción, el comportamiento sexual, funciones inmunológicas y “ritmos circadianos” (Nava y col, 2003). Estudios anteriores demostraron que al administrarse melatonina por vía intravenosa se produjo una disminución de la PA (K-Laflamme y col, 1998; Nava y col, 2003). Antecedentes obtenidos en el Instituto de Histología y Patología de la Universidad Austral de Chile revelan la presencia de receptores MT2 en células de la zona yuxtglomerular del riñón de ratas, lo que sugeriría un rol de melatonina en el control de la PA quizá a través del eje renina – angiotensina – aldosterona (Guerra M, Rodríguez EM resultados aun no publicados).

### **Variabilidad circadiana de la presión arterial**

Actualmente está bien establecido que un 90% de los individuos normotensos presenta un comportamiento cíclico circadiano de la PA durante las 24 horas, y un 70 - 80% de los pacientes hipertensos, presenta sus valores más altos durante el período matutino y los más bajos durante el período de sueño (Grupos de trabajo en hipertensión).

Monitorización ambulatoria de la presión arterial. Madrid: Liga española para la lucha contra la hipertensión arterial, 1993).

El sueño es un proceso activo regulado por el sistema nervioso central y compuesto por distintos ciclos que ocurren de forma regular a lo largo del reposo nocturno. Existen dos ciclos básicos: el período "sin ensueños" o de onda lenta (llamado así, por las ondas de baja frecuencia y amplitud alta, objetivadas en el electroencefalograma) y el período de "ensueños" o de movimientos oculares rápidos (fase REM), en el cual, se registran ondas de alta frecuencia y baja amplitud en el electroencefalograma, similares a las detectadas durante el estado de vigilia (Kleitman N, 1963; Wever RA y col, 1985). Los estadios más profundos de sueño de onda lenta (estadios 3 y 4) ocurren en las dos primeras horas de iniciado el sueño, mientras que los períodos REM ocurren en ciclos de 90 minutos (Kleitman N, 1963; Wever RA y col, 1985).

El cambio en los niveles de PA se produce estrechamente ligado a la pérdida del estado de vigilia. Durante la primera hora de sueño se presenta una baja progresiva de la PA, alcanzando su máxima disminución (de un 15-20%) a las 2 horas de iniciado el sueño (Littler WA y col, 1975; Snyder F y col, 1964), coincidiendo con los estadios más profundos del período de sueño de onda lenta (estadios 3 y 4). Durante el sueño REM, la PA se sitúa al mismo nivel del estadio 2 del sueño de onda lenta, es decir, aproximadamente un 10% menor que el estado de vigilia. En esta fase REM, la PA es además, mucho más variable, con fluctuaciones de hasta 30 mmHg en sólo unos pocos minutos (Snyder F y col, 1964).

Se ha observado que la disminución de los valores de la PA durante el sueño nocturno, respecto al período de vigilia, es de aproximadamente un 20%. No obstante, puede

haber variaciones significativas de la norma general en los perfiles individuales de determinados pacientes (Littler WA y col, 1978; Redon J y col ,1999; Broadhurst P y col 1990). Se considera como fisiológica una reducción de la PA durante el sueño superior al 10%, tanto para la PA sistólica como para la diastólica, siendo los valores inferiores a éstos, indicativos de un descenso reducido (Redon J y col ,1999; Bertolin V y col 1997; Mancía G y col 1997; Khoury AF y col, 1992).

En general, el patrón circadiano de la PA en los hipertensos es similar a los normotensos, pero con una mayor elevación de las cifras de PA a lo largo de todo el perfil circadiano. Sin embargo, existen ciertos subgrupos de hipertensos en los que la variabilidad circadiana está reducida, proponiéndose su importancia en términos de desarrollo de daño orgánico (Klain HK y col, 1964).

Actualmente está bien establecido que existe una variación circadiana en la incidencia de diversos eventos cardiovasculares fatales y no fatales (Muller JE y col, 1989). Múltiples factores pueden explicar este patrón circadiano en la morbimortalidad cardiovascular, entre los que destacan la existencia durante estas horas críticas de un incremento de presión arterial (PA), una elevación de la frecuencia cardíaca, y un aumento tanto de las resistencias vasculares periféricas como de la viscosidad sanguínea, con una consecuente disminución del flujo coronario. A todos estos fenómenos hemodinámicos se añaden múltiples alteraciones en procesos fisiológicos: se detecta durante este período horario una menor actividad fibrinolítica, y existe un marcado incremento en los niveles plasmáticos de adrenalina y noradrenalina, de la actividad de renina plasmática, y de la tasa de cortisol, junto a un aumento de la agregabilidad plaquetaria (Panza JA y col, 1991). Si se asume que los eventos

cardiovasculares (última consecuencia de un daño orgánico previo) están correlacionados con los marcadores biológicos y/o hemodinámicos antes citados, sería fácil suponer que debería existir una correlación entre el incremento matutino de la PA y el daño visceral. Desafortunadamente, las evidencias existentes son escasas y fragmentarias, y en general son indirectas dado que en general no se ha analizado prospectivamente el impacto específico que tienen los niveles de PA durante este fragmento horario sobre el daño visceral (Muller JE y col, 1989; Panza JA y col, 1991).

