

Curso 2005/06
CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS/18
I.S.B.N.: 978-84-7756-781-3

MARTÍN JESÚS GARCÍA Y GONZÁLEZ

**Ritmo luz/oscuridad de citocinas y otros marcadores
relacionados con la inflamación en pacientes
con infarto agudo de miocardio en la isla de Tenerife**

Directores

**PEDRO ABREU Y GONZÁLEZ
ALBERTO DOMÍNGUEZ Y RODRÍGUEZ**



SOPORTES AUDIOVISUALES E INFORMÁTICOS
Serie Tesis Doctorales

Para Miriam.

Para Daniel, Carla y Pablo Martín.

AGRADECIMIENTOS

Siempre consideré que la tesis doctoral debía ser como la fruta madura que, tras una paciente y laboriosa gestación, debe recolectarse en el momento más apropiado: aquél en el que tanto su color como sabor están en la máxima plenitud. Esta tesis doctoral llega, pues, como un fruto pleno de madurez en el, a mi juicio, momento más apropiado de mi vida personal y profesional.

Visicitudes, más personales que profesionales, han impedido por largo tiempo que acometiera y concluyera este importante trabajo con el cual accedo al Grado de Doctor, desde mi Licenciatura en Medicina y Cirugía hace casi veinte años. El hecho de haberlo realizado ha significado para mí un reto personal y el saldo de una antigua deuda.

El reto personal supone, en mi caso, concluir una carrera académica al alcanzar el Grado de Doctor. Confieso que en alguna ocasión he manifestado que un médico “se doctora” todas y cada una de las veces que atiende a sus pacientes. En este grado de excelencia profesional he intentado refugiarme, durante estos años, “mi complejo de inferioridad” -si se me permite la expresión- frente al resto de mis compañeros que ya eran Doctores en Medicina.

El saldo de la deuda nunca pagada proviene del compromiso personal contraído con la persona que, más allá de las luces y las sombras de su personalidad, fue mi Maestro en Cardiología: el Profesor Dr. D. Diego de Armas Trujillo, creador de una auténtica Escuela de Cardiología en el Hospital Universitario de Canarias, sembró en mí la inquietud por el conocimiento de la Cardiología y de su mano inicié el aprendizaje de esta disciplina médica, con la curiosidad científica, la excelencia en el ejercicio y la responsabilidad profesional que siempre lo caracterizaron. Nunca pudo ver realizado este trabajo, el cual a título póstumo le dedico. A él mi más profundo reconocimiento y mi más sincero agradecimiento. Que en paz descanse.

Esta tesis doctoral no hubiera sido posible realizarla sin la inmensurable ayuda de dos personas a las que quiero distinguir con mi mayor agradecimiento: El Profesor Dr. D. Pedro Abreu González y el, para mí querido, entrañable amigo y compañero, Dr. D. Alberto Domínguez Rodríguez.

Pedro Abreu González, excelente profesional y aún mejor persona, tiene las poco frecuentes cualidades de la discreción, la sencillez y la proximidad en el trato personal. Sobre sus innumerables méritos académicos sobresalen, a mi juicio, otros que quizás no constan en su “curriculum vitae”: aprovechando nuestra curiosidad e inquietud por la investigación científica, se ha convertido en el promotor de la misma y

ha llegado a ser un “verdadero catalizador” en la formación de nuestro grupo de investigación. Su constante e incondicional apoyo, su desinteresada amistad y su calidad humana son, para mí, sus mejores cualidades.

Pocas veces te encuentras en la vida profesional con una persona que trasciende de lo puramente laboral y se convierte en tu verdadero amigo. A mí me sucedió con Alberto Domínguez Rodríguez. Yo no podía ni de lejos sospechar, cuando lo conocí siendo ambos estudiantes de Medicina, -creo que yo andaba por el 5º ó 6º curso y él iniciaba los estudios- que llegaríamos a ser como el “ying/yang” de la filosofía oriental. A Don Diego de Armas le debemos la previsión de aunar nuestro destino profesional en la Unidad de Coronarias del Hospital Universitario de Canarias. De mi mano, Alberto dio algunos de sus “primeros pasos” en el área de los Cuidados Intensivos Cardiológicos. De la suya, sincera, llana, y entrañable, junto a la de Pedro, accedo al Doctorado.

Quiero manifestar mi agradecimiento a todo el Personal Médico del Servicio de Cardiología del Hospital Universitario de Canarias, por poder compartir con ellos la tarea de atender a aquellos que son la principal razón de nuestro esfuerzo, los enfermos cardiológicos, y representar para mí un continuo estímulo de superación profesional. No quisiera olvidar a todo el Personal de Enfermería del Servicio de Cardiología, en especial al que desempeña su labor en la Unidad de Coronarias del Hospital Universitario de Canarias, quienes con exquisita profesionalidad han colaborado de forma trascendental, a través de la recogida de las muestras sanguíneas de los sujetos del estudio, a la realización de este trabajo.

Finalmente, quiero hacer mi especial reconocimiento y agradecimiento a la persona que con su sacrificio personal, su incondicional apoyo, su inmensa paciencia y su gran Amor ha estado a mi lado, como dicen los votos matrimoniales “*en la salud y en la enfermedad, en la riqueza y en la pobreza, todos los días de mi vida*”: Miriam Dorta Martín no sólo es la solícita esposa con la que todo hombre sueña sino que, además, en una heroica y excelente maternidad, me ha hecho el mejor regalo que puede hacerse a un ser humano: Daniel, Carla y Pablo Martín, quienes encarnan no sólo el fruto de nuestro Amor sino una vibrante promesa de futuro.

ABREVIATURAS

A II	angiotensina II
CD40 L, CD154	CD40 Ligando
CK-MB	isoenzima MB de la creatincinasa
ECA	enzima convertidora de la angiotensina
HDL-colesterol	colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad
ICAM-1	molécula de adhesión intercelular-1
IFN-α	interferón-alfa
IFN-β	interferón-beta
IFN-γ	interferón-gamma
IL-1	interleucina-1
IL-2	interleucina-2
IL-3	interleucina-3
IL-4	interleucina-4
IL-6	interleucina-6
IL-8	interleucina-8
IL-10	interleucina-10
IL-12	interleucina-12
IL-15	interleucina-15
IL-18	interleucina-18
IL-26	interleucina-26
$\kappa\beta$ – NF	factor de transcripción nuclear $\kappa\beta$
LDL-colesterol	colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad
MCP-1	proteína quimiotáctica de monocitos
MMP-9	metaloproteinasas de la matriz - 9
MPO	mieloperoxidasa
MS	muerte súbita
M-SCF	factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos
NO	óxido nítrico
NOS	óxido nítrico sintetasa
OxLDL	pártículas de LDL-colesterol Oxidadas
PAPP-A	proteína plasmática tipo A asociada al embarazo.
PCR	proteína C reactiva
PDGF-B	factor de crecimiento derivado de plaquetas de cadena beta
PGI₂	prostaciclina

SCA	síndrome coronario agudo
sCD40L	fracción soluble del CD40 Ligando
sVCAM-1	fracción soluble de la molécula de adhesión vascular-1
TF	factor tisular
TXA₂	tromboxano A₂
TXB₂	tromboxano B₂
TNF-α	factor de necrosis tumoral alfa
t-PA	activador tisular del plasminógeno
VCAM-1	molécula de adhesión vascular-1

ÍNDICE

ÍNDICE

I. Agradecimientos.....	IV
II. Abreviaturas.....	VII
III. Índice.....	X
IV. Presentación.....	1
V. Introducción.....	5
Etiopatogenia y fisiopatología de la aterosclerosis coronaria.....	6
Aterosclerosis e inflamación.....	6
Función que desempeña la proteína C reactiva en la aterosclerosis....	7
Función que desempeñan las citocinas en la aterosclerosis.....	8
Disfunción endotelial: fenómeno inicial en la aterosclerosis.....	9
Desencadenantes de la inflamación en la aterogénesis.....	13
Hipercolesterolemia, LDL-colesterol e inflamación.....	13
Diabetes e inflamación.....	14
Obesidad e inflamación.....	14
Hiperhomocisteinemia e inflamación.....	14
Hipertensión arterial e inflamación.....	14
Infección e inflamación.....	15
Función que desempeña la inflamación en la rotura de la placa.....	15
Bases anatómicas y fisiológicas de los ritmos biológicos:	
la glándula Pineal.....	16
Fenómenos desencadenantes y ritmos circadianos de presentación de	
la enfermedad aterosclerótica.....	19
Variaciones circadianas de las citocinas y otros mediadores	
de la inflamación.....	21
VI. Objetivos.....	23

VII. Sujetos de estudio, material y métodos.....	26
Sujetos del estudio.....	27
Casos.....	27
Controles.....	28
Protocolo experimental.....	28
Métodos de laboratorio.....	28
Análisis estadístico.....	31
VIII. Resultados.....	32
Características clínicas y analíticas basales de los sujetos del estudio.....	33
Niveles séricos de melatonina, citocinas y otros mediadores de la inflamación en las fases de luz y oscuridad.....	34
Niveles séricos luz / oscuridad de neopterina y melatonina.....	38
Niveles séricos luz / oscuridad de IL-1β y melatonina.....	39
Niveles séricos luz / oscuridad de IL-6 y melatonina.....	40
Niveles séricos luz / oscuridad de IL - 8 y melatonina.....	41
Niveles séricos luz / oscuridad de IL - 10 y melatonina.....	42
Niveles séricos luz / oscuridad de MMP-9 y melatonina.....	43
Niveles séricos luz / oscuridad de PCR y melatonina.....	44
Niveles séricos luz / oscuridad de OxLDL y melatonina.....	45
Niveles séricos luz / oscuridad de PAPP-A y melatonina.....	46
Niveles séricos luz / oscuridad de sCD40L y melatonina.....	47
Niveles séricos luz / oscuridad de s-VCAM-1 y melatonina.....	48
Niveles séricos luz / oscuridad de MPO y melatonina	49
IX. Discusión.....	50
Niveles séricos luz /oscuridad de melatonina.....	53
Niveles séricos luz /oscuridad de IL-1β.....	54
Niveles séricos luz /oscuridad de IL-6.....	55
Niveles séricos luz /oscuridad de IL-8.....	57
Niveles séricos luz /oscuridad de IL-10.....	58
Niveles séricos luz /oscuridad de Neopterina.....	59

Niveles séricos luz /oscuridad de sVCAM-1.....	61
Niveles séricos luz /oscuridad de OxLDL.....	63
Niveles séricos luz /oscuridad de MPO.....	65
Niveles séricos luz /oscuridad de MMP-9.....	68
Niveles séricos luz /oscuridad de sCD40L.....	70
Niveles séricos luz /oscuridad de PAPP-A.....	73
Niveles séricos luz /oscuridad de PCR.....	75
X. Conclusiones.....	77
XI. Referencias.....	80
XII. Anexos.....	102

“Pues quien conoce los cambios de las estaciones y la salida y el ocaso de los astros, a la vista de cómo ocurre cada uno de esos hechos, podrá prever cómo va a ser el año. Al reflexionar y prever de este modo, conocerá perfectamente la ocasión oportuna de cada caso, conseguirá curar en la mayor parte de las ocasiones y obtendrá un éxito grandísimo en la ciencia médica.

Si alguien pensara que esos datos son propios de la meteorología, en caso de cambiar de criterio, sabrá que la astronomía contribuye a la medicina, no en poquísima, sino en grandísima medida. En efecto, los órganos internos les cambian a los hombres juntamente con las estaciones.”

SOBRE LOS AIRES, AGUAS Y LUGARES (2).

Corpus Hippocraticum.

PRESENTACIÓN

Las enfermedades cardiovasculares constituyen la principal causa de mortalidad en España, siendo -dentro de ellas- la cardiopatía isquémica coronaria la que ocasiona, globalmente, el mayor número de muertes (I.N.E. 2002). El infarto agudo de miocardio, en más del 50% de los casos, es la causa más frecuente en ambos sexos (Villar Álvarez F, et al. Informe SEA 2003). A pesar de la reducción que desde 1975 se ha observado en la tasa de mortalidad por enfermedades cardiovasculares, en España globalmente y en cada una de sus comunidades autónomas, el número de muertes por cardiopatía isquémica ha ido aumentando. Esto se debe, fundamentalmente, al progresivo envejecimiento que ha experimentado la población española en este periodo. Por ello, el impacto demográfico, sanitario y social de estas enfermedades aumentará a lo largo de las próximas décadas. Se estima que, entre 1997 y 2005, el número absoluto de infartos de miocardio habrá aumentado un 2,28 % anualmente en la población española (Marrugat J et al, 2002). Es previsible, pues, mayores cargas asistenciales en el futuro, lo que representa un problema sanitario de primera magnitud.

El proceso histopatológico fundamental subyacente en la cardiopatía isquémica es la aterosclerosis. La aterosclerosis, conceptualmente, se concibe hoy día como un proceso de naturaleza básicamente inflamatoria. La aterotrombosis representa el fenómeno anatómico-clínico clave en la progresión de las lesiones ateroscleróticas y el desencadenamiento de los síndromes coronarios agudos. Su mayor expresión -la oclusión trombótica completa y abrupta de un vaso arterial coronario- provoca el infarto agudo de miocardio. Existe un complejo entramado de relaciones entre ambos procesos, que se influyen de forma recíproca (Gawaz M et al, 2005). En ambos procesos interviene un componente celular variado, entre los que se cuentan células endoteliales, células musculares lisas de la pared vascular, células inflamatorias del tipo monocítico-macrofágico, linfocitos y plaquetas, así como también un variado componente humoral en el que se incluyen partículas de LDL-colesterol modificadas, citocinas, moléculas de adhesión y otras sustancias mediadoras de la inflamación de muy diversa naturaleza (Libby P et al, 2002).

En los últimos 40 años un conjunto de evidencias ha contribuido a establecer la existencia de una distribución no uniforme, un ritmo circadiano, del momento de inicio de las manifestaciones clínicas de los accidentes cardiovasculares. Observaciones realizadas en la década de los 60 y, más tarde, en la de los 80 del pasado siglo (Muller JE et al, 1985; Willich SN et al, 1989; Tofler GH et al, 1992), encontraron una tendencia a la concentración matutina de esta patología y confirmaron, de forma

irrefutable, la existencia de un ritmo circadiano, con un evidente pico matutino, en la presentación del infarto agudo de miocardio. Estudios posteriores demostraron también la existencia de ritmos circadianos en la presentación de otras patologías cardiovasculares como la muerte súbita (Willich SN et al, 1987), los accidentes isquémicos cerebrovasculares (Marler JR et al, 1989) y la isquemia coronaria clínica o silente (Rocco MB et al, 1987). De momento, no están completamente claros y comprendidos los mecanismos fisiopatológicos que subyacen a esta desigual distribución de los accidentes cardiovasculares isquémicos.

El desencadenamiento de los síndromes isquémicos coronarios agudos se relaciona con la rotura de una placa aterosclerótica complicada. La génesis de este hecho fisiopatológico se ha relacionado con el aumento de factores neuro-humorales, el aumento de la presión arterial, el incremento de la actividad del sistema nervioso autónomo y del nivel plasmático de catecolaminas, así como el aumento del tono coronario. Observaciones recientes han demostrado variaciones circadianas en la incidencia de la ruptura de la placa aterosclerótica como fenómeno que provoca el infarto agudo de miocardio (Tanaka A et al, 2004). El aumento en la coagulabilidad de la sangre, la disminución en la actividad fibrinolítica del plasma y el aumento en la agregabilidad plaquetaria contribuyen, en gran manera, al desencadenamiento de los síndromes coronarios agudos. Se ha demostrado que estos fenómenos también presentan variaciones diurnas en su actividad (Andreotti F, Klufft C, 1991) y que este hecho tiene gran influencia sobre la efectividad de determinadas terapias como la trombolisis (Becker RC, Corrao JM, 1989).

Se ha sugerido que la desigual distribución en la presentación circadiana de los procesos isquémicos coronarios agudos podría estar, de forma alguna, asociada a, o desencadenada por fenómenos que muestran una organización temporal similar, por ritmos fisiológicos que presentan un pico de actividad en un determinado momento del día o de la noche (Hernandes Fernandes E et al, 2000). Este conocimiento tendría no sólo importancia fundamental para la mejor comprensión de los mecanismos patogénicos asociados a la enfermedad coronaria sino que, además, pudiera tener un hipotético beneficio clínico adicional con implicaciones terapéuticas, tales como el diseño de estrategias de intervención dirigidas a poder proveer de mayor protección en los momentos de mayor riesgo, ante picos en los ritmos de actividad de estos fenómenos, en un determinado momento del día o de la noche.

El estudio de las variaciones diurnas de la actividad de los diversos tipos celulares, marcadores y mediadores de inflamación implicados en los síndromes coronarios agudos abre pues, a nuestro juicio, un intrigante y desconocido campo del conocimiento de la fisiopatología de los mismos, cuya proyección clínica está aún por descubrir.

INTRODUCCIÓN

ETIOPATOGENIA Y FISIOPATOLOGÍA DE LA ATEROSCLEROSIS CORONARIA.

La aterosclerosis es una entidad patológica caracterizada por una respuesta inflamatoria y proliferativa, ante diversos agentes lesivos, que afecta a la capa íntima de la pared vascular de arterias de grande y mediano calibre. Progresas de forma asintomática durante muchos años a lo largo de la vida y puede producir, de forma tardía, sintomatología clínica derivada de la isquemia que provoca la reducción de calibre de la luz arterial en el territorio que irriga. La aterotrombosis representa la ruptura o erosión aguda de una placa aterosclerótica sobre la que se desencadena el proceso de trombosis intravascular, más o menos oclusivo. Éste es el fenómeno histopatológico involucrado en la génesis de la mayoría de los casos de síndrome coronario agudo, cuyas principales manifestaciones clínicas son la angina inestable, el infarto agudo de miocardio, y la muerte súbita (Ross R, 1993).

En la etiopatogenia de la aterosclerosis se han relacionado múltiples factores que contribuyen a la misma. Entre ellos se incluyen el tabaquismo, las alteraciones en el metabolismo lipídico y glucémico, la disfunción endotelial, y factores inmunológicos e infecciosos.

ATEROSCLEROSIS E INFLAMACIÓN.

En las últimas dos décadas uno de los aspectos que ha suscitado mayor interés en el campo de la investigación cardiovascular es la relación que existe entre aterosclerosis e inflamación. Ya desde las primeras descripciones histopatológicas y la formulación de las primeras teorías sobre el desarrollo de la aterosclerosis, se puso en evidencia el papel clave que desempeña el proceso inflamatorio en la patogenia y el desarrollo de la aterosclerosis (Jonasson L et al, 1986). Hoy día se considera la aterosclerosis una enfermedad inflamatoria en la que interviene tanto su componente celular como humoral (Ross R. 1999). En ella concurren diversos tipos celulares como son monocitos, macrófagos, linfocitos T y células musculares lisas, así como una gran variedad de factores humorales, citocinas y otros mediadores de la inflamación, entre los cuales se incluyen quimiocinas, moléculas de adhesión vascular e intercelular, selectinas, factores estimulantes del crecimiento de colonias de células inflamatorias como granulocitos y macrófagos, e interleucinas activados inicialmente por partículas

de colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad (LDL-colesterol) oxidadas (OxLDL) (Libby P et al, 2002).

Función que desempeña la proteína C reactiva (PCR) en la aterosclerosis.

La mejor evidencia sobre el papel que ejerce la inflamación en la patogénesis de la aterosclerosis la proporciona el estudio de la asociación existente entre diversos marcadores de la inflamación y el riesgo de desarrollo de aterosclerosis. En los seres humanos el hígado, en respuesta a un estímulo inflamatorio, sintetiza y secreta al torrente sanguíneo diversas proteínas denominadas reactantes de fase aguda. El prototipo y más estudiado reactante sérico de fase aguda es la PCR. Su denominación proviene de su capacidad de precipitar el polisacárido C somático del *Streptococcus pneumoniae*. Se trata de una proteína de estructura pentamérica, perteneciente a la familia de las pentraxinas que son proteínas plasmáticas fijadoras de ligandos calcio-dependiente, otro de cuyos miembros, en humanos, es el componente amiloide sérico P. El estímulo para la síntesis y secreción de la PCR es mediado por citocinas, fundamentalmente la interleucina-6 (IL-6) producida, esencialmente, por monocitos activados. La concentración sanguínea de PCR comienza a aumentar entre 6 y 12 horas después de la estimulación hepática por IL-6 (Pepys MB, Hirschfield GM, 2003). El mecanismo de acción y papel exacto que desempeña la PCR como sustancia moduladora en el proceso inflamatorio no está bien establecido. Se le atribuyen acciones tanto pro-inflamatorias como anti-inflamatorias. Parece jugar un papel en la inmunidad natural, contribuyendo a los mecanismos defensivos del huésped frente a infecciones, facilitando la opsonización y el incremento de la fagocitosis de agentes infecciosos, e incluso de células necróticas y apoptóticas (Pepys MB, Hirschfield GM, 2003).

En los últimos años se ha puesto en evidencia que la PCR puede desencadenar multitud de efectos biológicos sobre la superficie endotelial que facilitan o contribuyen a la expresión de manifestaciones proinflamatorias y proaterogénicas, al provocar una situación de verdadera disfunción endotelial, induciendo a la liberación de citocinas y la expresión de moléculas de adhesión superficiales por parte de las células endoteliales. La PCR inhibe la producción endotelial de óxido nítrico (NO), potente factor relajante derivado del endotelio, lo cual facilita la apoptosis de las células endoteliales y bloquea la angiogénesis; estimula la liberación de endotelina-1 e IL-6 por parte de las células endoteliales; activa la expresión de moléculas de adhesión como la molécula de

adhesión intercelular-1 (ICAM-1), la molécula de adhesión vascular celular-1 (VCAM-1) y la Selectina-E; y estimula la liberación de la proteína quimiotáctica para macrófagos-1 (MCP-1), quimiocina que facilita la trans migración leucocitaria (Pasceri V et al, 2000; Verma S et al, 2004). Así mismo, la PCR regula al alza al factor de transcripción nuclear $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$), factor clave en la transcripción de numerosos genes pro-ateroscleróticos (Verma S et al, 2003).

Varios estudios ponen de manifiesto que los niveles sanguíneos de PCR son un potente predictor de riesgo cardiovascular ante situaciones clínicas diversas: tanto en mujeres como hombres sin franca enfermedad cardiovascular (Ridker PM et al, 2000; Ridker PM et al, 2000 bis), en pacientes con angina estable, síndrome coronario agudo (Biasucci LM et al, 1999), post-infarto de miocardio, síndrome metabólico (Ridker PM et al, 2003) y síndrome X cardíaco (Kaski JC, 2004). Ésta predicción no sólo se ciñe a riesgo de infarto de miocardio y muerte cardiovascular, sino que también se extiende a riesgo de muerte súbita, de ictus isquémico, de episodios vasculares periféricos, y de re-estenosis tras intervencionismo mediante angioplastia coronaria percutánea (Blake GJ, Ridker PM, 2002).

Función que desempeñan las citocinas en la aterosclerosis.

Las citocinas (del griego *Cytos*- "célula" y *-kinein* "mover") son péptidos immuno-moduladores, agentes responsables de la comunicación intercelular, producidos como respuesta a la agresión a un tejido, cuya función fundamental consiste en la regulación de la respuesta inflamatoria. Actúan, en general, a través de receptores de alta afinidad en la superficie celular, ejerciendo diversas acciones: inducen la activación de receptores específicos de membrana, poseen funciones de proliferación y diferenciación celular, quimiotaxis, crecimiento, y modulación de la secreción de inmunoglobulinas. La mayoría de las citocinas son moléculas multifuncionales y tienen acciones solapadas. Son producidas, fundamentalmente, por linfocitos y macrófagos activados, aunque también pueden ser producidas por leucocitos polimorfonucleares, células endoteliales, células epiteliales y del tejido conjuntivo. El término citocina engloba a miembros de las subfamilias de las interleucinas (IL), del factor de necrosis tumoral (TNF) y del interferón (IFN). Hay citocinas con actividad fundamentalmente pro-inflamatoria tales como la IL-1, la IL-6, la IL-12, la IL-18, el TNF- α , la MCP-1, y otras con actividad fundamentalmente anti-inflamatoria tales como la IL-4 y la IL-10 (Mills R, Bhatt DL, 2004).

Las IL son producidas fundamentalmente por los leucocitos, pero también por células endoteliales y células musculares lisas las cuales pueden producir activamente y responder a tales estímulos. Actualmente se conocen 26 miembros de ésta familia, denominados desde IL-1 a IL-26, que abarcan un amplio espectro de funciones efectoras tales como la activación celular, diferenciación, quimiotaxis y proliferación sobre un amplio abanico de dianas celulares. Evidencias científicas sostienen la implicación de las IL-1, -4, -8, 10, -12, -15, y -18 en la patogénesis de la aterosclerosis (Young JL et al, 2002).

También está implicado en la aterogénesis el TNF. El TNF es una molécula pro-inflamatoria reconocida inicialmente como factor inductor de la muerte celular en tumores murinos. Junto al primero de los descritos, el TNF- α , la superfamilia de los ligandos del TNF incluye al ligando del Fas (CD95L) y el ligando del CD40 (CD40L, CD154) (Young JL et al, 2002; Blake GJ, Ridker PM, 2002 bis).

Los IFN, contemplados inicialmente como agentes antivirales no específicos, ejercen también un papel inmunomodulador y citostático, entre los cuales, el IFN- β y el IFN- γ están implicados en la aterosclerosis (Young JL et al, 2002; Harvey EJ, Ramji DP, 2005).

La aterogénesis es un proceso complejo, por lo cual cualquier intento de clasificación categórica posiblemente incurriría en una excesiva simplificación. No obstante, podemos distinguir tres fases en la evolución gradual de la placa aterosclerótica, en cada una de las cuales las citocinas juegan un papel clave: el inicio de la formación de la placa, la progresión de la placa y las lesiones ateroscleróticas avanzadas. Las lesiones características de cada fase representan los distintos estadios del proceso inflamatorio crónico que sucede en la pared arterial. Este proceso, cuando se convierte en imparable y excesivo, conducirá a lesiones avanzadas complicadas (Ross R, 1999)

DISFUNCIÓN ENDOTELIAL: FENÓMENO INICIAL EN PROCESO ATEROSCLERÓTICO.

La hipótesis de respuesta a la injuria sitúa a la disfunción endotelial -más que a la denudación del endotelio- en los primeros estadios de la aterogénesis. El endotelio vascular posee una serie de funciones para mantener la homeostasis vascular. Su superficie, no trombogénica ni adherente, permite el intercambio de numerosas sustancias entre la sangre y los tejidos (Vane JR et al 1990). Produce y libera sustancias

vasodilatadoras como el óxido nítrico (NO) y la prostaciclina (PGI₂) y sustancias vasoconstrictoras como la endotelina, el tromboxano A₂ (TXA₂) y la angiotensina II (AII), de cuyo balance depende el tono vascular (Vanhoutte PM, 2003). Modula el crecimiento de las células musculares lisas, la coagulación, la fibrinólisis y la adhesión de células sanguíneas a la pared vascular a través de factores promotores e inhibidores del crecimiento, de mediadores de la inflamación como moléculas de adhesión y de factores hemostáticos, así como el activador tisular del plasminógeno (t-PA) y el inhibidor de t-PA tipo I. Sus acciones se encuentran en equilibrio en condiciones normales (DiCorleto PE, 1993). En presencia de factores como niveles elevados de partículas de LDL-colesterol modificadas, la formación de radicales libres, el estrés hemodinámico, la hipertensión arterial e infecciones por ciertos agentes como *Clamydia pneumoniae* o *herpesvirus*, o combinaciones de estos u otros factores, el endotelio vascular se torna disfuncionante y promueve la liberación de citocinas pro-inflamatorias, entre ellas especialmente la IL-1 y el TNF- α , que ejercen multitud de efectos pro-aterogénicos y provocan una respuesta arterial altamente peculiar (Ross R, 1999; Libby P et al, 2002): se produce un aumento de la expresión de moléculas de adhesión para leucocitos y plaquetas -receptores para glicoconjugados e integrinas-sobre la superficie endotelial (selectina-E, selectina-P, ICAM-1, VCAM-1, CD40, CD40L); migración y acumulación de monocitos y linfocitos T, provocadas por moléculas de adhesión de plaquetas y células endoteliales junto al concurso de quimiocinas como la MCP-1, osteopontina y partículas de LDL-colesterol modificadas. El endotelio expresa entonces propiedades pro-coagulantes en lugar de anticoagulantes; aumento de la permeabilidad; producción de sustancias vasoactivas; citocinas y factores de crecimiento que promueven la proliferación celular, contribuyen a la formación de especies reactivas con el oxígeno, estimulan metaloproteinasas de la matriz e inducen la expresión del factor tisular (TF) como fenómenos característicos (Ross R, 1999).

La disfunción endotelial aparece y las lesiones ateroscleróticas se asientan, con mayor frecuencia, en aquellas zonas de las arterias donde existe bifurcación, ramificación o acodamiento. La alteración del flujo en dichas zonas parece jugar algún papel en este fenómeno en el cual, como consecuencia de una menor velocidad de flujo y menor presión de rozamiento, se produciría la interrupción del flujo sanguíneo laminar normal (Fuster V et al, 1992). El NO desempeña una función fundamental en estas circunstancias. El NO es una molécula anti-aterogénica por excelencia debido a su acción relajante, anti-proliferativa, anti-trombótica y anti-oxidante (Cooke JP, Tsao PS,

1994; Hummel SG et al, 2006). La presión de rozamiento sobre la pared vascular es el estímulo físico de mayor influencia en la generación de NO: cuanto mayor sea aquella mayor será la producción de NO. El NO se genera a partir del aminoácido L-arginina por acción de la enzima óxido nítrico sintetasa (NOS). Existen tres isoenzimas de NOS, dos isoenzimas constitutivas -la NOS-I del tejido neurológico y la NOS-III de las células endoteliales (e-NOS)- que sintetizan pequeñas cantidades de NO, y una isoenzima inducible -la NOS II (iNOS)- que se expresa especialmente en los macrófagos, por acción de la IL-1 y el IFN- γ , y que sintetiza de forma sostenida grandes cantidades de NO.

El NO a concentración elevada es citotóxico (Joshi MS et al, 1999; Racheh LI et al, 2006). Alteraciones en el metabolismo del NO pueden condicionar una situación de disfunción endotelial y respuestas vasculares anormales. Así ocurre por disminución del sustrato para su síntesis, la L-arginina, causada por la hipercolesterolemia (Girerd XJ et al, 1990); o por aumento de la concentración de peroxinitrito (ONOO⁻), producto de la oxidación del NO con potentes acciones oxidantes, que puede iniciar la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) atrapadas en el subendotelio (White CR et al, 1994). A su vez, las LDL oxidadas (OxLDL) pueden inhibir la activación de la síntesis de NO e incluso reducir la expresión de la NOS. (Vidal F et al, 1998).

Las acciones del NO son antagonizadas por la liberación de las células endoteliales de AII, sintetizada por acción de la enzima convertidora de la angiotensina (ECA). Sus acciones, ejercidas a través de los receptores AT-1 son pro-trombogénicas, oxidantes y pro-inflamatorias: vasoconstricción, expresión de moléculas de adhesión, estimulación de factores de crecimiento y proliferación celular. Del equilibrio de estas sustancias depende, pues, la prevalencia de una situación anti-aterogénica o de una situación pro-aterogénica (Weiss D et al, 2001; Saini HK et al, 2005).

En resumen, a nivel de determinadas zonas de la pared arterial condiciones hemodinámicas peculiares son capaces de desencadenar una serie de respuestas biomoleculares que permiten la expresión de genes que poseen, en sus regiones promotoras, elementos que responden al estrés parietal. Tal es el caso de genes cuya expresión aumenta ante un estrés parietal reducido como son los que codifican la expresión de la ICAM-1 (Nagel T et al, 1994), el factor de crecimiento derivado de plaquetas de cadena beta (PDGF- β) (Resnick N et al, 1993) y el TF en las células endoteliales (Lin MC et al 1997).

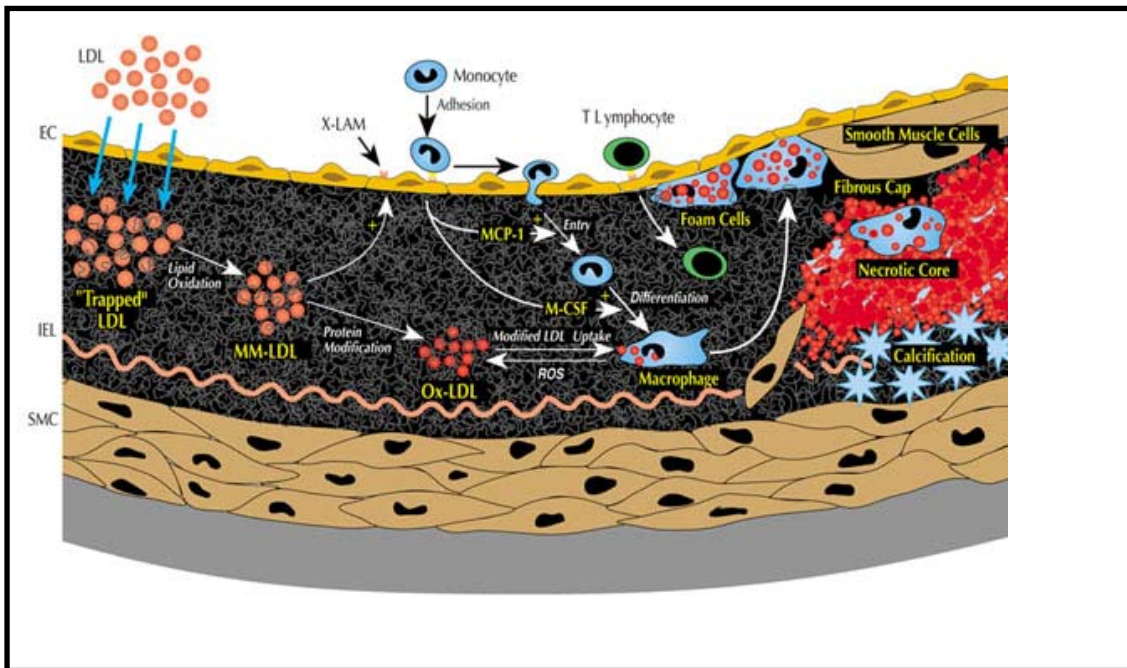


Figura 1: Representación esquemática de la evolución de la placa aterosclerótica. En respuesta a una injuria se produce la disfunción del endotelio. La producción de interleucinas pro-inflamatorias provoca la expresión de moléculas de adhesión para monocitos y linfocitos T a favor de un gradiente quimiotáctico generado por las LDL-oxidadas y quimiocinas como la MCP-1. Los monocitos se diferencian hacia macrófagos por acción de la M-CSF, quienes expresan sus recolectores para las LDL oxidadas y se convierten en células espumosas. Los macrófagos secretan múltiples citocinas que promueven la migración de células musculares lisas desde la túnica media hacia la íntima y promueven su proliferación. Las células musculares lisas sintetizan fibras colágenas, principal componente del tejido fibroso que recubre la placa. En las fases más avanzadas la lesión se caracteriza por un acúmulo de lípidos y escasa celularidad, debido a la apoptosis de las células musculares lisas y macrófagos, formando un núcleo compuesto por contenido lipídico y tejido necrótico. **EC:** células endoteliales; **IEL:** lámina elástica interna; **SMC:** células musculares lisas; **LDL:** partículas de LDL-colesterol; **“Trapped” LDL:** partículas de LDL-colesterol atrapadas en la pared vascular; **Lipid oxidation:** oxidación lipídica; **MM-LDL:** partículas de LDL-colesterol modificadas; **Ox-LDL:** partículas de LDL-colesterol oxidadas; **ROS:** especies reactivas de oxígeno; **Modified LDL uptake:** captación de partículas de LDL-colesterol modificadas; **Macrophage:** macrófagos; **MCP-1:** proteína quimiotáctica para monocitos-1; **M-CSF:** factor estimulante de colonias de macrófagos; **X-LAM:** moléculas de adhesión celular; **Monocyte:** monocitos; **T lymphocyte:** linfocitos T; **Foam Cell:** células espumosas; **Smooth muscle cells:** células musculares lisas; **Fibrous Cap:** cápsula fibrosa; **Necrotic core:** núcleo necrótico. (modificado de Berliner and Haberland)

El aumento en la expresión de moléculas de adhesión en el endotelio y leucocitos facilita la rotación y adhesión de monocitos y células T en estas zonas. Diversas quimiocinas provocan la migración de monocitos y macrófagos. Éstos, junto a la acumulación de partículas de LDL-colesterol, proteínas, y la activación de fenómenos inflamatorios en la pared arterial, dan lugar a la estría grasa que es la lesión precursora en la formación de la placa aterosclerótica. La respuesta inflamatoria en la pared vascular estimula la migración y proliferación de células musculares lisas. Las células musculares lisas se entremezclan con monocitos, macrófagos y linfocitos en las zonas

de inflamación. La activación de estos tipos celulares provoca la liberación de enzimas proteolíticas, citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento que inducen más daño y necrosis focal. La sucesiva repetición en la pared arterial de estos fenómenos de acumulación mononuclear y macrofágica, migración y proliferación de células musculares lisas y formación de tejido fibroso producirá la progresión de la lesión aterosclerótica (Figura 1). La progresión de la lesión da lugar a la formación de una lesión avanzada, que albergando en su interior un núcleo lipídico y tejido necrótico, protruye hacia el interior de la luz vascular y limita el flujo sanguíneo (Stary HC, 1996; Libby P & Ross R, 1996; Raines EW et al, 1996).