Nuestros hallazgos de PA significativamente más bajos a las 02:00 horas con respecto a los valores encontrados a las 18:00 horas, podrían estar explicados por una coincidencia con el pico nocturno de melatonina. Esta alza nocturna de melatonina ha sido previamente descrito como alterado en la hipertensión arterial, particularmente en los non-dippers (Jonas y col, 2003). Nuestros resultados en ratas Sprague Dawley, tienen gran similitud con lo descrito para los seres humanos, sin embargo debemos reconocer que la rata, siendo un animal de hábitos nocturnos, es esperable que tenga cifras tensionales más altas durante la noche en que tiene mayor actividad motora, un hecho descrito por algunos autores (Kurtz T y col, 2005). Una explicación para nuestros resultados puede ser un cambio del ritmo circadiano tensional en la cepa existente en nuestro laboratorio.

Una segunda observación de importancia se refiere al efecto de la pinealectomía. La determinación del ritmo circadiano reveló una elevación persistente e invariable de la presión arterial. La eliminación de la señal de melatonina por medio de pinealectomía ha sido descrita previamente como inductora de hipertensión arterial (Holmes y col, 1976; Vaughan y col, 1979; Kilic y col, 1999). Resulta interesante la pérdida del deep

nocturno de presión lo que favorece más la posibilidad de la eventual participación de melatonina en la regulación tensional. Es importante destacar también, que el ascenso de la presión arterial después de la pinealectomía es persistente y estable por al menos por 5 semanas. Este ascenso de la presión no podemos atribuirlo a otros eventos del procedimiento, a la luz de los hallazgos preliminares registrados en ratas falsamente operadas (sham), en las que realizamos el mismo procedimiento neuroquirúrgico sin extraer la glándula. En ellas se observó que al controlar el ritmo circadiano de la PA bajo las mismas condiciones establecidas para el grupo anterior, la presión arterial no se elevó, observándose un ritmo normal.

El efecto hipotensor de melatonina administrada en el agua de bebida a ratas pinealectomizadas a una dosis de 30 mg/kg de peso durante 5 semanas, favorece nuestra hipótesis. El efecto no fue inmediato, fue gradual y significativo recién a la 4ª semana de terapia, probablemente porque el efecto sobre los receptores tensionales requiere un nivel sanguíneo particular.

Resulta interesante destacar que el estudio del ritmo circadiano al finalizar la 5ª semana de tratamiento con melatonina, demostró que si bien la PA se mantuvo baja, no se observó una recuperación del deep nocturno de presión, probablemente porque éste es debido a la secreción pulsátil de melatonina en la rata normal, con su pico nocturno. En nuestros animales pinealectomizados y tratados, en cambio, la concentración de la hormona es más constante en el tiempo debido al consumo “voluntario” de agua (y fármaco) por el animal.

Otros autores al trabajar con un modelo de ratas espontáneamente hipertensas tratadas con dosis de melatonina similares a las nuestras, observaron una disminución de la PA

de aproximadamente 45 mm Hg el que fue atribuido a una reducción del stress oxidativo (Nava y col, 2003).

Si se quisiera proponer el uso clínico de melatonina como complemento del tratamiento de la PA, se debe tener en cuenta que esta hormona posee receptores tanto a nivel periférico como en el Sistema Nervioso Central (SNC), lo que complica la administración de grandes dosis pues una molécula muy liposoluble atravesaría la barrera hematoencefálica pudiendo desencadenar efectos adversos. De hecho, una dosificación de 5 mg / día por 3 días en el tratamiento del “jet-lag” puede inducir sedación residual, modorra, fatiga, cefalea, confusión y una reducción de la temperatura corporal (Nordlund y col, 1977; Petrie y col, 1989; Lissoni y col, 1991; Dahlitz y col, 1991; Claustrat y col, 1992; Dollins y col, 1993; Dollins y col, 1994; Tzischinsky y col, 1994; Cavallo, 1994; Deacon y col, 1994). Los eventos cardiovasculares humanos, parecen seguir un patrón circadiano llegando hasta un pick durante las primeras horas de la mañana después de despertarse y levantarse (Millar-Craig y col, 1978; White WB. 2001; Weber MA. 2002; Weber MA y col, 2004).