DESENCADENANTES DE LA INFLAMACIÓN EN LA ATEROGÉNESIS.

Hipercolesterolemia, LDL-colesterol e inflamación.

Observaciones experimentales en animales han demostrado la asociación entre la presencia de aterosclerosis acelerada y dietas ricas en colesterol. De igual manera, estudios epidemiológicos en humanos han puesto de manifiesto la incidencia creciente de aterosclerosis cuando los niveles de colesterol exceden de 150 mg/dl (NCEP II. Second report of the Expert Panel on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. 1993). La presencia de partículas de LDL-colesterol, modificadas por oxidación, glicación, agregación, asociación con proteoglicanos, o incorporadas a inmunocomplejos provocan lesión del endotelio y de las fibras musculares lisas subyacentes. Atrapadas en la pared arterial sufren un proceso de oxidación, son captadas por macrófagos, que las internalizan, convirtiéndose en células espumosas. Esta fase inicial "protectora" de la respuesta inflamatoria intenta limitar la acción lesiva de las partículas de LDL-colesterol (Steinberg D, 1997). Por otro lado, las partículas de LDL-colesterol modificadas tienen propiedades quimiotácticas para otros monocitos, regulan al alza la expresión de genes que codifican la síntesis del M-CSF y MCP-1 derivada del endotelio, señales que tienden a expandir la respuesta inflamatoria (Leonard EJ, Yoshimura T, 1990). La respuesta inflamatoria, por si misma, tiene un profundo efecto sobre el movimiento de las lipoproteínas a través de la pared vascular, puesto que mediadores de inflamación como el TNF- α , la IL-1 y el M-CSF aumentan la captación de partículas de LDL-colesterol por el endotelio y las fibras musculares lisas, e incrementan la transcripción del gen del receptor de las LDL. La unión de las partículas de LDL-colesterol modificadas a sus recolectores (*scavengers*) provoca, a su vez, inducción de urocinasa e interleucinas proinflamatorias como la IL-1. Se crea,

pues, un círculo vicioso de inflamación - modificación de LDL - más inflamación (Ross R, 1999).

Diabetes e inflamación.

La hiperglucemia que caracteriza a la diabetes mellitus provoca la modificación de macromoléculas, como la formación de productos finales de glicación avanzados, que unidos a receptores de superficie incrementan la producción de citocinas proinflamatorias y otras vías de inflamación en las células endoteliales vasculares. Además, la diabetes promueve un estado de estrés oxidativo mediatizado por especies reactivas de oxígeno y grupos carbonilo (Libby P et al, 2002).

Obesidad e inflamación.

La obesidad predispone a resistencia insulínica, diabetes y dislipemia. Además, el tejido adiposo puede sintetizar citocinas como IL-6 y el TNF- α . De esta forma la obesidad, por sí misma, promueve la inflamación y potencia la aterogénesis de forma independiente a su efecto sobre la resistencia insulínica o las lipoproteínas (Yudkin JS et al, 1999).

Hiperhomocisteinemia e inflamación.

Estudios de autopsia en pacientes con defectos homocigóticos en enzimas necesarias en el metabolismo de la homocisteína pusieron en evidencia su relación con aterosclerosis avanzada en edades tempranas de la vida. La hiperhomocisteinemia es tóxica para el endotelio, es protrombótica, aumenta la producción de colágeno y disminuye la disponibilidad de óxido nítrico (Nehler MR et al, 1997).

Hipertensión arterial e inflamación.

En pacientes con hipertensión arterial, a menudo están presentes concentraciones elevadas de A II. La A II es un potente vasoconstrictor, estimula el crecimiento del músculo liso vascular, a través de la activación de la fosfolipasa C que provoca aumento en las concentraciones de calcio intracelular, favorece la contracción muscular lisa, el aumento de síntesis proteica y la hipertrofia del músculo liso. Incrementa la actividad de la lipooxigenasa, promoviendo la inflamación y la oxidación de las partículas de LDL-colesterol (Weiss A et al, 2001). La hipertensión arterial promueve también acciones proinflamatorias, aumentando la formación de peróxido de hidrógeno y de radicales

libres, que reducen la formación de NO endotelial, aumenta la adhesividad de los leucocitos promoviendo la expresión de VCAM-1 en la superficie endotelial, incrementa la expresión de citocinas proinflamatorias como la IL-6 y MCP-1 por las células musculares lisas vasculares e incrementa las resistencias periféricas (Chobanian AV & Dzau VJ, 1996).

Infección e inflamación

Algunas observaciones han relacionado a agentes infecciosos como *Clamidia pneumoniae* y *herpesvirus* con la patogenia de la aterosclerosis, identificándose ambos microorganismos en lesiones ateromatosas. Sin embargo no existen evidencias directas de que los mismos pudieran ser agentes causales de las lesiones, por lo que su papel permanece en cuestión. Es posible que, en algunos pacientes, este tipo de infecciones, combinadas con otros factores pudieran ser responsables de la génesis de las lesiones ateroscleróticas (Libby P, et al, 1997).

FUNCIÓN QUE DESEMPEÑA LA INFLAMACIÓN EN LA ROTURA DE LA PLACA ATEROSCLERÓTICA.

El proceso inflamatorio no sólo inicia y promueve la aterogénesis. También contribuye, de forma decisiva, al desencadenamiento de la trombosis y las consiguientes manifestaciones clínicas que la caracterizan: los síndromes coronarios agudos. Numerosas células macrofágicas presentes en las placas, al activarse, producen enzimas proteolíticas capaces de degradar las fibras de colágeno que confieren robustez a la fina capa fibrosa que recubre el núcleo lipídico de las mismas. Esta capa fibrosa se torna, pues, fina, débil, y propensa a la ruptura. Los linfocitos T activados producen IFN- γ que, su vez, frena la producción de nuevo colágeno por parte de las células musculares lisas presentes en las placas de ateroma. Estos procesos limitan, como es obvio, la renovación del colágeno de la capa fibrosa y el reforzamiento de la placa. De forma adicional, los macrófagos producen TF, la sustancia con mayor efecto pro-coagulante y promotor de trombosis encontrado en las placas, cuya expresión está también regulada por mediadores de la inflamación (Libby P, Simon DI, 2001).

BASES ANATÓMICAS Y FISIOLÓGICAS DE LOS RITMOS BIOLÓGICOS: LA GLÁNDULA PINEAL.

Ya desde la Antigüedad las doctrinas médicas se ocuparon, en gran medida, del tiempo y de las variaciones periódicas de los fenómenos biológicos en la salud y en la enfermedad. Así, desde tiempos de Aristóteles y luego Galeno, se describen la periodicidad del sueño y la vigilia como expresiones de un ritmo generado por relojes biológicos internos. Desde el siglo XVII se conocen las variaciones de la frecuencia cardíaca y la presión arterial a lo largo del día y de la noche. Los ritmos biológicos no constituyen un fenómeno casual ni pasivo, sino que forman parte de una adaptación al entorno, fundamental para la supervivencia de las especies. Su persistencia en situaciones de condiciones ambientales constantes implica la existencia de un “reloj endógeno” que genera los ritmos y controla la periodicidad de ciertas variables. En el hombre, las funciones de este “reloj endógeno” las desarrolla el núcleo supraquiasmático que se encuentra en las paredes del tercer ventrículo cerebral, por debajo del hipotálamo y detrás del quiasma óptico. La glándula Pineal es su "transductor" neuroendocrino. (Cassone VM, Natesan AK, 1997).

La glándula Pineal, descrita por Renè Descartes hace 300 años como el lugar donde asienta el "alma", es un órgano evolutivo antiguo situado en el centro del cerebro, en la pared dorsal del diencéfalo, detrás del tercer ventrículo, que en los mamíferos ha perdido su conexión neural directa con el cerebro. Está compuesta por dos tipos celulares: pinealocitos, predominantemente, que sintetizan y secretan indolaminas (principalmente melatonina), otros péptidos y aminos biogénicas; y células de la neuroglía. La glándula Pineal está altamente vascularizada (Brzezinski A, 1997).

A finales de los años 50 del siglo pasado, partiendo de extractos de Pineal bovina, se identificó la melatonina, que se denominó así debido a su capacidad para provocar la agregación de los gránulos de melanina y así aclarar el color de la piel de las ranas. (Lerner AB et al, 1958). La biosíntesis de la melatonina se realiza a partir del aminoácido triptófano, que por acción de una triptófano hidroxilasa pasa a 5-hidroxitriptófano, que es decarboxilado, formándose serotonina. La serotonina, por acción de dos enzimas (arilalquilamina N-acetiltransferasa e hidroxindol-O-metiltransferasa) se transforma en melatonina. A parte de la glándula Pineal, la melatonina se sintetiza en concentraciones muy diversas en otros lugares, cuyo papel en

estos es todavía objeto de estudio (Reiter RJ, 1991; Kvetnoy I, 2002). La melatonina se metaboliza por hidroxilación en el hígado donde es conjugada a derivados sulfatados (70-80%) o glucuronizados (5%) (Cardinali DP, 1981). Estos conjugados se eliminan en orina en forma de 6-sufatoximelatonina (Markey SP et al, 1985). Existe un metabolismo no enzimático a 3-hidroximelatonina cíclica cuando capta radicales hidroxilos (Tan DX et al, 1998).

En la glándula Pineal, tanto la síntesis como la secreción masiva de melatonina se produce durante la noche. La luz es el principal factor ambiental que regula la secreción de melatonina (Reiter RJ 1993; Brzezinski A, 1997). El estímulo lumínico procedente de la retina se transmite, a través del tracto retino-hipotalámico, al núcleo supraquiasmático del hipotálamo (“reloj biológico”) y de aquí al sistema nervioso simpático a través de fibras procedentes de los ganglios simpáticos cervicales. Los estímulos adrenérgicos (noradrenalina) alcanzan la glándula Pineal estimulando mayoritariamente receptores β - adrenérgicos en los pinealocitos. Esto estimula la producción de melatonina a través de un aumento intracelular del AMP cíclico. Estímulos α_1 -adrenérgicos también contribuyen a estimular su secreción (Pangerl B et al, 1990; Rubio A et al, 1993). La síntesis y liberación se estimulan por la oscuridad y se inhiben por la luz siguiendo un ritmo circadiano. Durante las horas de luz las células fotorreceptoras retinianas están hiperpolarizadas, situación que inhibe la liberación de noradrenalina (NA): el sistema retino-hipotalámico-pineal está quiescente. En la oscuridad los fotorreceptores liberan noradrenalina -que activa el sistema- y se produce el aumento en la actividad glandular. La melatonina se libera a la corriente sanguínea por difusión pasiva, a medida que aumenta la síntesis. Su liberación tiene lugar pronto tras el comienzo de la oscuridad, produciéndose el pico de concentración sérica (60 - 200 pg/mL) en medio de la noche, entre las 02 y 04 horas a.m. Posteriormente cae de forma gradual, siendo menores sus concentraciones séricas durante el día (10 - 20 pg/mL) (Brzezinski A, 1997). Las concentraciones séricas de melatonina varían considerablemente de acuerdo a la edad de los individuos: menor en niños menores de 3 meses; mayor y con ritmo circadiano posteriormente, con los mayores picos nocturnos en individuos entre los 1 y 3 años; luego declina gradualmente. La mayor parte de la melatonina se encuentra en plasma unida a proteínas, con una cuarta parte circulando libre (Cardinali DP et al, 1972).

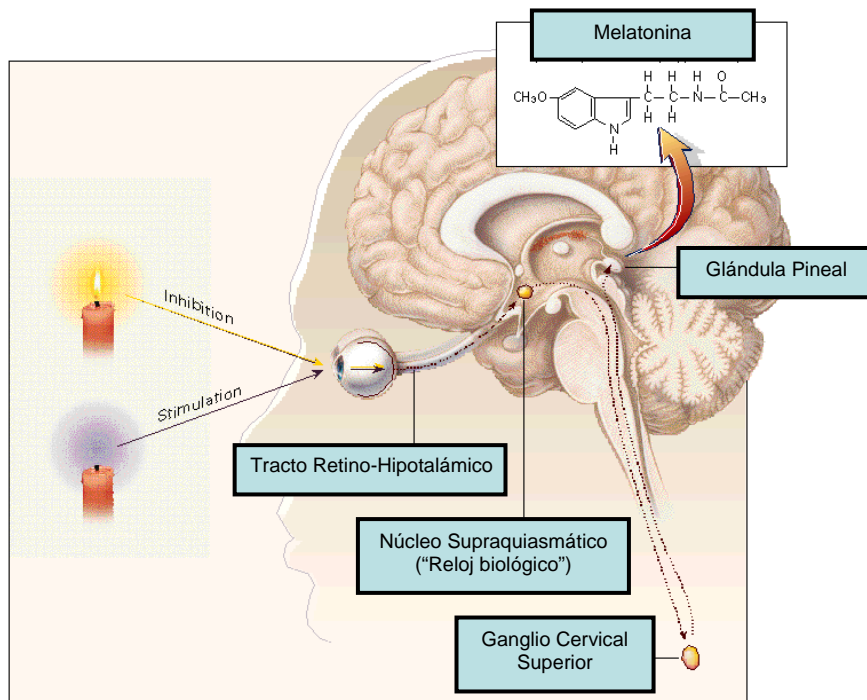


Figura 2: representación gráfica esquemática de la anatomía de la vía retino-hipotalámico-pineal (modificado de Brzezinski A, 1997).

La melatonina regula diversas funciones fisiológicas y neuroendocrinas y lo hace a través de receptores específicos MT_1 (alta afinidad) y MT_2 (baja afinidad) y también intracelularmente. Inicialmente se describieron sus acciones en relación con el eje neuroendocrino-reproductivo (Reiter RJ, 1980). No obstante, numerosas observaciones realizadas posteriormente han puesto en evidencia sus múltiples funciones inmunomoduladoras, antioxidantes, oncostáticas y antienvjecimiento (Guerrero JM, Reiter RJ, 2002; Reiter RJ, 2003; Carrillo-Vico A et al, 2003; Macchi MM, Bruce JN, 2004).

En los últimos años se han descrito las interesantes funciones inmunomoduladoras que ejerce la melatonina, tanto en la vertiente celular como humoral. Se ha puesto en evidencia su capacidad para incrementar de peso el timo y el bazo, incrementar la capacidad proliferativa de los linfocitos, promover el aumento del número de células “natural killer” y monocitos en la médula ósea, e incrementar el número y respuesta de las células productoras de anticuerpos (Maestroni GJ, 1993; Guerrero JM, Reiter RJ, 2002). También se ha demostrado que tiene la capacidad de regular la expresión génica y producción de múltiples mediadores de la inmunidad,

aumentar la capacidad de los macrófagos de presentación de antígenos a las células T, incrementar la expresión de las moléculas del sistema mayor de histocompatibilidad de clase II, aumentar producción de IL-1 y TNF- α , y regular al alza la expresión génica de M-CSF, TNF- α , el factor transformador del crecimiento de tipo β (TGF- β), así como IL-1 β e INF γ , entre otras (Carrillo-Vico A et al, 2005).

De igual manera, especial interés suscita la actividad antioxidante de la melatonina, la cual ejerce a través de la capacidad que tiene para captar directamente especies reactivas de oxígeno -sustancias altamente tóxicas – actuando como recolector (*scavenger*) de radicales libres. A través de esta actividad tiene la capacidad de proteger del daño oxidativo, sobre todo al DNA celular, ante ciertas circunstancias (Cuzzocrea S, Reiter RJ, 2001; Reiter RJ, Tan DX. 2003).

RITMOS CIRCADIANOS DE PRESENTACIÓN DE LA ENFERMEDAD ATEROSCLERÓTICA Y FENÓMENOS DESENCADENANTES.

En los últimos 20 años un conjunto de evidencias han contribuido a establecer la idea de la importancia de los desencadenantes como factores de riesgo transitorios que, a corto plazo, pudieran dar lugar al inicio de las manifestaciones agudas de la enfermedad coronaria: la comprobación de la existencia de una distribución no uniforme, un patrón circadiano, del momento de inicio de las manifestaciones clínicas de los accidentes cardiovasculares sugirió que podían estar, de forma alguna, asociados a o desencadenados por fenómenos que muestran una organización temporal similar: por ritmos fisiológicos que presentan un pico de actividad en un determinado momento del día o de la noche. Este conocimiento no sólo tiene trascendencia en la mejor comprensión de la patogenia de la enfermedad coronaria, sino que pudiera tener, además, un beneficio clínico con potenciales implicaciones terapéuticas: el diseño de estrategias de intervención dirigidas a romper el enlace entre un agente desencadenante y el desarrollo de las manifestaciones clínicas de la enfermedad.

En uno de los primeros artículos publicados, en el que se abordaron estos aspectos, Obratzsov y Strazhesko, en 1910, sugirieron que sucesos identificables como subir escaleras, discusiones desagradables y estrés emocional podían preceder al inicio de la enfermedad coronaria aguda (Obratzsov VP, Strazhesko ND, 1910). Estas impresiones iniciales fueron luego confirmadas por otros (Phipps C, 1936). Posteriormente Master cuestiona estas teorías al no encontrar tal relación (Master AM, 1960). Observaciones realizadas posteriormente revitalizaron de nuevo estos conceptos,

al encontrarse una tendencia a la frecuencia matutina de esta patología y confirmaron, de forma irrefutable, la existencia de un ritmo circadiano, con un evidente pico matutino, en la presentación del infarto agudo de miocardio (Muller JE et al, 1985; Willich SN et al, 1989; Tofler GH et al, 1992), así como en la presentación de otras manifestaciones de la patología cardiovascular como la muerte súbita (Willich SN et al, 1987), los accidentes isquémicos cerebro-vasculares (Marler JR et al, 1989), y la isquemia coronaria clínica o silente (Rocco MB et al, 1987). No está completamente claro y comprendido el mecanismo fisiopatológico que subyace tras esta desigual distribución de los accidentes cardiovasculares isquémicos. Se apunta al papel que pudieran jugar el sistema nervioso simpático y factores neuro-humorales con propiedades vaso-activas. La frecuencia cardíaca, la presión sanguínea, los niveles plasmáticos de norepinefrina, la actividad de renina plasmática, y, probablemente también, la contractilidad presentan variaciones diurnas, estando aumentados a primeras horas de la mañana (Hernandes Fernandes E et al, 2000). Ello indica que el incremento en las demandas miocárdicas de oxígeno contribuye, de forma importante, en el aumento de la incidencia de los ataques isquémicos a determinadas horas del día y ante determinadas situaciones. A ello hay que sumar factores que muestran variaciones circadianas como es la expresión de la endotelina-1, la agregabilidad plaquetaria, y niveles elevados de cortisol que facilitan las acciones de las catecolaminas (Li JJ, 2003), que directa o indirectamente aumentan el tono vasomotor, provocando la incapacidad de aumentar el aporte sanguíneo coronario, o incluso la disminución del mismo, por una respuesta vasoconstrictora paradójica del endotelio aterosclerótico.

El desencadenamiento de los síndromes coronarios agudos se encuentra en íntima relación con la rotura de una placa aterosclerótica. Éste fenómeno se ha ligado con el aumento de factores neuro-humorales, el aumento de la presión arterial y el aumento del tono coronario, en ocasiones provocados por fenómenos desencadenantes como el estrés mental, el ejercicio físico, y la tensión emocional. Observaciones recientes han demostrado, de forma fehaciente, variaciones circadianas en la incidencia de la ruptura de placa como fenómeno que provoca el infarto agudo de miocardio (Tanaka A et al. 2004). Existen variaciones diurnas en la respuesta vasodilatadora dependiente del endotelio en sujetos sanos (Otto ME et al, 2004; Gaenger H et al, 2000). Este fenómeno podría ejercer un papel protector o contrarrestar los efectos potencialmente adversos de las variaciones diurnas de factores hemodinámicos u otros parámetros. En pacientes con enfermedad arterial coronaria, este tipo de respuesta se

encuentra ausente, como expresión de disfunción endotelial. Ello pudiera contribuir también al desigual patrón de presentación clínica de los síndromes coronarios agudos (Shaw JA et al, 2001).

El aumento en la coagulabilidad de la sangre, la disminución en la actividad fibrinolítica del plasma, y el aumento en la agregabilidad plaquetaria contribuyen, en gran manera, al desencadenamiento de los síndromes coronarios agudos. Se ha demostrado que estos fenómenos también presentan variaciones diurnas en su actividad (Andreotti F, Klufft C, 1991) y que este hecho tiene gran influencia sobre la efectividad de determinadas terapias empleadas en el infarto agudo de miocardio como la trombolisis (Becker RC, Corrao JM, 1989).

VARIACIONES CIRCADIANAS DE LAS CITOCINAS Y OTROS MEDIADORES DE LA INFLAMACIÓN.

El estudio de la actividad, tipos celulares, marcadores y mediadores de inflamación en sujetos sanos ha demostrado que determinados parámetros en el plasma siguen variaciones diurnas (Haus E et al, 1990; Kanikowska D et al, 2001). Se ha documentado variaciones circadianas en los niveles circulantes de diferentes subpoblaciones de linfocitos T: linfocitos T totales, linfocitos T helper y del cociente linfocitos T helper / linfocitos T supresores–citotóxicos, con acmé a las 04:30 h a.m (Levi F et al, 1988). Algunos estudios han demostrado la existencia, en sujetos sanos, de variaciones diurnas en los niveles de citocinas pro–inflamatorias tales como el TNF– α , la IL–1 β , la IL-6, y la IL-12 con mayores niveles a última hora de la noche y primera hora de la mañana (Gudewill S et al, 1992; Sothorn RB et al, 1995; Petrovsky N, Harrison LC, 1998; Petrovsky N et al, 1998; Kanabrocki EL et al, 1999). De la misma manera, debería encontrarse la misma ritmicidad diurna en las proteínas reactantes de fase aguda y otros marcadores inflamatorios, cuya producción es estimulada por estas citocinas. Se ha demostrado, en sujetos sanos, variaciones diurnas bajo la influencia de diferentes intensidades de luz, en los niveles de algunas proteínas reactantes de fase aguda como la transferrina, la α_2 –macroglobulina y la haptoglobina (Kanikowska D et al, 2001). Sin embargo, no se ha encontrado en los mismos variaciones diurnas en las concentraciones de PCR (Meier-Ewert HK et al, 2001).

Algunas moléculas de adhesión celular también muestran, en sujetos sanos, variaciones circadianas. Así se ha demostrado con los niveles de selectina-E y con los niveles de ICAM-1 (Maple C et al, 1998), y de selectina-P en sujetos sanos y pacientes

con enfermedad coronaria (Osmancik P et al, 2004). También se ha documentado variaciones diurnas de los niveles de NO, del inhibidor total de la vía del factor tisular (T-TFPI) (Kanabrocki EL et al 2001), de los niveles séricos del M-CSF (Dinçol D et al 2000) y de otros marcadores séricos de activación plaquetaria, como lo es la β -trombomodulina, que presenta variaciones diurnas con nadir a las 07:00 h a.m. y acmé a las 03:00 h p.m.

OBJETIVOS

Es conocido que la glándula Pineal ejerce un papel fundamental en la modulación del sistema neuroendocrino, funcionando como un verdadero “transductor biológico”, a través de la síntesis y secreción de su principal producto hormonal, la melatonina. La síntesis y liberación de melatonina se estimulan, aumentando su concentración sanguínea, en la fase de oscuridad y se inhiben, disminuyendo su concentración sanguínea, en la fase de luz, durante el día, siguiendo un ritmo circadiano. Varios estados patológicos pueden afectar a este ritmo circadiano de la melatonina. Concretamente, diversas situaciones de isquemia coronaria se han asociado con un déficit sérico nocturno de melatonina (Brugger P et al , 1995; Altun A et al, 2002). Recientemente se ha descrito que el infarto agudo de miocardio también se asocia con un déficit sérico nocturno de esta hormona pineal (Domínguez Rodríguez A et al, 2002). Hasta el momento actual se desconoce si éste déficit o reducción de los niveles endógenos nocturnos de melatonina, en estas condiciones patológicas, es causa o efecto de las mismas; o incluso si el déficit de melatonina pudiera estar en relación con el compromiso de la función cardiovascular que generan.

En los últimos años numerosos estudios han focalizado su atención en el papel que juega la inflamación en la patogénesis de la aterosclerosis y la intervención en la misma de diversos tipos celulares del sistema inmunitario, citocinas y otros mediadores de la inflamación. A pesar de la clara relación que existe entre los sistemas neuroendocrino e inmunitario y la establecida ritmicidad circadiana del sistema neuroendocrino, la posibilidad de que el sistema inmunitario también fluctúe rítmicamente no ha sido ampliamente estudiada en pacientes con infarto agudo de miocardio. Observaciones recientes han documentado la existencia de variaciones diurnas en los niveles séricos de algunos de estos mediadores de inflamación en pacientes con infarto agudo de miocardio (Domínguez-Rodríguez A et al, 2003), con especial mención a la IL-6. Estas variaciones pueden estar influenciadas, al menos en parte, por la propia ritmicidad de la melatonina en dichos pacientes (Domínguez-Rodríguez A et al, 2004).

Los principales objetivos de esta tesis han sido estudiar, en pacientes con infarto agudo de miocardio en la Isla de Tenerife:

1º) las variaciones diurnas de diversas citocinas pro-inflamatorias, citocinas anti-inflamatorias, y otros mediadores relacionados con la inflamación, a través de la determinación de sus niveles séricos en las fases de luz y oscuridad durante el día. Se analizaron, específicamente, la IL-1 β , la IL-6, la IL-8, la IL-10, la PCR, la neopterina,

la MPO, metaloproteinasas como la MMP-9 y el PAPP-A, las OxLDL, y moléculas adhesión como la s-VCAM-1 y el sCD40L.

2º) estudiar la relación que pudiera existir entre los niveles séricos de estas citocinas y mediadores de la inflamación, en las fases de luz y de oscuridad durante el día, con los niveles séricos de melatonina durante las mismas fases en pacientes con infarto agudo de miocardio y en controles sanos.

SUJETOS DE ESTUDIO, MATERIAL Y MÉTODOS

SUJETOS DE ESTUDIO.

Desde Enero de 2001 a Diciembre de 2002 fueron atendidos en la Unidad de Coronarias del Hospital Universitario de Canarias 155 pacientes con infarto agudo de miocardio con elevación del segmento ST. De estos 155 pacientes se excluyeron 59 por presentar diabetes mellitus, quedando como muestra total de población de estudio 96 pacientes. Todos los pacientes de la población de estudio recibieron tratamiento de revascularización coronaria mediante intervencionismo coronario percutáneo con angioplastia primaria.

Se seleccionó, así mismo, un grupo control compuesto por 84 sujetos sanos, de similar edad y sexo. El estudio se realizó de acuerdo a los principios de la *Declaración de Helsinki y de la Asamblea Médica Mundial*, y se obtuvo previamente el consentimiento informado de los participantes.

Los sujetos fueron estudiados bajo unas condiciones ambientales cuidadosamente controladas en la Unidad de Coronarias. El periodo Luz / Oscuridad en la misma fue de 14 horas (1.745 ± 33 lux) / 10 horas ($1,33 \pm 0,3$ lux); el encendido y apagado de las luces se produjo a las 07:00 horas y a las 21:00 horas, respectivamente.

Todos los sujetos del estudio, antes de ser incluidos, fueron evaluados mediante anamnesis, exploración física, radiografía de tórax y analítica de sangre. Los criterios de exclusión para los sujetos del estudio fueron: presencia de diabetes mellitus, infecciones específicas y no específicas, enfermedades autoinmunes y del tejido colágeno, enfermedades malignas, alteraciones psiquiátricas, trastornos del sueño, tratamiento previo con sedantes, antiepilépticos, antidepresivos tricíclicos, betabloqueantes, adicción a drogas, tratamiento inmunosupresor, quimioterapia, o radioterapia, insuficiencia renal aguda o crónica, enfermedades hepáticas, trabajadores nocturnos o de turno rotatorio y sujetos con síndrome de *jet-lag*.

Casos

El estudio incluyó a 96 pacientes (52 hombres y 44 mujeres con una edad media de 57 ± 12 años) diagnosticados de infarto agudo de miocardio de acuerdo a los criterios definidos en el documento del comité conjunto de la *European Society of Cardiology / American College of Cardiology* (Alpert JS et al, 2000), como aumento característico y disminución progresiva (troponina) o aumento y disminución más rápida (fracción MB de la creatinfosfocinasa - CK-MB masa) de marcadores biológicos de necrosis miocárdica, acompañado de al menos uno de los siguientes: a) síntomas de isquemia; b)

aparición de nuevas ondas Q de necrosis en el electrocardiograma; c) cambios en el electrocardiograma sugestivos de isquemia (elevación o depresión del segmento ST); y d) intervencionismo coronario (v.gr. angioplastia coronaria).

Controles.

El grupo control estuvo compuesto por 84 voluntarios sanos, de los cuales 44 fueron hombres y 40 mujeres, con una edad media de 55 ± 18 años. Todos ellos estaban asintomáticos, sin antecedentes de enfermedad y con un examen físico normal.

PROTOCOLO EXPERIMENTAL.

A los sujetos del estudio, una vez ingresados en la Unidad de Coronarias, se les implantó un catéter en la vena antecubital del antebrazo, para la extracción de sangre. En los casos, las muestras de sangre para las determinaciones analíticas específicas del estudio, se extrajeron en las primeras 24 horas del comienzo de los síntomas.

Se obtuvo dos muestras de sangre: una a las 10:00 horas (periodo de luz) y otra a las 03:00 horas (periodo de oscuridad). Las muestras de sangre durante el periodo de oscuridad se extrajeron mientras los sujetos estaban durmiendo. Para ello una enfermera, especialmente entrenada, usó una linterna de tenue luz roja (< 100 lux), que utilizó únicamente para acceder a la embocadura del catéter endovenoso, enfocando puntualmente, en el tiempo lo más corto posible, dicha zona y evitando, en todo momento, dirigir la luz de la linterna hacia los ojos del paciente. En los casos, el tiempo medio de evolución desde el inicio de los síntomas hasta el momento de la extracción diurna y nocturna fue de $13,6 \pm 1,0$ y de $7,6 \pm 1,2$ horas, respectivamente. Todos los sujetos permanecieron en reposo durante el estudio. Las muestras de sangre fueron centrifugadas para obtener el suero, que tras ser distribuido en alícuotas en varios tubos, fue almacenado a $- 80^{\circ}$ C hasta su posterior análisis.

MÉTODOS DE LABORATORIO.

Se determinó las concentraciones plasmáticas de glucosa, colesterol total, HDL-colesterol y triglicéridos por métodos enzimático-colorimétricos. El LDL-colesterol se calculó mediante la fórmula de Friedewald.

Se utilizó como marcador biológico de necrosis miocárdica la determinación sérica de troponina I. Para su determinación se utilizó el método inmunoenzimático basado en una técnica de ELISA de sándwich (Boehringer Mannheim, España).

Determinación analítica de melatonina.

La concentración de melatonina en las muestras de suero se determinó mediante ELISA, tras haber extraído las muestras con cloroformo y siguiendo las especificaciones de la casa suministradora de los kits (DRG Instruments GmbH, Marburg, Germany). En este test de ELISA el límite de detección de melatonina fue de 3,0 pg/ml. Los coeficientes de variación para la variabilidad intraensayo e interensayo fueron de 7,53 % y de 11,3 %, respectivamente.

Determinación analítica de IL-1 β .

La concentración sérica de IL-1 β fue determinada mediante un ELISA (DRG Instruments, GmbH, Marburg, Germany), siguiendo las especificaciones de la casa suministradora de los kits. En este test de ELISA, el límite de detección de IL-1 β fue 2 pg/ml. Los coeficientes de variación para la variabilidad intraensayo e interensayo fueron 2,8 % y 4,5 %, respectivamente.

Determinación analítica de IL-6.

La concentración sérica de IL-6 fue determinada mediante un ELISA (DRG Instruments, GmbH, Marburg, Germany), siguiendo las especificaciones de la casa suministradora de los kits. En este test de ELISA, el límite de detección de IL-6 fue 2,0 pg/ml. Los coeficientes de variación para la variabilidad intraensayo e interensayo fueron 5,15 % y 4,84 %, respectivamente.

Determinación analítica de IL-8.

La concentración sérica de IL-8 fue determinada mediante un ELISA (DRG Instruments, GmbH, Marburg, Germany), siguiendo las especificaciones de la casa suministradora de los kits. En este test de ELISA, el límite de detección de IL-8 fue 0,7 pg/ml. Los coeficientes de variación para la variabilidad intraensayo e interensayo fueron 4,2 % y 3,65 %, respectivamente.

Determinación analítica de IL-10.

La concentración sérica de IL-10 fue determinada mediante un ELISA (DRG Instruments, GmbH, Marburg, Germany), siguiendo las especificaciones de la casa suministradora de los kits. En este test de ELISA, el límite de detección de IL-10 fue 1

pg/ml. Los coeficientes de variación para la variabilidad intraensayo e interensayo fueron 3,2 % y 2,8 %, respectivamente.

Determinación analítica de PCR.

La concentración sérica de PCR fue determinada mediante un ELISA ultrasensible, siguiendo las especificaciones de la casa suministradora de los kits (DRG Instruments GMBH, Marburg, Germany). En este test de ELISA el límite de detección de la PCR fue de 0,010 mg/l. Los coeficientes de variación para la variabilidad intraensayo e interensayo fueron 5,12 % y 11,6 %, respectivamente.

Determinación analítica de neopterina.

La concentración sérica de neopterina fue determinada mediante un ELISA (DRG Instruments, GmbH, Marburg, Germany) siguiendo las especificaciones de la casa suministradora de los kits. En este test de ELISA el límite de detección de neopterina fue de 0,7 nmol/l. Los coeficientes de variación para la variabilidad intraensayo e interensayo fueron 5,3 % y 9,0 %, respectivamente.

Determinación analítica de MPO.

La concentración sérica de MPO fue determinada mediante un ELISA (Oxis Research, Portland, OR, USA), siguiendo las especificaciones de la casa suministradora de los kits. En este test de ELISA, el límite de detección de MPO fue 1,02 ng/ml. Los coeficientes de variación para la variabilidad intraensayo e interensayo fueron 2,5 % y 4,3 %, respectivamente.

Determinación analítica de MMP-9.

La concentración sérica de MMP-9 fue determinada mediante un ELISA (Calbiochem, San Diego, CA, USA), siguiendo las especificaciones de la casa suministradora de los kits. En este test de ELISA, el límite de detección de MMP-9 fue de 0,1 ng/ml. Los coeficientes de variación para la variabilidad intraensayo e interensayo fueron 11,5 % y 8,4 %, respectivamente.

Determinación analítica de PAPP-A.

La concentración sérica de PAPP-A fue determinada mediante un ELISA ultrasensible (DRG Instruments, GmbH, Marburg, Germany), siguiendo las

especificaciones de la casa suministradora de los kits. En este test de ELISA, el límite inferior de detección de PAPP-A fue de 0,418 mUI/L. Los coeficientes de variación para la variabilidad intraensayo e interensayo fueron 3,5 % y 5,5 %, respectivamente.