Existen estudios clínicos que han demostrado que la administración de melatonina a un grupo de pacientes con hipertensión esencial no complicada, indujo disminución de la presión arterial sistólica y diastólica durante las horas de sueño y en las primeras horas de la mañana (Birau y col, 1981; Scheer y col, 2004). Esto es muy importante a tener en cuenta, por el potencial efecto que podría tener su uso como preventivo de los accidentes cardiovasculares durante esas horas (Muller y col, 1989; Stergiou y col, 2002; Scheer y col, 2004). Finalmente, la relación entre hipertensión arterial y melatonina está a la espera de futuras investigaciones. Sus interacciones

farmacológicas son un terreno de gran potencialidad en el campo de la terapia antihipertensiva (Lusardi y col, 2000) y es necesario por tanto, seguir adelante con el estudio de los mecanismos de acción. Por un lado nos interesa estudiar la eventual mediación de su efecto por la renina dada la especial localización de los receptores MT2 en el riñón. Sin embargo no es descartable un efecto directo a nivel del hipotálamo, una disminución en los niveles de catecolaminas, una relajación de la musculatura lisa de la pared aórtica y un poderoso efecto antioxidante (Sewerynek y col, 2002; Nava y col, 2003).

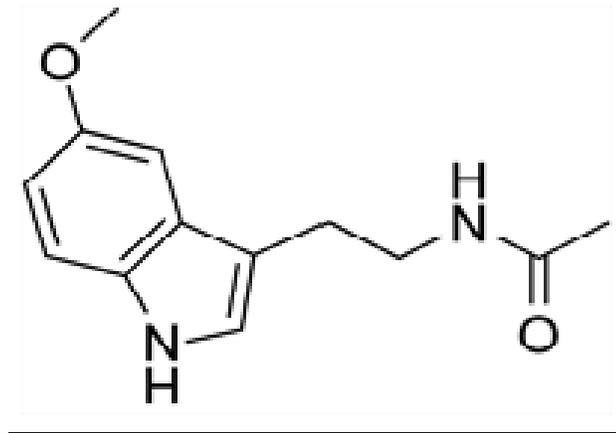
## 7. CONCLUSIÓN

Nuestros resultados permiten concluir que:

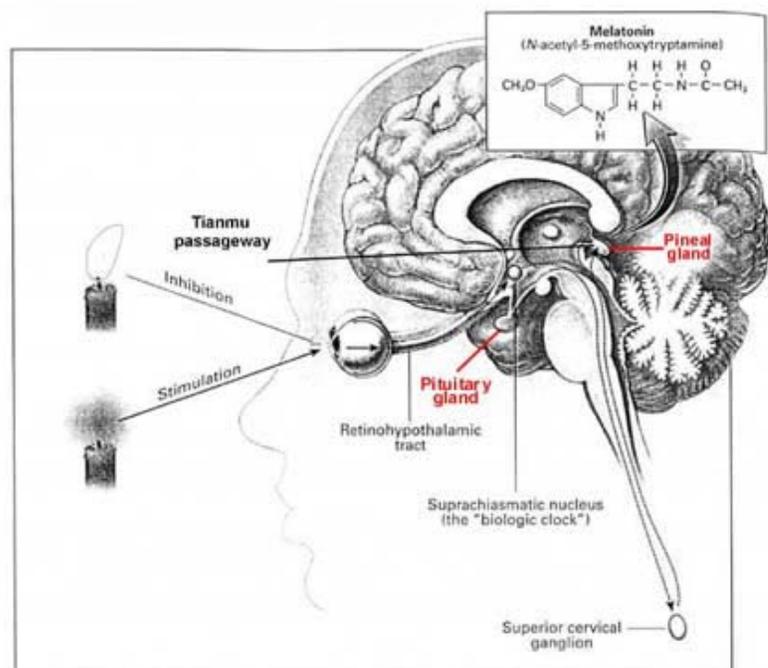
- ❖ La presión arterial en ratas normales presenta un ritmo circadiano con un descenso nocturno (*deep*).
- ❖ La pinealectomía genera hipertensión arterial persistente en ratas normales y pérdida del *deep* nocturno de presión arterial.
- ❖ La administración exógena de melatonina produce una disminución de la presión arterial en ratas pinealectomizadas hasta valores similares a los normales, pero sin recuperación del *deep* nocturno.
- ❖ Estos resultados abren una perspectiva para nuevas investigaciones con respecto a los mecanismos de acción que involucran la influencia de melatonina sobre la presión arterial y su potencial uso clínico como complemento de la terapia antihipertensiva.