Determinación analítica de OxLDL.

La concentración sérica de OxLDL fue determinada mediante un ELISA (DRG Instruments, GmbH, Marburg, Germany), siguiendo las especificaciones de la casa suministradora de los kits. En este test de ELISA, el límite de detección de OxLDL fue < 1 U/L. Los coeficientes de variación para la variabilidad intraensayo e interensayo fueron 6,3 % y 4,73 %, respectivamente.

Determinación analítica de sCD40L.

La concentración sérica de sCD40L fue determinada mediante un ELISA (BenderMedSystems, Viena, Austria), siguiendo las especificaciones de la casa suministradora de los kits. En este test de ELISA, el límite de detección de sCD40L fue 7,2 pg/ml. Los coeficientes de variación para la variabilidad intraensayo e interensayo fueron 5,5 % y 7,0 %, respectivamente.

Determinación analítica de sVCAM-1.

La concentración sérica de sVCAM-1 fue determinada mediante un ELISA (BenderMedSystems, Viena, Austria), siguiendo las especificaciones de la casa suministradora de los kits. En este test de ELISA, el límite de detección de sVCAM-1 fue 0,59 ng/ml. Los coeficientes de variación para la variabilidad intraensayo e interensayo fueron 3,1 % y 5,2 %, respectivamente.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis de los datos se utilizó el programa estadístico para PC SPSS versión 10.0.1 (Analytical Software, Chicago, Illinois, USA). Las variables cualitativas se expresan como porcentajes y las variables cuantitativas se expresan como media \pm desviación estandar. Se comprobó la normalidad de las distribuciones de las variables mediante la prueba de *Kolmogorov – Smirnof*. Para la comparación de dos variables cualitativas se utilizó el test de la χ^2 . Para el análisis de las variables cuantitativas en los periodos de luz y oscuridad se realizó un ANOVA general, seguido del test de *t-Student*. Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$.

RESULTADOS

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y ANALÍTICAS BASALES DE LOS SUJETOS DEL ESTUDIO

El estudio incluyó a 96 pacientes (52 hombres y 44 mujeres), diagnosticados de infarto agudo de miocardio y 84 voluntarios sanos (44 hombres y 40 mujeres). Las características clínicas y analíticas basales de los sujetos del estudio (casos y controles) se exponen, de forma resumida, en las tablas 1 y 2. Como puede apreciarse en la tabla 1, ambos grupos fueron similares en cuanto a edad, sexo y factores de riesgo para enfermedad arterial coronaria.

Variable	IAM (n = 96)	Controles (n= 84)	Valor de P
Edad (años)	57 ± 12	55 ± 18	0,37
Varones	52 (54,1 %)	44 (52,3%)	0,44
Hipercolesterolemia	55 (57,2%)	51 (60,7%)	0,59
Tabaquismo	75 (78,1%)	62 (73,8%)	0,89
Hipertensión arterial	35 (36,4%)	26 (30,9%)	0,72

Tabla 1: Características basales y factores de riesgo de los sujetos incluidos en el estudio.

IAM: infarto agudo de miocardio.

En todos los pacientes con infarto agudo de miocardio se realizó revascularización coronaria percutánea, mediante angioplastia primaria, con reestablecimiento de un flujo TIMI 3 y una estenosis residual menor del 30% en la arteria responsable del infarto. El procedimiento fue realizado por un operador experto, de acuerdo a la práctica clínica estandar, a través de un abordaje femoral. Todos los pacientes recibieron 300 mg. de ácido acetilsalicílico vía oral y nitroglicerina intravenosa a razón de 10 µg/min antes del procedimiento de angioplastia. Se administró un bolo de 5.000 U de heparina sódica intravenosa antes del procedimiento, seguida de bolos adicionales necesarios para mantener un tiempo de coagulación activado (ACT) > de 300 seg. Se administró, además, un bolo intravenoso de abciximab (inhibidores de los receptores de glicoproteína IIb - IIIa) durante el procedimiento y una infusión continua, ajustados según el peso corporal, durante y hasta 12 horas después

del mismo. Posteriormente se administró 300 mg de ácido acetilsalicílico y 75 mg de clopidogrel vía oral diariamente.

En la tabla 2 se exponen las concentraciones séricas de colesterol total y sus diferentes fracciones, triglicéridos, glucosa y troponina I de los casos comparado con los controles. No se encontró diferencias significativas entre ambos grupos en cuanto a estos parámetros excepto, como era de esperar, en los niveles de troponina I que fueron significativamente más altos en los pacientes con infarto agudo de miocardio.

Variables	IAM (n = 96)	Controles (n= 84)	Valor de P
Colesterol total (mg/dl)	198 ± 12,4	200 ± 10,1	0,34
LDL colesterol (mg/dl)	117 ± 12	119 ± 10,1	0,23
HDL colesterol (mg/dl)	58 ± 4,4	56 ± 12	0,13
Triglicéridos (mg/dl)	155 ± 16	153 ± 20	0,45
Glucosa (mg/dl)	105 ± 33	99 ± 28	0,19
Troponina I (mg/dl)	10 ± 1	0,01 ± 0,003	<0,0001

Tabla 2: parámetros analíticos basales de los sujetos incluidos en el estudio. IAM: infarto agudo de miocardio.

NIVELES SÉRICOS DE MELATONINA, CITOCINAS Y OTROS MEDIADORES DE LA INFLAMACIÓN EN LAS FASES DE LUZ Y OSCURIDAD.

Los niveles séricos de melatonina, neopterina, IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, MMP-9, PCR, OxLDL, PAPP-A, sCD40L, s-VCAM-1 y MPO, en las fases de luz y oscuridad durante el día, en sujetos control y en pacientes con infarto agudo de miocardio se muestran en forma resumida en las tablas 3 y 4, respectivamente.

Variables	Controles (n=84)		Valor P
	Luz	Oscuridad	
Melatonina (pg/ml)	19,30 ± 3,48	53,19 ± 1,84	< 0,0001
Neopterina (nM/L)	6,98 ± 1,96	5,87 ± 2,00	0,0004
IL-1B (pg/ml)	37,20 ± 5,4	38,13 ± 5,12	0,25
IL-6 (pg/ml)	35,86 ± 5,2	63,14 ± 7,79	< 0,0001
IL-8 (pg/ml)	26 ± 8,2	20,22 ± 3,4	0,004
IL-10 (pg/ml)	26,30 ± 11,01	24,48 ± 7,59	0,21
MMP-9 (ng/ml)	159,6 ± 55,7	150,4 ± 40,8	0,22
PCR (mgr/L)	0,5 ± 0,2	0,4 ± 0,1	0,10
OxLDL (U/L)	71,45 ± 17,80	73,09 ± 19,45	0,56
PAPP-A (mUI/L)	0,61 ± 0,14	0,63 ± 0,14	0,35
s-CD40 L (pg/ml)	113,41 ± 47,71	109,90 ± 29,87	0,56
s-VCAM (ng/ml)	1039,43 ± 390,14	1067, 32± 360,71	0,63
MPO (ng/ml)	43,89 ± 25,40	51,35 ± 27,3	0,06

Tabla 3: Niveles séricos de melatonina, neopterina, IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, MMP-9, PCR, OxLDL, PAPP-A, sCD40 L, s-VCAM-1 y MPO, en las fases de luz y de oscuridad en sujetos control. Los valores representan la media \pm desviación estandar.

En los sujetos control, como era de esperar, se encontraron variaciones diurnas en las concentraciones séricas de melatonina, con niveles en fase de oscuridad significativamente mayores que los niveles en fase de luz ($p < 0,0001$). De igual manera, se encontraron en los mismos sujetos variaciones diurnas en las concentraciones séricas de neopterina, IL-6 e IL-8. La IL-6 mostró concentraciones séricas en fase de oscuridad significativamente mayores que en fase de luz ($p < 0,0001$). Por el contrario, las concentraciones séricas en fase de luz fueron significativamente más altas que en fase de oscuridad para la neopterina ($p = 0,0004$) y la IL-8 ($p = 0,004$). Respecto a la MPO hubo tendencia hacia valores más altos en las concentraciones séricas en fase de oscuridad respecto a las de en fase de luz, pero sin llegar a la significación estadística ($p = 0,06$). El resto de los parámetros analizados no mostraron diferencias significativas

en las concentraciones séricas en fase de luz respecto a las concentraciones séricas en fase de oscuridad.

Variables	IAM (n=96)		Valor P
	<i>Luz</i>	<i>Oscuridad</i>	
Melatonina (pg/ml)	16,40 ± 5,01	30,84 ± 5,10	< 0,001
Neopterina (nM/L)	10,20 ± 3,80	8,84 ± 2,22	0,0027
IL-1B (pg/ml)	41,85 ± 8,20	39,52 ± 6,2	0,20
IL-6 (pg/ml)	51,93 ± 6,2	111,50 ± 14,01	< 0,0001
IL-8 (pg/ml)	26,52 ± 8,64	30,3 ± 17,06	0,052
IL-10 (pg/ml)	34,01 ± 12,13	30,40 ± 8,7	0,29
MMP-9 (ng/ml)	301,4 ± 62,6	270,3 ± 59,4	0,0005
PCR (mgr/L)	6,5 ± 0,9	4,7 ± 0,8	< 0,0001
OxLDL (U/L)	95,00 ± 22,14	98,54 ± 32,45	0,37
PAPP-A (mUI/L)	0,58 ± 0,08	0,59 ± 0,09	0,41
s-CD40 L (pg/ml)	167,30 ± 63,23	98,88 ± 48,34	< 0,0001
s-VCAM (ng/ml)	1231, 76 ± 300,38	1396,64 ± 427,98	0,002
MPO (ng/ml)	61,94 ± 28,21	78,79 ± 30,01	< 0,0001

Tabla 4: Niveles séricos de melatonina, neopterina, IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, MMP-9, PCR, OxLDL, PAPP-A, sCD40 L, s-VCAM-1 y MPO, en las fases de luz y de oscuridad en pacientes con IAM. Los valores representan la media \pm desviación estandar. IAM: pacientes con infarto agudo de miocardio.

En los pacientes con infarto agudo de miocardio se encontraron, igualmente, variaciones diurnas en las concentraciones séricas de melatonina, con niveles en fase de oscuridad significativamente mayores que los niveles en fase de luz ($p < 0,0001$), pero con una significativa menor amplitud en relación a sus respectivos controles sanos tanto en la fase de luz como en la de oscuridad (ver figuras). Se encontró, además, en los pacientes con infarto agudo de miocardio variaciones diurnas en las concentraciones séricas de neopterina, IL-6, MMP-9, PCR, s-CD40 L, s-VCAM-1 y MPO. De estas moléculas, mostraron concentraciones séricas en fase de oscuridad significativamente

mayores que en fase de luz la IL-6 ($p < 0,0001$), la s-VCAM ($p = 0,002$), y la MPO ($p < 0,0001$). Por el contrario, las concentraciones séricas en fase de luz fueron significativamente más altas que en fase de oscuridad para la neopterinina ($p = 0,0027$), la MMP-9 ($p = 0,0005$), la PCR ($p < 0,0001$) y el s-CD40L ($p < 0,0001$). Respecto a la IL-8 hubo tendencia hacia valores más altos en las concentraciones séricas en fase de oscuridad respecto a las de en fase de luz, pero sin llegar a la significación estadística ($p = 0,052$). El resto de los parámetros analizados no mostraron diferencias significativas en las concentraciones séricas en fase de luz respecto a las concentraciones séricas en fase de oscuridad.

Los niveles séricos de neopterinina, IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, MMP-9, PCR, OxLDL, PAPP-A, s-CD40L, s-VCAM-1 y MPO, en relación con los de melatonina, en las fases de luz y oscuridad durante el día, tanto en los sujetos control como en los pacientes con infarto agudo de miocardio, se ilustran en forma de diagrama de barras desde la figura 1 a la 12, respectivamente.

NIVELES SÉRICOS LUZ / OSCURIDAD DE NEOPTERINA Y MELATONINA

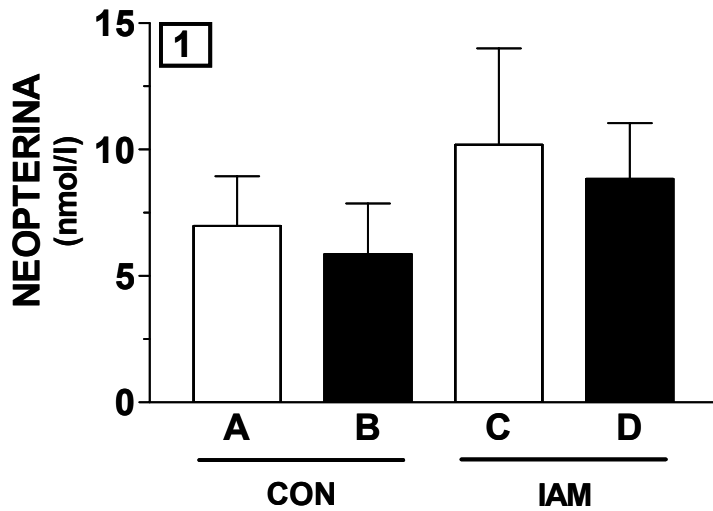


Figura 1.1

Anova $p < 0.0001$
 A vs B < 0.05
 A vs C < 0.001
 A vs D < 0.001
 B vs C < 0.001
 B vs D < 0.001
 C vs D < 0.01

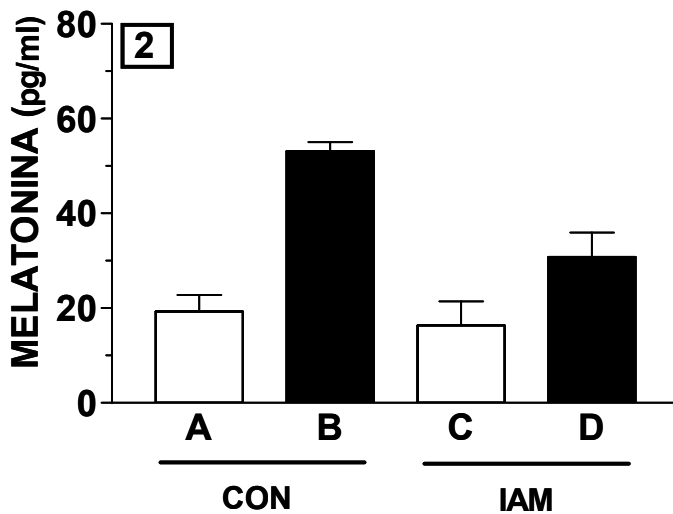


Figura 1.2

Anova $p < 0.0001$
 A vs B < 0.0001
 A vs C < 0.001
 A vs D < 0.001
 B vs C < 0.001
 B vs D < 0.001
 C vs D < 0.001

□ LUZ ■ OSCURIDAD

Figura 1: Niveles séricos de neopterin (1.1) en relación con los de melatonina (1.2), en las fases de luz y oscuridad durante el día, tanto en los sujetos control (CON) como en los pacientes con infarto agudo de miocardio (IAM). Las barras representan los valores medios + desviación estandar (DE).

NIVELES SÉRICOS LUZ / OSCURIDAD DE IL - 1 β Y MELATONINA

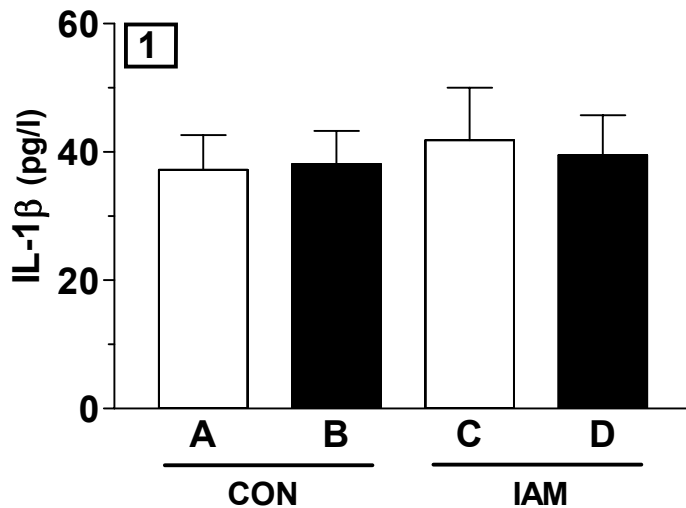


Figura 2.1

Anova $p < 0.0001$
 A vs B > 0.05
 A vs C < 0.001
 A vs D > 0.05
 B vs C < 0.001
 B vs D > 0.05
 C vs D > 0.05

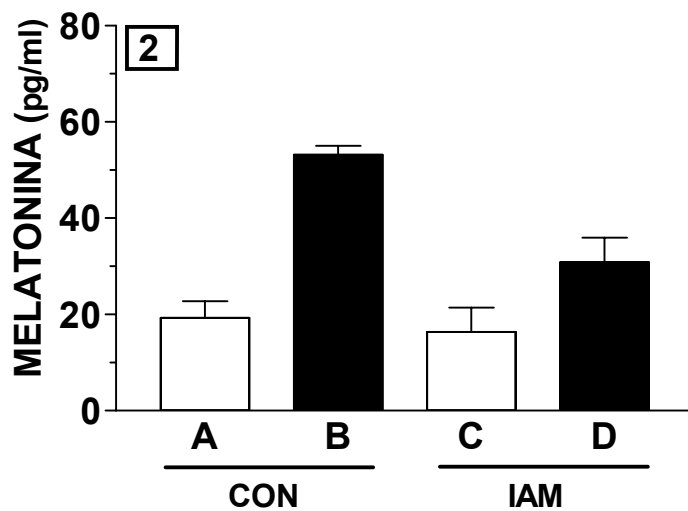


Figura 2.2

Anova $p < 0.0001$
 A vs B < 0.0001
 A vs C < 0.001
 A vs D < 0.001
 B vs C < 0.001
 B vs D < 0.001
 C vs D < 0.001

□ LUZ ■ OSCURIDAD

Figura 2: Niveles séricos de IL - 1 β (2.1) en relación con los de melatonina (2.2), en las fases de luz y oscuridad durante el día, tanto en los sujetos control (**CON**) como en los pacientes con infarto agudo de miocardio (**IAM**). Las barras representan los valores medios + desviación estandar (DE).

NIVELES SÉRICOS LUZ / OSCURIDAD DE IL -6 Y MELATONINA

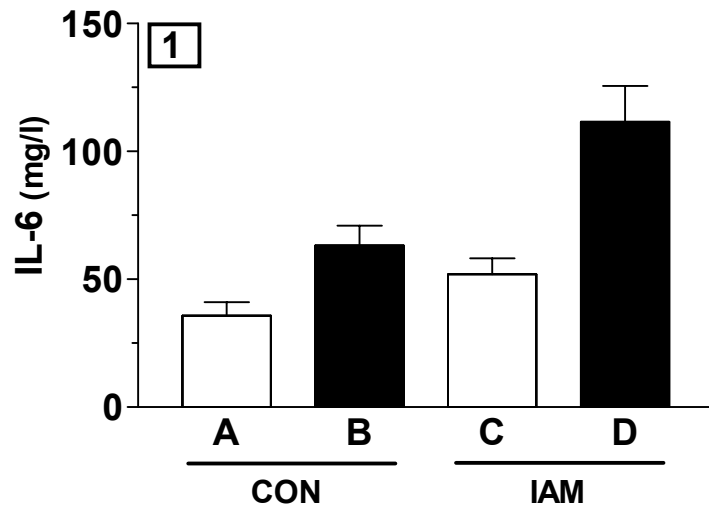


Figura 3.1

Anova $p < 0.0001$
 A vs B < 0.001
 A vs C < 0.001
 A vs D < 0.001
 B vs C < 0.001
 B vs D < 0.001
 C vs D < 0.001

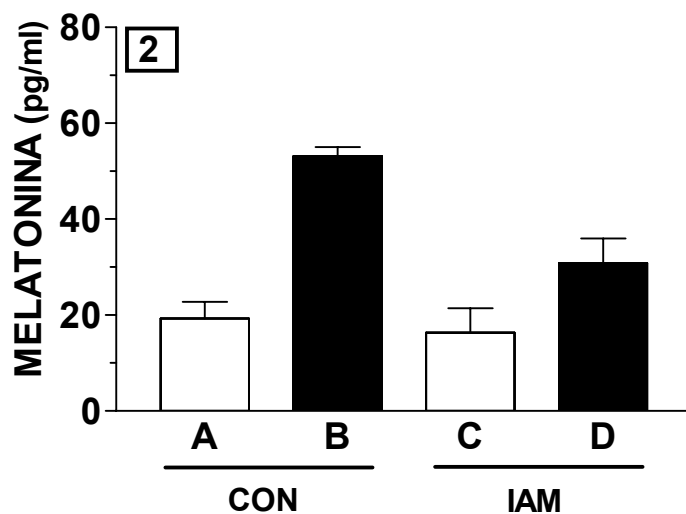


Figura 3.2

Anova $p < 0.0001$
 A vs B < 0.0001
 A vs C < 0.001
 A vs D < 0.001
 B vs C < 0.001
 B vs D < 0.001
 C vs D < 0.001

□ LUZ ■ OSCURIDAD

Figura 3: Niveles séricos de IL -6 (3.1) en relación con los de melatonina (3.2), en las fases de luz y oscuridad durante el día, tanto en los sujetos control (**CON**) como en los pacientes con infarto agudo de miocardio (**IAM**). Las barras representan los valores medios + desviación estandar (DE).

NIVELES SÉRICOS LUZ / OSCURIDAD DE IL - 8 Y MELATONINA

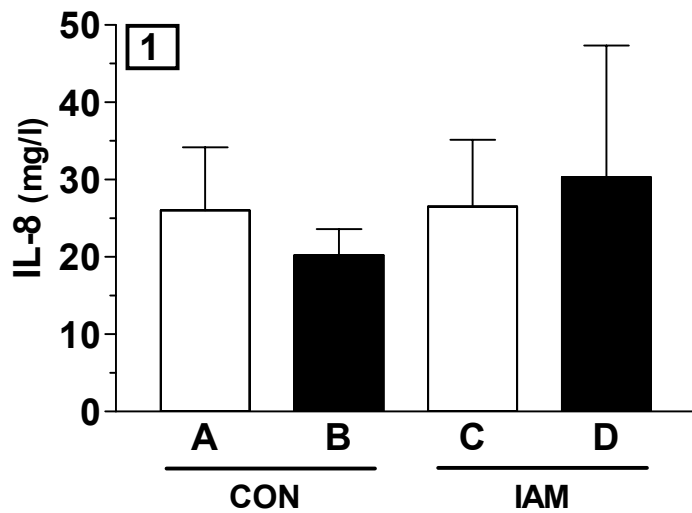


Figura 4.1

Anova $p < 0.0001$
 A vs B < 0.01
 A vs C > 0.05
 A vs D < 0.05
 B vs C < 0.001
 B vs D < 0.001
 C vs D > 0.05

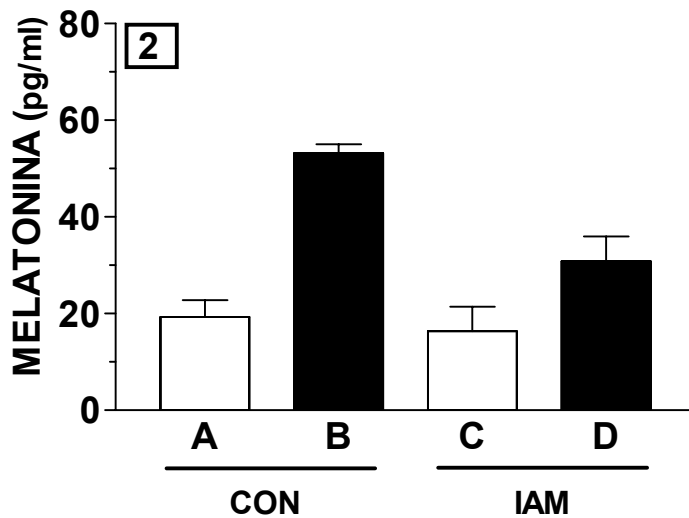


Figura 4.2

Anova $p < 0.0001$
 A vs B < 0.0001
 A vs C < 0.001
 A vs D < 0.001
 B vs C < 0.001
 B vs D < 0.001
 C vs D < 0.001

□ LUZ ■ OSCURIDAD

Figura 4: Niveles séricos de IL - 8 (4.1) en relación con los de melatonina (4.2), en las fases de luz y oscuridad durante el día, tanto en los sujetos control (CON) como en los pacientes con infarto agudo de miocardio (IAM). Las barras representan los valores medios + desviación estandar (DE).

NIVELES SÉRICOS LUZ / OSCURIDAD DE IL - 10 Y MELATONINA

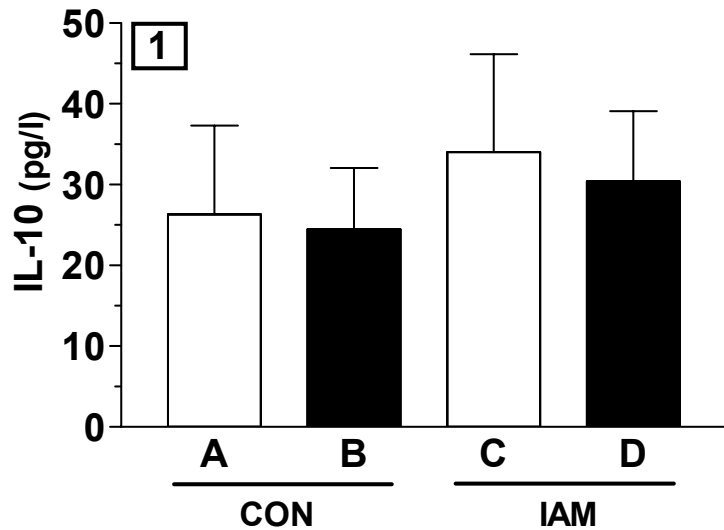


Figura 5.1

Anova $p < 0.0001$
 A vs B > 0.05
 A vs C < 0.001
 A vs D < 0.05
 B vs C < 0.001
 B vs D < 0.001
 C vs D > 0.05

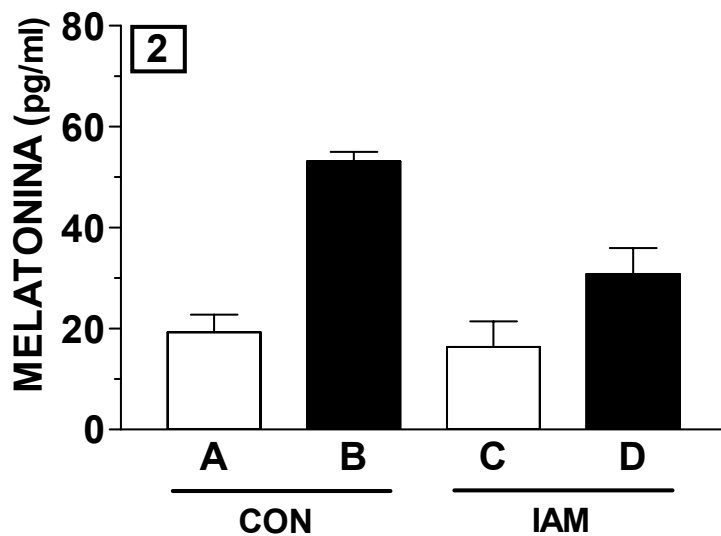


Figura 5.2

Anova $p < 0.0001$
 A vs B < 0.0001
 A vs C < 0.001
 A vs D < 0.001
 B vs C < 0.001
 B vs D < 0.001
 C vs D < 0.001

□ LUZ ■ OSCURIDAD

Figura 5: Niveles séricos de IL – 10 (5.1) en relación con los de melatonina (5.2), en las fases de luz y oscuridad durante el día, tanto en los sujetos control (CON) como en los pacientes con infarto agudo de miocardio (IAM). Las barras representan los valores medios + desviación estandar (DE).

NIVELES SÉRICOS LUZ / OSCURIDAD DE MMP-9 Y MELATONINA

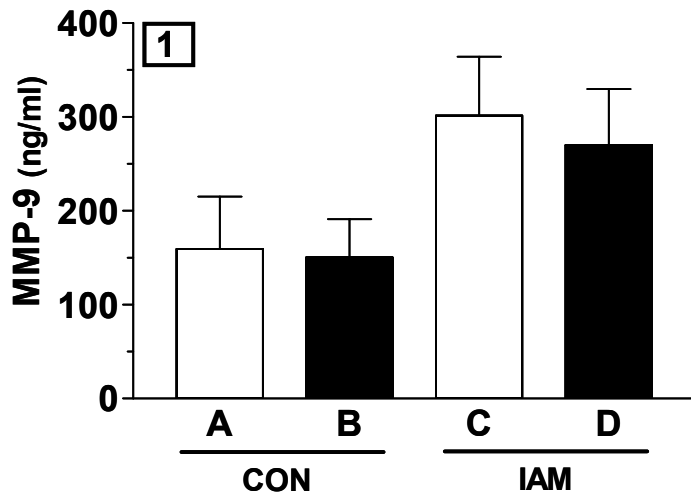


Figura 6.1

Anova $p < 0.0001$
 A vs B > 0.05
 A vs C < 0.001
 A vs D < 0.001
 B vs C < 0.001
 B vs D < 0.001
 C vs D < 0.001

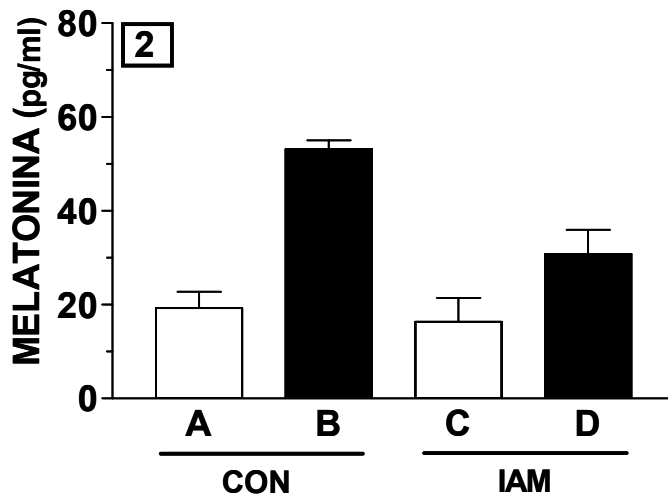


Figura 6.2

Anova $p < 0.0001$
 A vs B < 0.0001
 A vs C < 0.001
 A vs D < 0.001
 B vs C < 0.001
 B vs D < 0.001
 C vs D < 0.001

□ LUZ ■ OSCURIDAD

Figura 6: Niveles séricos de MMP – 9 (6.1) en relación con los de melatonina (6.2), en las fases de luz y oscuridad durante el día, tanto en los sujetos control (CON) como en los pacientes con infarto agudo de miocardio (IAM). Las barras representan los valores medios + desviación estandar (DE).

NIVELES SÉRICOS LUZ / OSCURIDAD DE PCR Y MELATONINA

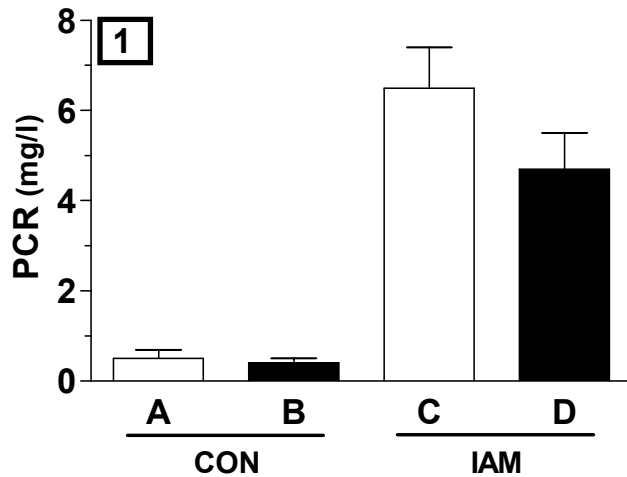


Figura 7.1

Anova $p < 0.0001$
 A vs B > 0.05
 A vs C < 0.001
 A vs D < 0.001
 B vs C < 0.001
 B vs D < 0.001
 C vs D < 0.001

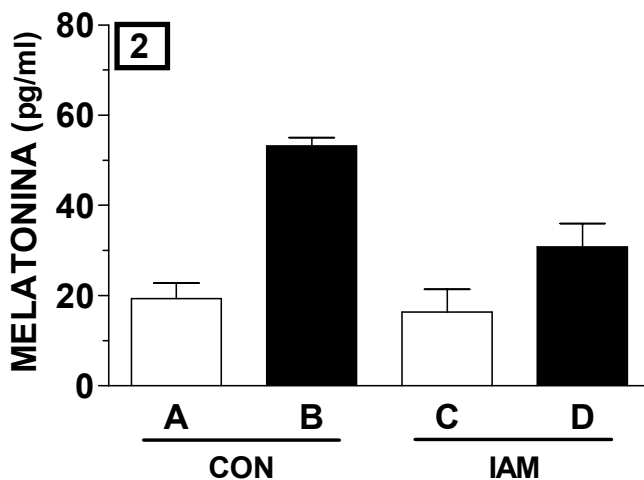


Figura 7.2

Anova $p < 0.0001$
 A vs B < 0.0001
 A vs C < 0.001
 A vs D < 0.001
 B vs C < 0.001
 B vs D < 0.001
 C vs D < 0.001

LUZ
 OSCURIDAD

Figura 7: Niveles séricos de PCR (7.1) en relación con los de melatonina (7.2), en las fases de luz y oscuridad durante el día, tanto en los sujetos control (CON) como en los pacientes con infarto agudo de miocardio (IAM). Las barras representan los valores medios + desviación estandar (DE).

NIVELES SÉRICOS LUZ / OSCURIDAD DE OxLDL Y MELATONINA

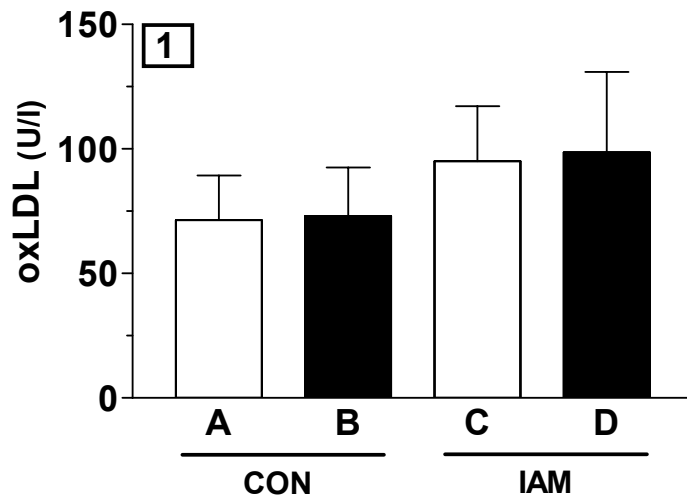


Figura 8.1

Anova $p < 0.0001$
 A vs B > 0.05
 A vs C < 0.001
 A vs D < 0.001
 B vs C < 0.001
 B vs D < 0.001
 C vs D > 0.05

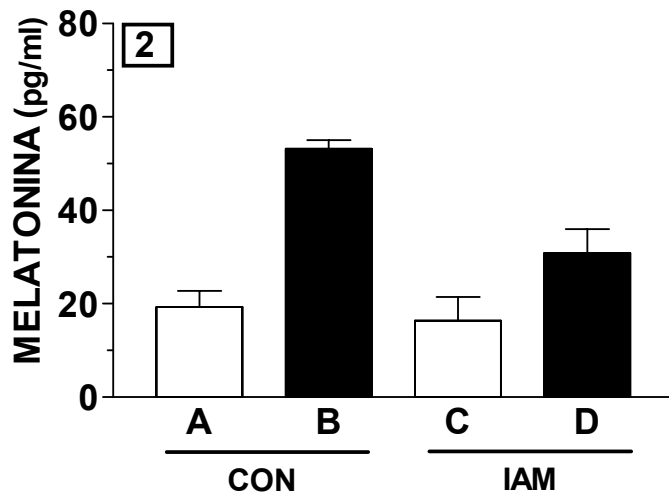


Figura 8.2

Anova $p < 0.0001$
 A vs B < 0.0001
 A vs C < 0.001
 A vs D < 0.001
 B vs C < 0.001
 B vs D < 0.001
 C vs D < 0.001

□ LUZ ■ OSCURIDAD

Figura 8: Niveles séricos de Ox-LDL (8.1) en relación con los de melatonina (8.2), en las fases de luz y oscuridad durante el día, tanto en los sujetos control (CON) como en los pacientes con infarto agudo de miocardio (IAM). Las barras representan los valores medios + desviación estandar (DE).