## ANEXOS

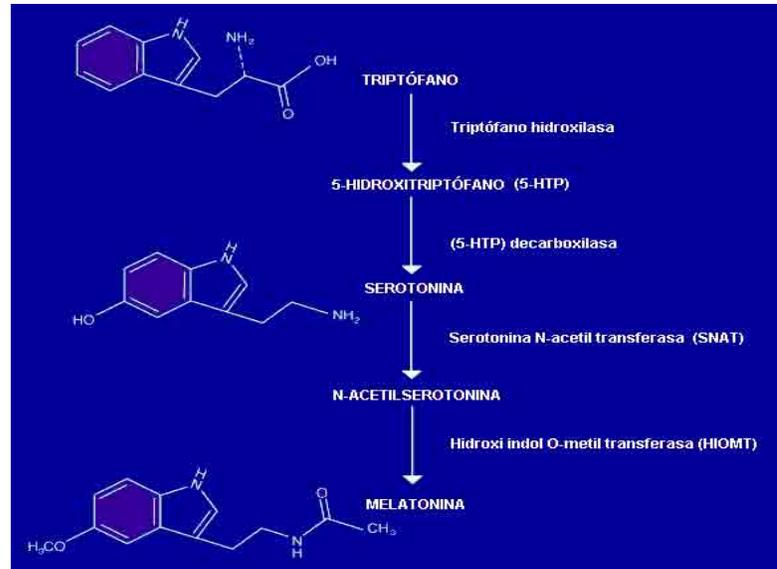
**Figura N° 1:** Estructura química de melatonina



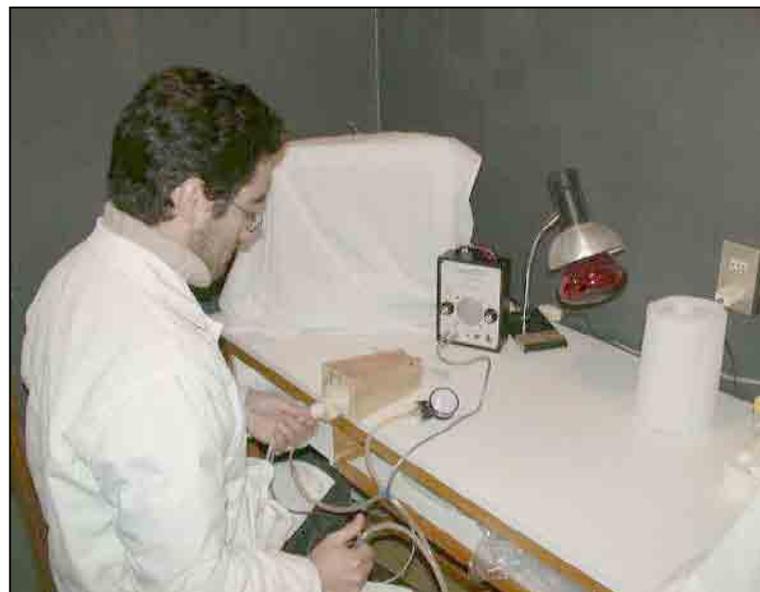
**Figura N° 2:** Ubicación de la glándula pineal en el cerebro humano.



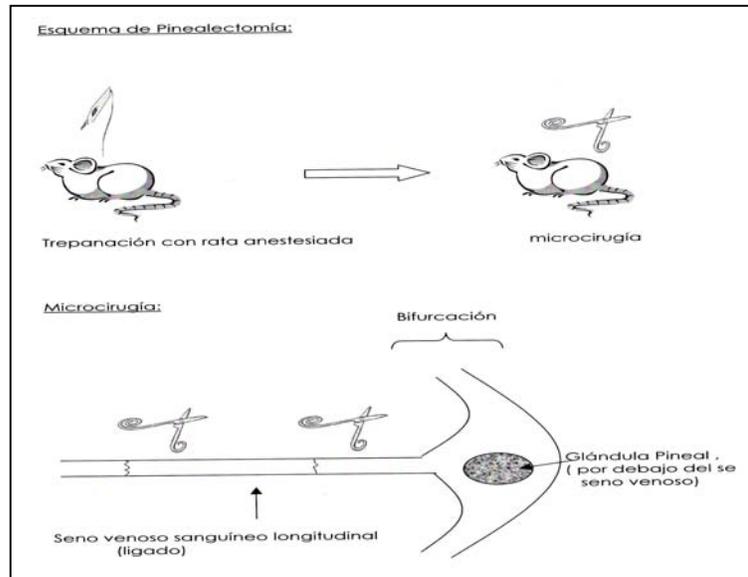
**Figura N°3:** Biosíntesis de Melatonina a partir del Triptófano, conversión en Serotonina y posterior transformación en Melatonina.



**Figura N°4:** Equipo de ultrasonido doppler y materiales necesarios para la medición de presión arterial sistólica tales como esfigmomanómetro, manguito inflable, gel para ultrasonido, cubículo de inmovilización y fuentes de calor.