NIVELES SÉRICOS LUZ / OSCURIDAD DE PAPP-A Y MELATONINA

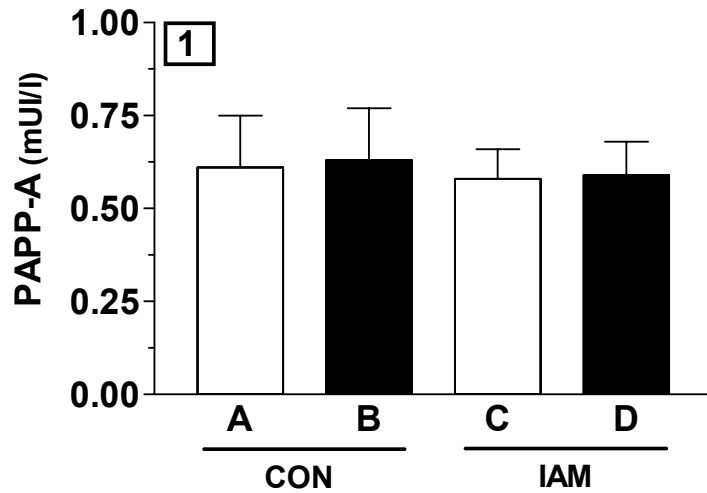


Figura 9.1

Anova $p = 0.01$
 A vs B > 0.05
 A vs C > 0.05
 A vs D > 0.05
 B vs C < 0.05
 B vs D > 0.05
 C vs D > 0.05

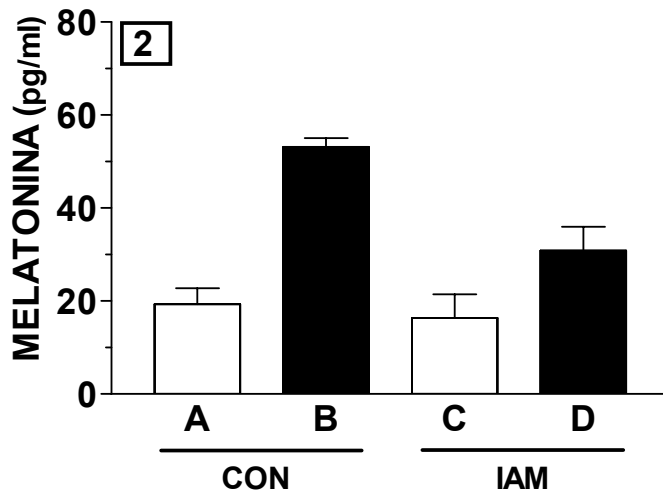


Figura 9.2

Anova $p < 0.0001$
 A vs B < 0.0001
 A vs C < 0.001
 A vs D < 0.001
 B vs C < 0.001
 B vs D < 0.001
 C vs D < 0.001

LUZ
 OSCURIDAD

Figura 9: Niveles séricos de PAPP – A (9.1) en relación con los de melatonina (9.2), en las fases de luz y oscuridad durante el día, tanto en los sujetos control (**CON**) como en los pacientes con infarto agudo de miocardio (**IAM**). Las barras representan los valores medios + desviación estandar (DE).

NIVELES SÉRICOS LUZ / OSCURIDAD DE sCD40L Y MELATONINA

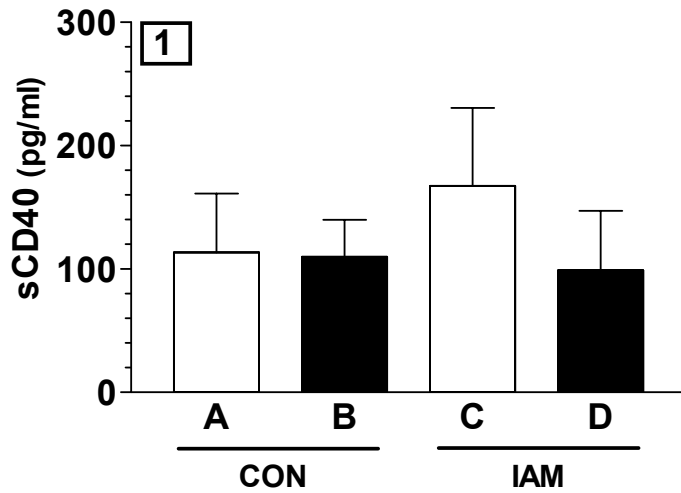


Figura 10.1

Anova $p < 0.0001$
 A vs B $> 0,05$
 A vs C $< 0,001$
 A vs D $> 0,05$
 B vs C $< 0,001$
 B vs D $> 0,05$
 C vs D $< 0,001$

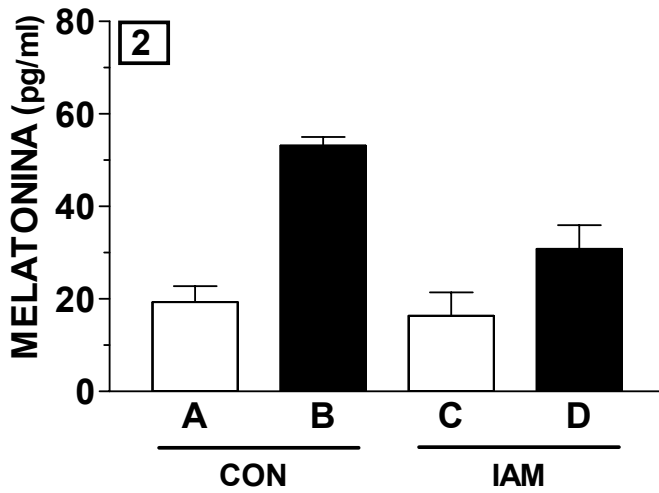


Figura 10.2

Anova $p < 0.0001$
 A vs B < 0.0001
 A vs C < 0.001
 A vs D < 0.001
 B vs C < 0.001
 B vs D < 0.001
 C vs D < 0.001

□ LUZ ■ OSCURIDAD

Figura 10: Niveles séricos de s-CD 40 L (10.1) en relación con los de melatonina (10.2), en las fases de luz y oscuridad durante el día, tanto en los sujetos control (CON) como en los pacientes con infarto agudo de miocardio (IAM). Las barras representan los valores medios + desviación estándar (DE).

NIVELES SÉRICOS LUZ / OSCURIDAD DE s-VCAM-1 Y MELATONINA

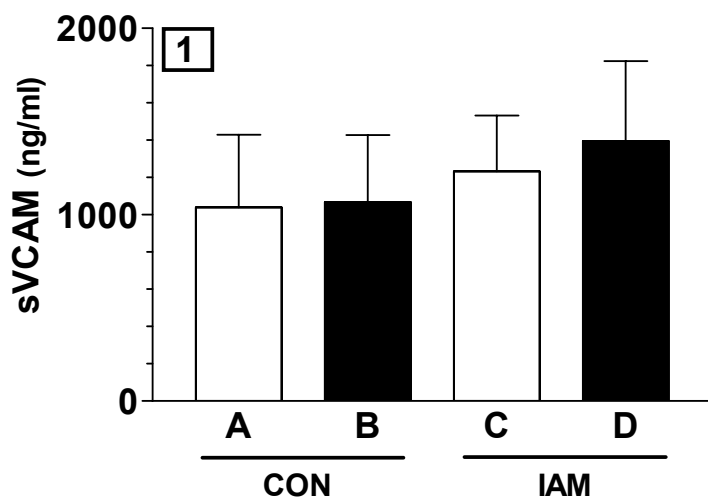


Figura 11.1

Anova $p < 0.0001$
 A vs B > 0.05
 A vs C < 0.01
 A vs D < 0.001
 B vs C < 0.05
 B vs D < 0.001
 C vs D < 0.05

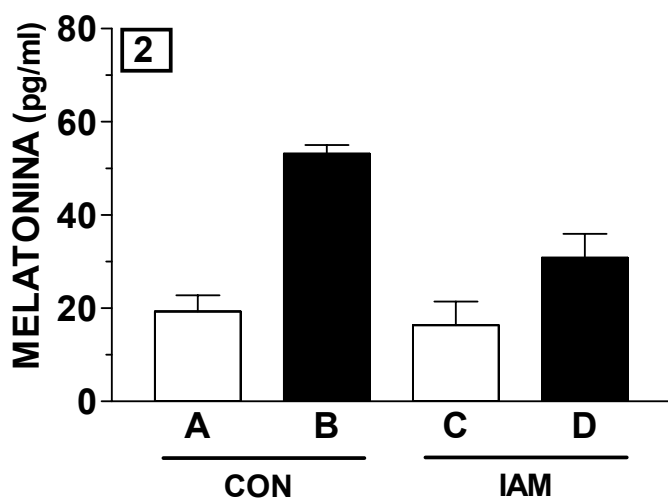


Figura 11.2

Anova $p < 0.0001$
 A vs B < 0.001
 A vs C < 0.001
 A vs D < 0.001
 B vs C < 0.001
 B vs D < 0.001
 C vs D < 0.001

□ LUZ ■ OSCURIDAD

Figura 11: Niveles séricos de s-VCAM – 1 (11.1) en relación con los de melatonina (11.2), en las fases de luz y oscuridad durante el día, tanto en los sujetos control (**CON**) como en los pacientes con infarto agudo de miocardio (**IAM**). Las barras representan los valores medios + desviación estándar (DE).

NIVELES SÉRICOS LUZ / OSCURIDAD DE MPO Y MELATONINA

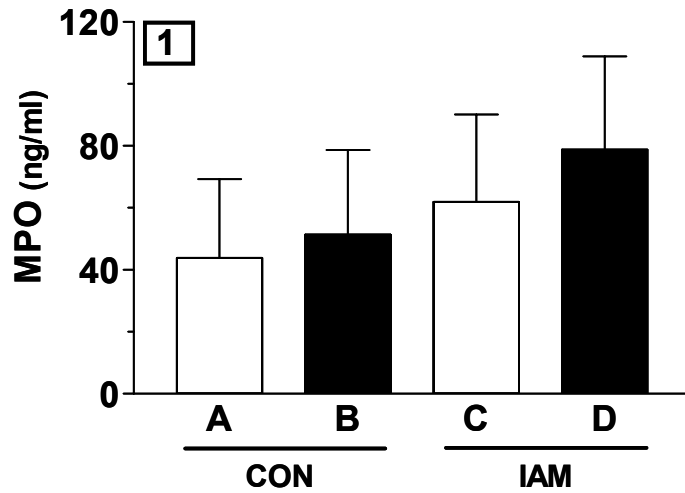


Figura 12.1

Anova $p < 0.0001$
 A vs B > 0.05
 A vs C < 0.001
 A vs D < 0.001
 B vs C > 0.05
 B vs D < 0.001
 C vs D < 0.001

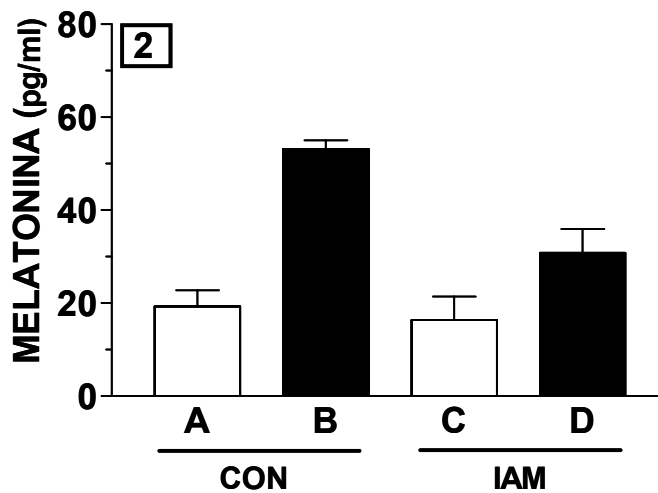


Figura 12.2

Anova $p < 0.0001$
 A vs B < 0.0001
 A vs C < 0.001
 A vs D < 0.001
 B vs C < 0.001
 B vs D < 0.001
 C vs D < 0.001

□ LUZ ■ OSCURIDAD

Figura 12: Niveles séricos de MPO (12.1) en relación con los de melatonina (12.2), en las fases de luz y oscuridad durante el día, tanto en los sujetos control (CON) como en los pacientes con infarto agudo de miocardio (IAM). Las barras representan los valores medios + desviación estandar (DE).

DISCUSIÓN

La adhesión de monocitos y linfocitos T a la superficie endotelial y la liberación de diversas citocinas, así como otras moléculas mediadoras de la inflamación, por parte de células endoteliales y por las propias células del sistema inmunitario, son los fenómenos histopatológicos y biomoleculares más destacados de la respuesta inflamatoria que desencadena el proceso de lesión de la pared vascular y el desarrollo de la aterosclerosis (Hansson GK, 2005). Estudios experimentales han puesto de manifiesto que tanto el número como las funciones de las células del sistema inmune, pueden variar en el periodo circadiano de 24 horas (Haus E, Smolensky MH, 1999). Ejemplo de ello es la variabilidad de los efectos biológicos de la administración exógena de citocinas durante el ciclo luz / oscuridad (Abo T et al, 1981; Lévi F et al 1988). Existe un control neuroendocrino central sobre la secreción y actividad de estos mediadores del sistema inmunitario (Jankovic BD, 1994).

El inicio del infarto agudo de miocardio, con frecuencia, ocurre en las primeras horas de la mañana. Diversos estudios han intentado establecer la causa de este ritmo circadiano, así como sus implicaciones clínicas y terapéuticas (Muller JE et al, 1985; Thompson DR et al, 1985; Willich SN et al, 1989; Tofler GH et al, 1992). Recientemente se ha demostrado variaciones circadianas en la incidencia de la ruptura de la placa aterosclerótica, fenómeno que provoca el infarto agudo de miocardio (Tanaka A et al, 2004). Por ello, se ha sugerido que la desigual distribución en la presentación circadiana del mismo podría estar, de forma alguna, asociada o desencadenada por fenómenos que muestran una organización temporal similar, por ritmos fisiológicos que presentan un pico de actividad en un determinado momento del día o de la noche (Hernandes Fernandes E et al, 2000). Resulta plausible, pues, la hipótesis de que exista algún tipo de relación entre las variaciones diurnas en las funciones del sistema inmunitario y el patrón de presentación del infarto agudo de miocardio.

El proceso inflamatorio vascular que produce la aterosclerosis y sus complicaciones es, indudablemente, muy complejo. En el presente estudio se ha analizado las variaciones diurnas de las concentraciones séricas de diversas citocinas y otros mediadores de la inflamación, en relación con la melatonina, en pacientes con infarto agudo de miocardio y se han comparado las mismas con las de sujetos control. Se ha seguido un “perfil bioquímico” que abarca diversos estadios de la enfermedad aterosclerótica (Naghavi M et al, 2003), en cada uno de los cuales intervendrían “de forma predominante” diferentes moléculas (figura 3), tales como: marcadores de la

actividad inmunitaria celular como la neopterinina; citocinas pro-inflamatorias como la IL-1 β , la IL-6, la IL-8; citocinas anti-inflamatorias como la IL-10; mediadores en el inicio, progresión y desestabilización de la placa como la sVCAM-1, la OxLDL, la MPO, y la MMP-9; marcadores inflamatorios involucrados en la ruptura de la placa como el sCD40L y la PAPP-A; y reactantes de fase aguda como la PCR.

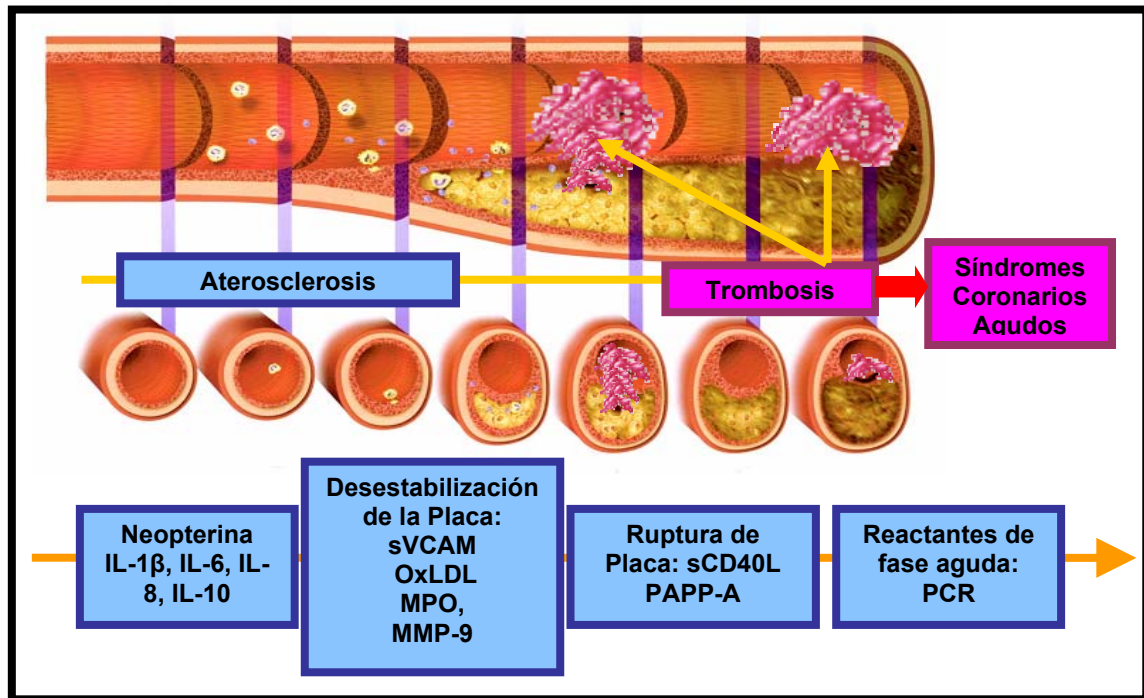


Figura 3: Secuencia fisiopatológica o perfil bioquímico de los marcadores biológicos en los diversos estadios de la enfermedad aterosclerótica, desde la inflamación vascular hasta la ruptura de placa y sus complicaciones trombóticas, con referencia a las citocinas y otros mediadores de la inflamación objeto de nuestro estudio. (Modificado de Libby P, 2001)

Niveles séricos luz /oscuridad de melatonina.