**Figura N° 5:** Esquema de realización de la pinealectomía.



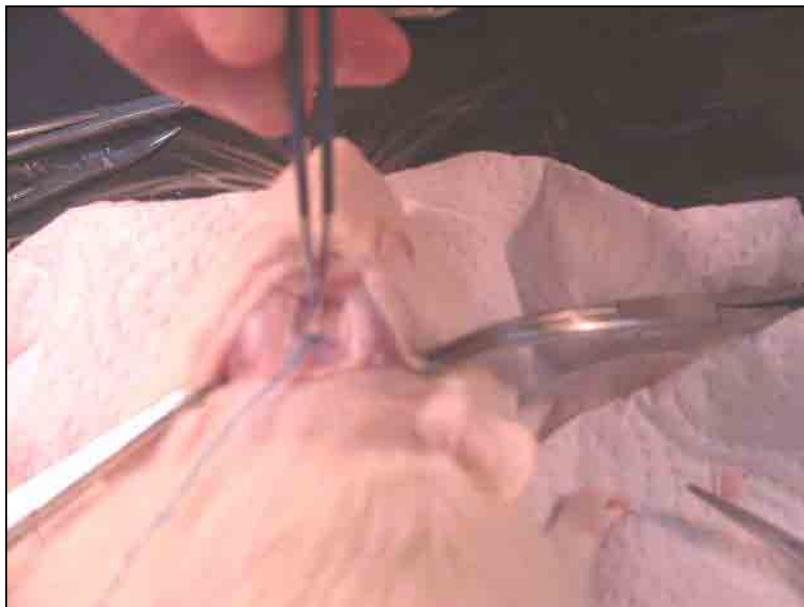
**Figura N° 6:** Fotografía de una rata pinealectomizada previa anestesia y trepanación en el craneo.



**Figura N°7:** Extracción de un trozo de craneo para visualizar region cerebral donde se ubica el seno venoso sanguíneo longitudinal.



**Figura N°8:** Extracción de glándula pineal y posterior sutura



## BIBLIOGRAFIA

### Referencia bibliográfica

**ADRENDT J, Wetterberg L, Heyden T, Sizonenko PC, Paunier L** (1977): Radioimmunoassay of melatonin: human serum and cerebrospinal fluid. *Horm Res* 8(2): 65-75.

**ATHANASSIADIS D, Draper GJ, Honour AJ, Cranston WI** (1969). Variability of automatic blood pressure measurements over 24 hour periods. *Clin Sci*; 36:147-156.

**BARRETT P, MacLean A, Morgan PJ** (1994): Evidence for multiple forms of melatonin receptor-G-protein complexes by solubilization and gel electrophoresis. *J Neuroendocrinol.* 6(5):509-15.

**BALSALOBRE A** (2002): Clock genes in mammalian peripheral tissues. *Cell Tissue Res.* 309(1):193-9.

**BAUMGART P, Walger P, Fuchs G, Dorst KG, Vetter H, Rahn KH** (1989). Twenty-four-hour blood pressure is not dependent on endogenous circadian rhythm. *J Hypertension*; 7:331-334.

**BERNE, R.** (1996). *Fisiología* 2ª ed., Harcourt Brace.

**BERTOLIN V, Pascual JM, Redon J** (1997). Ascenso matutino de la presión arterial: determinantes, significado y mecanismos implicados. *Hipertensión*;14:259-262.

**BIRAU N, Peterssen U, Meyer C, Gottschalk J.** (1981). Hypotensive effect of melatonin in essential hypertension. *IRCS Med Sci.* 9 : 906.

**BROADHURST P, Brigden G, Dasgupta P, Lahiri A, Raftery EB** (1990). Ambulatory intra-arterial pressure in normal subjects. *Am Heart J*; 120: 160 - 166.

**BRYDON L, Petit L, de Coppet P, Barrett P, Morgan PJ, Strosberg AD, Jockers R** (1999): Polymorphism and signalling of melatonin receptors. *Reprod Nutr Dev.* 39(3):315-24.

**CARLBERG C, Hoof van Huijsduijnen R, Staple JK, DeLamarter JF, Becker-Andre M** (1994): RZR<sub>s</sub>, a new family of retinoid-related orphan receptors that function as both monomers and homodimers. *Mol Endocrinol.* 8(6):757-70.

**CAVALLO A.** (1993). The pineal gland in human beings: relevante to pediatrics. *Journal Pediatric.* Dec; 123(6):843-51.

**CLAUSTRAT B, Brun J, David M, Sassolas G, Chazot G.** (1992). Melatonin and jet lag: confirmatory result using a simplified protocol. *Biological Psychiatry.* Oct 5; 32(8): 705-11.

**CUGINI P, Mancoin R, Serdoz R, Mancini A, Meucci T, Scavo D** (1980). Rhythm characteristics of plasma renin, aldosterone and cortisol in five subtypes of mesor - hypertension. *J Endocrinol Invest;* 3:143-147.

**CUGINI P, Kawasaki T, Di Palma L, Antonicoli S, Battisti P, Coppola A, Leone G** (1989). Preventive distinction of patients with primary or secondary hypertension by discriminant analysis of chronobiologic parameters on 24 h blood pressure patterns. *Jpn Circ;* 53:1363-1370.

**DAHLITZ M, Alvarez B, Vignau J, English J, Arendt J, Parkes JD.**(1991). Delayed sleep phase syndrome response to melatonin. *Lancet.* May 11; 337(8750):1121-4.

**DEACON S, English J, Arendt J.** (1994). Acute phase-shifting effects of melatonin associated with suppression of core body temperature in humans. *Neurosci Lett.* Aug 29; 178(1):32-4.

**DOLLINS AB, Lynch HJ, Wurtman RJ, Deng MH, Kischka KU, Gleason RE, Lieberman HR.** (1993). Effect of pharmacological daytime doses of melatonin on human mood and performance. *Psychopharmacology (Berl).* 112(4):490-6.

- DOLLINS AB, Zhdanova IV, Wurtman RJ, Lynch HJ, Deng MH.** (1994). Effect of inducing nocturnal serum melatonin concentrations in daytime on sleep, mood, body temperature, and performance. Proc Natl Acad Sci U S A. Mar 1; 91(5):1824-8.
- ELGHOZI, JL.** (1988). Electrolytes, hormones and blood pressure. Kidney, September Vol. (33): P557.
- ELGHOZI, JL.** (1988). Antihormones and blood pressure. Kidney, October Vol. (34): P552.
- FLOREZ, J.**(1997). Farmacología Humana 3º Ed., Masson. Barcelona.
- GILLETTE MU** (1997): Cellular and biochemical mechanisms underlying circadian rhythms in vertebrates. Curr Opin Neurobiol. 7(6):797-804
- GOODMAN & GILMAN.** (2001). Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. 10º Ed., McGraw – Hill. Mexico.
- GORDON R D. Wolfe, L.K. Island D. P. and Ildddle, G. W.** (1996). A diurnal rhythm in plasma renin activity in man. J. Clin, Invest 45:1587-1592.
- GRUPOS DE TRABAJO EN HIPERTENSIÓN** (1993). Monitorización ambulatoria de la presión arterial. Madrid: Liga española para la lucha contra la hipertensión arterial.
- GUERRA M.** (2004). Pineal-Pars Tuberalis-Pars Distalis: ¿Un nuevo eje neuroendocrino?. Facultad de Medicina. Universidad Austral de Chile.
- GUYTON, A.** (2002). Manual de Fisiología Médica 10ª ed., McGraw–Hill-Interamericana. España.
- HASTINGS M, Maywood ES** (2000): Circadian clocks in the mammalian brain. Bioessays. 22:23-31.
- HILFENHAUS, M.** (1976). Circadian rhythm of plasma renin activity, plasma adosterone and plasma corticosterone in rats. Int. J. Chronobiol. 3 : 213-229.

**HOLMES SW, Sugden D.** (1976). Proceedings: The effect of melatonin on pinealectomy-induced hypertension in the rat. *Br J Pharmacol.* Mar; 56(3):360P-361P.

**HOUSSAY, B.** (2000). *Fisiología Humana 7ª ed.*, El Ateneo. Buenos Aires.

**JONAS M, Garfinkel D, Zisapel N, Laudon M, Grossman E** (2003). Impaired nocturnal melatonin secretion in non-dipper hypertensive patients. *Bloos Press* 12(1):19-24.

**K-LAFLAMME A, Wu L, Foucart S, de Champlain J.**(1998). Impaired basal sympathetic tone and alpha1-adrenergic responsiveness in association with the hypotensive effect of melatonin in spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens.* Feb; 11(2):219-29.

**KATO K, Hirai K, Nishiyama K, Uchikawa O, Fukatsu K, Ohkawa S, Kawamata Y, Hinuma S, Miyamoto M.** (2005). Neurochemical properties of ramelteon (TAK-375), a selective MT1/MT2 receptor agonist. *Neuropharmacology.* Feb; 48(2):301-10.

**KATZUNG, B.** (2005). *Farmacología Básica y Clínica 9º Ed.*, Manual Moderno. México.

**KAWASHIMA K, Miwa Y, Fujimoto K, Oohata H, Nishino H, Koike H** (1987). Antihypertensive action of melatonin in the spontaneously hypertensive rat. *Clin Exp Hypertens* 9(7):1121-1131.

**KHOURY AF, Sunderajan P, Kaplan N** (1992). The early morning rise in blood pressure is related mainly to ambulation. *Am J Hypertens;* 5: 339 - 344.

**KILIC E, Ozdemir YG, Bolay H, Kelestimur H, Dalkara T.**(1999). Pinealectomy aggravates and melatonin administration attenuates brain damage in focal ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* May; 19(5):511-6.

**KLAIN HK, Hinman AT, Sokolow M** (1964). Arterial blood pressure measurements with a portable recorder in hypertensive patients. Variability and correlation with casual blood pressure. *Circulation*; 30: 882 - 892.

**KLEITMAN N** (1963). *Sleep and Wakefulness*. Chicago: University of Chicago Press.

**KORF HW, Stehle JH** (2002). The circadian system: circuits-cell-clock genes. *Cell Tissue Res* 309(1): 1-2

**LEMMER B, Portaluppi F** (1997). Chronopharmacology of cardiovascular diseases. En: Redfern P, Lemmer B (eds). *Handbook of Pharmacology, Vol 125: Physiology and Pharmacology of Biological Rhythms*. Springer. Heidelberg, New York;251-297.

**LIGHTMAN SL, James VH, Linsell P, Mullen E, Peart WS, Sever PS** (1981). Studies of diurnal changes in plasma renin activity, and plasma noradrenaline, aldosterone and cortisol concentrations in man. *Clin Endocrinol*; 14:213-223.

**LISSONI P, Barni S, Cattaneo G, Tancini G, Esposti G, Esposti D, Fraschini F.** (1991). Clinical results with the pineal hormone melatonin in advanced cancer resistant to standard antitumor therapies. *Oncology*. 48(6):448-50.

**LITTLER WA, Honour AJ, Carter RD, Sleight P** (1975). Sleep and blood pressure. *Br Med J*; 3: 346 - 348.

**LITTLER WA, West MJ, Honour AJ, Sleight P** (1978). The variability of arterial pressure. *Am Heart J*; 95: 180 - 186.

**LUSARDI P, Piazza E, Fogari R.** (2000). Cardiovascular effects of melatonin in hypertensive patients well controlled by nifedipine: a 24-hour study. *Br J Clin Pharmacol*. May; 49(5):423-7.

**MANCIA G, Ferrari A, Gregorini L, Parati G, Pomidossi G, Bertinieri G, Grassi G, Di Rienzo M, Pedotti A, Zanchetti A** (1983). Blood pressure and heart rate variabilities in normotensive and hypertensive human beings. *Cir Res*; 53:96-104.

**MANCIA G, Zanchetti A, Agabiti-Rosei E, Benemio G, De Cesaris R, Fogari R, Pessino A, Porcellati C, Salvetti A, Trimarco B** (1997). Ambulatory blood pressure is superior to clinic blood pressure in predicting treatment-induced regression of left ventricular hypertrophy. *Circulation*; 95:1464-1470.

**MARTINDALE** 2002. The complete drug referente 33<sup>a</sup> ed., Pharmaceutical Press

**MC-NAB M, PAUL y JALIL, JORGE E.** (2005). Valor pronóstico de la monitoría ambulatoria de presión arterial en pacientes hipertensos: Observaciones en la literatura. *Rev. méd. Chile*, ene. vol.133, no.1, p.89-95. ISSN 0034-9887.

**MCNULTY S, Morgan PJ, Thompson M, Davidson G, Lawson W, Hastings MH** (1994): Phospholipases and melatonin signal transduction in the ovine pars tuberalis. *Mol Cell Endocrinol* 99(1):73-9

**MIDDEKE M, Schrader J** (1994). Nocturnal blood pressure in normotensive subjects and those with white coat, primary, and secondary hypertension. *Brit Med J* ;308:630-632.

**MILLAR-CRAIG MW, Bishop CN, Raftery EB.** (1978). Circadian variation of blood-pressure. *Lancet* ; i: 795 - 797

**MORA J, Ocon J** (1987). Variabilidad de la presión arterial. *Hipertensión*;4:387-394.

**MORGAN PJ, Williams LM** (1989): Central melatonin receptors: Implications for a mode of action. *Experientia* 45:955-965.

**MULICAHY D., Keegan J, Cuningham D. Quyyumi A, Crean P, Park A, Wright C, Fox K** (1988). Circadian variation of total ischemic burden and its alteration with anti - anginal agents. *Lancet* 1988; 2:755-759.

**MULLER JE, Tofler GH, Stone PH.** (1989). Circadian variation and triggers of onset of acute cardiovascular disease. *Circulation.*; 79: 733–743.

**NAVA M, Yasmir Quiroz, Nosratola Vaziri y Rodríguez- Iturbe.** (2003). Melatonin reduces renal interstitial inflammation and improves hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 284: F447- F454.

**NORDLUND JJ, Lerner AB.**(1977). The effects of oral melatonin on skin color and on the release of pituitary hormones. *J Clin Endocrinol Metab.* Oct; 45(4):768-74.

**PANZA JA, Epstein SE, Quyyumi AA** (1991). Circadian variation in vascular tone and its relation to alpha-sympathetic vasoconstrictor activity. *N Engl J Med*; 325: 986-990.

**PASCAL P, Lahaye C, Delagrangre P, Nicolas JP, Canet E, Boutin JA** (1999). Characterization of 2-[125I]iodomelatonin binding sites in Syrian hamster peripheral organs. *J Pharmacol Exp Ther.* Jul; 290(1):334-40.

**PELLETIER J, Castro, B, Roblot G, Wylde R, de Reviers MM** (1990): Characterization of melatonin receptors in the ram pars tuberalis: influence of light. *Acta Endocrinol* 123:557-562.

**PETRIE K, Conaglen JV, Thompson L, Chamberlain K.** (1989). Effect of melatonin on jet lag after long haul flights. *BMJ.* Mar 18; 298(6675):705-7.

**PORTALUPPI F, Cortelli P, Provini F, Plazzi G, Manfredini R, Lugaresi E** (1997). Alterations of sleep and circadian blood pressure profile. *Blood Pressure Monitoring*; 2:301-313.

**REDON J, Vicente A, Alvarez V, Cremades B, Torró I, Tacons J, Lurbe E** (1999). Variabilidad circadiana de presión arterial: aspectos metodológicos para su estimación. *Medicina Clínica.*

**REPERT SM, Perlow MJ, Tamarkin L, Klein DC** (1979): A diurnal melatonin rhythm in primate cerebrospinal fluid. *Endocrinology* 104(2):295-301

**REPERT SM** (1997): Melatonin receptors: molecular biology of a new family of G protein-coupled receptors. *J Biol Rhythms.* 12(6):528-31.

**RODRÍGUEZ – ITURBE B, Quiroz Y, Nava M, Bonet L, Chavez M, Herrera- Acosta J, Jonson RJ, and Pons HA.** (2002). Reduction of renal immune cell infiltration results in blood pressure control in genetically hypertensive rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 282: F191- F201.

**ROENNEBERG T, Mellow M** (1999): Circadian clocks--from genes to complex behaviour. *Reprod Nutr Dev.* 39(3):277-94.

**ROENNEBERG T, Mellow M** (2002): "What watch?.. such much!" Complexity and evolution of circadian clocks. *Cell Tissue Res* 309(1): 3-10

**SCHEER FA, Van Montfrans GA, van Someren EJ, Mairuhu G, Bujis RM** (2004): Daily nighttime melatonin reduces blood pressure in male patients with essential hypertension. *Hypertension* 43(2):192-197.

**SEWERYNEK E.** (2002). Melatonin and the cardiovascular system. *Neuro Endocrinol Lett.* 2002 Apr; 23 Suppl 1:79-83.

**SIEGEL S.** (1996). Metodología de la Investigación. Interamericana – McGraw Hill. Ciudad de México.

**SIGMA,** (2002-2003). Biochemicals and Reagent for life science research.

**SKINNER DC, Malpoux B** (1999): High melatonin concentrations in third ventricular cerebrospinal fluid are not due to galen vein blood recirculating through the choroid plexus. *Endocrinology* 140: 4399-4405.

**SMITH I, Mullen PE, Silman RE, Snedden W, Wilson BW** (1976): Absolute identification of melatonin in human plasma and cerebrospinal fluid. *Nature* 22;260(5553):716-8.

**SNYDER F, Hobson JA, Morrison DF** (1964). Changes in respirations, heart rate, and systolic blood pressure in human sleep. *J Appl Physiol*; 19: 417 - 422.

**STANKOV B, Cozzi B, Lucini V, Fumagalli P, Scaglione F, Fraschini F** (1990): Characterization and mapping of melatonin receptors in the brain of three mammalian

species: rabbit, horse, and sheep. A comparative in vitro binding study. *Neuroendocrinology* 53:214-221.

**STERGIOU GS, Vemmos KN, Pliarchopoulou KM, Synetos AG, Roussias LG, Mountokalakis TD.** (2002). Parallel morning and evening surge in stroke onset, blood pressure, and physical activity. *Stroke*. 33: 1480–1486.

**SUNDBERG S, Kohwakka A, Gordin A** (1988). Rapid reversal of circadian blood pressure rhythm in shift workers. *J. Hypertension*; 6:393-399.

**SUZUKI Y, Kuwajima I, Mitani K, Kuramoto K.** (1993). The relation of morning rise in blood pressure to pressure response to exercise and mental stress. *Jap J Geriatr* ; 23:67-173.

**TZISCHINSKY O, Lavie P.** (1994). Melatonin possesses time-dependent hypnotic effects. *Sleep*. Oct; 17(7):638-45.

**VALLADARES L** (1995): La melatonina como hormona y como paradigma. *Noticiero de Biología*.

**VON GALL C, Stehle JH, Weaver DR** (2001): Mammalian melatonin receptors: molecular biology and signal transduction. *Cell Tissue Res* 309: 151-162

**WEBER MA.** (2002). The 24-hour blood pressure pattern: does it have implications for morbidity and mortality? *Am J Cardiol*. Jan 24; 89(2A):27A-33A.

**WEBER MA, Fodera SM.** (2004). Circadian variations in cardiovascular disease: chronotherapeutic approaches to the management of hypertension. *Rev Cardiovasc Med*. Summer; 5(3):148-55.

**WEVER RA** (1985). Internal interactions within the human circadian system: the masking effect. *Experientia*; 41: 332 - 342.

**WHITE WB.** (2001). Cardiovascular risk and therapeutic intervention for the early morning surge in blood pressure and heart rate. *Blood Press Monit*. Apr; 6 (2):63-72.

## **Referencia Electrónica**

<http://nefrored.edu.bo/hormonas2.htm#Sistema>; (nefrored)

<http://www.sld.cu/libros/hiperten/desarrollo.html>