Los niveles séricos de melatonina, mostraron variaciones diurnas, con niveles nocturnos significativamente más altos que durante el día, tanto en el grupo de sujetos control como en el grupo de pacientes con infarto agudo de miocardio. Sin embargo, en éste último con una significativa menor amplitud. Este hallazgo concuerda con lo previamente publicado en pacientes con infarto agudo de miocardio (Domínguez Rodríguez A et al, 2002) y, de forma similar, en pacientes con enfermedad arterial coronaria (Brugger P et al, 1995; Sakotnik A et al, 1999). Se ha sugerido la posibilidad de que la depleción en los niveles nocturnos de melatonina que observamos en los pacientes con infarto agudo de miocardio sea debido, al menos en parte, a su capacidad como recolector de radicales libres (*radical scavenger*) generados en las primeras 24 horas del infarto agudo de miocardio (Domínguez Rodríguez A et al, 2002). Dos posibles mecanismos podrían explicar los efectos antioxidantes de la melatonina en los pacientes con infarto agudo de miocardio: 1) por acción directa de la melatonina como recolector de radicales libres, ya que tiene la capacidad de detoxificar especies reactivas de oxígeno y nitrógeno por vías no enzimáticas, que resultan en la formación de otro potente antioxidante: N(1)-acetil-N(2)-formil-5-metoxikinurenamina (Tan DX, et al, 2001); y 2) mediante un mecanismo de acción indirecto a través de la estimulación de varias enzimas antioxidantes y la estabilización de la fluidez de las membranas (Reiter RJ et al, 2001).

Por otro lado, Ekmekcioglu C et al, han encontrado, por técnicas de RT-PCR y *western blot*, receptores de melatonina (MT₁ Y MT₂) en las arterias coronarias humanas, cuyo significado, en el momento actual, es incierto (Ekmekcioglu C et al, 2001; Ekmekcioglu C et al, 2003).

Niveles séricos luz /oscuridad de IL-1 β .

Los niveles séricos de IL-1 β no mostraron en nuestro estudio variaciones diurnas, tanto en los sujetos control como en los pacientes con infarto agudo de miocardio. Sin embargo, los pacientes con infarto agudo de miocardio mostraron niveles de IL-1 β significativamente superiores a los de sus correspondientes controles sólo en la fase de luz ($p < 0,001$). Estos hallazgos son comparables y concuerdan con lo previamente publicado (Domínguez Rodríguez et al, 2003). Sin embargo, se ha demostrado en un estudio previo en sujetos sanos la existencia de ritmicidad diurna de algunas citocinas pro-inflamatorias, entre ellas la IL-1, con unos mayores niveles al final y principio del periodo de 24 horas. (Petrovsky N et al, 1998).

Las citocinas pro-inflamatorias intervienen en el proceso aterosclerótico desde estadios muy precoces de la enfermedad (Young JL et al, 2002). En nuestro estudio, la IL-1 β no presentó cambios significativos con respecto al patrón lumínico, probablemente por 2 motivos: 1) la IL-6 es una citocina con potentes propiedades pro-inflamatorias que regula la expresión de moléculas de adhesión y de otras citocinas, como la IL-1 β (Schieffer B et al, 2000), sobre la cual la actuación de la IL-6 presenta un desfase temporal, y 2) la IL-6 induce la migración y diferenciación de los macrófagos activados, quienes son los principales productores de IL-1 β (Giri JG et al, 1985).

Niveles séricos luz /oscuridad de IL-6.

Los niveles séricos de IL-6, mostraron variaciones diurnas siendo significativamente mayores los valores en la fase de oscuridad respecto a los de la fase de luz, tanto en los sujetos control ($p < 0,001$) como en los pacientes con infarto agudo de miocardio ($p < 0,001$). En los pacientes con infarto agudo de miocardio los valores obtenidos fueron significativamente superiores respecto a sus correspondientes controles, tanto en la fase de luz ($p < 0,001$) como en la fase de oscuridad ($p < 0,001$). Hallazgos similares han sido comunicados en otros estudios (Domínguez Rodríguez et al, 2003; Domínguez Rodríguez et al 2004).

La IL-6 es una citocina con potentes propiedades pro-inflamatorias. Leucocitos y células endoteliales liberan IL-6 en respuesta a la lesión de la pared vascular. La liberación de IL-6 induce la expresión de reactantes de fase aguda, así como la migración y diferenciación de los macrófagos (Schieffer B et al, 2000). Facilita, además, la liberación de quimiocinas como la MCP-1, la expresión de receptores para las LDL modificadas, su captación por los macrófagos y la síntesis de metaloproteinasas, por lo que contribuye en gran manera al desencadenamiento de los síndromes coronarios agudos. Regula, así mismo, la expresión de moléculas de adhesión y citocinas como la IL-1 β y el TNF- α quienes amplifican la reacción inflamatoria (Schieffer B et al, 2000). El aumento de los niveles de IL-6 en los pacientes con infarto agudo de miocardio es producido por la necrosis tisular que genera el propio infarto, y por la activación de células inflamatorias y miocitos (Ikeda U et al, 2001). Sin embargo, la lesión de la pared vascular también provoca la liberación de IL-6 por parte de las células endoteliales y los leucocitos que se adhieren a la pared vascular (Le J, Vilcek J, 1989).

Por otro lado, se sabe que la secreción y actividad de las citocinas se encuentra bajo control neuroendocrino central (Jankovic BD 1994), en concreto de la glándula pineal, a través de la secreción circadiana de melatonina (Guerrero JM, Reiter RJ, 2002). En nuestro estudio el déficit de melatonina nocturna puede contribuir, al menos en parte, al incremento nocturno de la IL-6. Aunque las variaciones diurnas de la IL-6 parecen estar controladas principalmente por la secreción de melatonina de la glándula pineal, esta hormona es también sintetizada por las células inmunocompetentes, y esta síntesis no está asociada a la producción nictameral (Carrillo-Vico et al, 2004).

El reclutamiento de células inflamatorias en el área lesionada y la formación de radicales libres por el propio infarto genera mediadores inflamatorios y activación de factores nucleares, particularmente el NF- κ B. Éste cumple una importante función en la síntesis de las citocinas pro-inflamatorias (Barnes PJ, Karin M, 1997). Se produce, de forma adicional, la expresión de moléculas de adhesión cuya misión será fijar más leucocitos, generándose una cascada inflamatoria que contribuye al daño miocárdico (Reiter RJ, Tan DX, 2003).

La capacidad de la melatonina para reducir la expresión de las moléculas de adhesión como la selectina-P y la ICAM (Cuzzocrea S et al, 2001) y la inhibición que produce sobre la activación del NF- κ B (Lezovalc'h F et al, 1998), podrían explicar la relación entre los niveles de melatonina e IL-6 en pacientes con infarto agudo de miocardio. Estas acciones producirían un efecto limitante de la respuesta inflamatoria local en la placa aterosclerótica, mediante la reducción en la síntesis de citocinas pro-inflamatorias, de moléculas de adhesión, de factores quimiotácticos y del crecimiento celular del sistema inmune. Por ello, la melatonina jugaría un papel "anti-inflamatorio" en nuestros pacientes. Hallazgos similares han sido reportados por otros autores (Lissoni P et al, 1997).

Niveles séricos luz /oscuridad de IL-8.

Los niveles séricos de IL-8 en los sujetos control mostraron variaciones diurnas, con valores en la fase de luz significativamente mayores respecto a los de la fase de oscuridad ($p=0,004$). En los pacientes con infarto agudo de miocardio los niveles séricos de IL-8 mostraron una tendencia a valores mayores en la fase de oscuridad respecto a los de la fase de luz, aunque ésta no alcanzó significación estadística ($p=0,052$). Los pacientes con infarto agudo de miocardio mostraron niveles de IL-8 significativamente superiores a los de sus correspondientes controles sólo en la fase de oscuridad ($p<0,001$).

La IL-8 es una citocina quimiotáctica producida por varios tipos celulares: monocitos, macrófagos y linfocitos T. Esta IL se libera bajo la acción de un estímulo inflamatorio. Los más potentes estímulos para su liberación son la IL-1 y el TNF- α (Matsushima K, Oppenheim JJ, 1989). Su función principal es la atracción de leucocitos polimorfonucleares, pero también interviene en la activación de monocitos y dirige su reclutamiento hacia las zonas de lesión vascular (Yamagishi M et al, 2005). Se le atribuyen propiedades pro-trombóticas al promover el incremento de la síntesis y expresión del TF en la superficie de los monocitos y pro-aterogénicas al facilitar la degradación de la cápsula fibrosa por su capacidad para disminuir al inhibidor tisular de las metaloproteinasas de tipo 1 (MPTI-1) (Moreau M, et al 1999). El NF- $\kappa\beta$ es un factor regulador cuya activación provoca el incremento coordinado en la expresión de multitud de genes entre cuyos productos se encuentran, entre otros, la IL-1, el TNF- α , IL-8 y moléculas de adhesión (Barnes PJ, Karin M, 1997).

La capacidad de la melatonina para inhibir la activación del NF- $\kappa\beta$ (Mohan N et al, 1995; Gilad E et al, 1998; Lezovalc'h F et al, 1998), de reducir la expresión de las moléculas de adhesión como la selectina-P y la ICAM (Cuzzocrea S et al, 2001), y de la IL-1, el TNF- α e IL-8 podrían explicar, al menos en parte, la relación entre los niveles de melatonina e IL-8.

Niveles séricos luz /oscuridad de IL-10.

La IL-10 es una citocina anti-inflamatoria producida por linfocitos T helper tipo 2 activados, células B, monocitos y macrófagos. Cumple una función inhibitoria en el sistema inmunitario a múltiples niveles, entre los que se enumeran la síntesis de citocinas pro-inflamatorias y la activación de los macrófagos (Moore KW et al, 1993). Actúa principalmente bloqueando la actividad del NF- κ B tanto mediante la prevención de la degradación de sus inhibidores como la supresión de la actividad de su unión al DNA (Schottelius AJ et al, 1999).

En nuestro estudio, los niveles séricos de IL-10 no mostraron variaciones diurnas tanto en los sujetos control como en los pacientes con infarto agudo de miocardio. Resultados similares han sido previamente publicados en sujetos sanos (Lissoni P et al, 1998). Sin embargo, los pacientes con infarto agudo de miocardio mostraron niveles de IL-10 significativamente mayores que los de sus correspondientes controles, tanto en la fase de luz ($p < 0.001$) como en la fase de oscuridad ($p < 0,001$). Estos hallazgos concuerdan con los resultados de estudios previos (Shibata M et al, 1997; Domínguez Rodríguez et al 2005).

Los diversos estudios realizados para conocer la relevancia de la IL-10 en la aterosclerosis sugieren que ésta desempeña un papel protector limitando la respuesta inflamatoria local que favorece la progresión e inestabilidad de la placa aterosclerótica, lo cual condiciona, en última instancia, el desarrollo de acontecimientos coronarios agudos (Pérez Fernández R, Kaski JC, 2002).

Niveles séricos luz /oscuridad de Neopterina.

En nuestro estudio hemos encontrado variaciones diurnas en los niveles séricos de neopterina: su concentración sérica en la fase de luz fue significativamente más alta que en la fase de oscuridad, tanto en los sujetos sanos ($p=0,0004$) como en los pacientes con infarto agudo de miocardio ($p=0,0027$). Sin embargo, en éstos últimos hubo una significativa mayor amplitud en relación con la apreciada en los sujetos control y además, la concentración sérica de neopterina en la fase de luz alcanzó en los pacientes con infarto agudo de miocardio niveles significativamente más elevados que en los sujetos control ($p<0,001$).

Los mayores niveles de neopterina encontrados en los pacientes con infarto agudo de miocardio, en comparación con los de sujetos sanos, concuerda con lo previamente publicado en la literatura (Schumacher M et al, 1997). Mayores niveles de neopterina sérica se han correlacionado con el grado de actividad de la enfermedad coronaria (García-Moll X et al, 2000) y tienen, además, un importante significado pronóstico en los pacientes con síndrome coronario agudo (Kaski JC et al, 2003).

La existencia de variaciones diurnas de los niveles de neopterina en sujetos sanos ha sido descrita previamente, tanto en orina (Auzéby et al, 1988), como en sangre (García González MJ et al, 2006). Sin embargo, hasta el momento actual en la literatura biomédica no encontramos referencias sobre la existencia de variaciones diurnas en los niveles séricos de neopterina en los pacientes con infarto agudo de miocardio.

La neopterina es un derivado pteridínico, un subproducto de la vía biosintética de la guanosin trifosfato–biopterina (Auerbach G, Nar H, 1997). Es un excelente marcador biológico de la actividad del sistema inmunitario celular (Murr C et al, 2002). Su síntesis y liberación se realiza principalmente por monocitos y macrófagos activados principalmente por la estimulación del IFN- γ secretado por parte de los linfocitos T helper tipo 1 (Huber C et al, 1984).

Se ha sugerido que las variaciones circadianas en los niveles de melatonina pueden ser responsables, al menos en parte, de las variaciones diurnas de los niveles séricos de neopterina (García Gonzalez MJ et al, 2006). Existen dos posibles explicaciones para este fenómeno: 1) Algunos compuestos pteridínicos ejercen una función moduladora a nivel de las enzimas que intervienen en el metabolismo de los indoles en la glándula pineal. La biopterina es un cofactor enzimático esencial para la

triptófano-hidroxilasa, enzima que cumple una importante función en la síntesis de neurotransmisores y constituye un punto clave en la regulación de la vía biosintética de la melatonina (Van Benthem et al, 1985). La melatonina es un inhibidor efectivo de la síntesis de biopterina, a través de sus efectos, tanto a nivel directo sobre la actividad catalítica de la guanosin-trifosfato ciclohidrolasa I, así como de su expresión génica (Jang YJ et al, 2000). 2) La producción circadiana de melatonina influye en las fluctuaciones diurnas del número y funciones de las células del sistema inmunitario (Carrillo-Vico et al, 2005). Existen variaciones circadianas en los diferentes subtipos de linfocitos T circulantes: linfocitos T totales, linfocitos T helper y del cociente T helpers / T supresores – citotóxicos (Lévi et al, 1988), con un patrón similar al descrito para la melatonina y la neopterinina para los sujetos sanos en este estudio. Además se ha demostrado como la melatonina puede modular el número de linfocitos T y la activación de los macrófagos (Morrey KM et al, 1994).

En los pacientes con infarto agudo de miocardio, los niveles de melatonina en la fase de oscuridad están reducidos y los de neopterinina en la fase de luz están elevados de forma significativa, en relación con los correspondientes en sujetos sanos. Dos posibles mecanismos, podrían explicar los siguientes hechos: 1) La neopterinina es capaz de inducir e incrementar la génesis de especies reactivas de oxígeno, modular su producción y sus efectos (Razumovitch JA et al, 2004). Ambos, neopterinina y estrés oxidativo, son mecanismos descritos capaces de activar la transcripción celular del factor nuclear NF- κ B (Hoffmann G et al, 1996). 2) En los monocitos, neutrófilos y linfocitos T existen receptores para la melatonina, células en las que esta hormona contribuye a regular el pool de especies reactivas con el oxígeno a través de la oxidación y consumo del anión superóxido y ejerce funciones inmunomoduladoras como algunos efectos sobre la liberación de citocinas en los neutrófilos (Silva OS et al, 2004).

Estas acciones de la melatonina están mediatizadas por su conocido efecto inhibidor sobre la activación del factor de transcripción NF- κ B (Mohan N et al, 1995; Gilad E et al, 1998; Lezovalc'h F et al, 1998; Cuzzocrea S, Reiter RJ, 2001). Por lo tanto, parece existir una relación recíproca entre melatonina y neopterinina

Niveles séricos luz /oscuridad de sVCAM-1.

En nuestro estudio, los niveles séricos de sVCAM-1 en los sujetos control no mostraron variaciones diurnas. Sin embargo, en los pacientes con infarto agudo de miocardio existen variaciones diurnas en los niveles de sVCAM-1, con la singularidad de que los niveles en la fase de oscuridad fueron significativamente mayores que en la fase de luz ($p=0,002$).

Las moléculas de adhesión celular son proteínas que regulan la fijación y trans migración endotelial de los leucocitos. (Adams DH, Shaw S, 1994). La VCAM-1 pertenece a la superfamilia de inmunoglobulinas transmembrana de las moléculas de adhesión celular. Mientras que la ICAM-1 es expresada por macrófagos y células endoteliales en respuesta a IL-1, TNF- α e INF- γ , la VCAM-1 se expresa de forma restringida en las células endoteliales y musculares lisas (Davies MJ et al, 1993). La expresión de las moléculas de adhesión celular en la superficie de las células endoteliales precede al reclutamiento de macrófagos y linfocitos T hacia la placa. Tras ser activadas por citocinas, se desprenden de la superficie celular endotelial en una forma soluble (sVCAM-1) y niveles circulantes pueden ser detectados en sangre (Armstrong EJ et al, 2006).

El papel patogénico de las moléculas de adhesión celular circulantes es desconocido, pero su presencia se considera un marcador de activación endotelial e inflamación vascular (Blake GJ, Ridker PM, 2001). Sin embargo, en estudios prospectivos en sujetos sin enfermedad coronaria manifiesta, los niveles plasmáticos basales de sVCAM-1 no estuvieron asociados con un riesgo cardiovascular aumentado, a diferencia de lo observado con otras moléculas de adhesión celular como sICAM-1, sugiriéndose que este hecho podría estar en relación con su más restringida expresión (Hwang SJ et al, 1997; de Lemos et al, 2000).

En nuestro estudio los niveles séricos de sVCAM-1 en los pacientes con IAM fueron significativamente más elevados que en los sujetos control ($p<0,001$). Esta diferencia se mantuvo tanto en la fase de luz ($p<0,01$) como en la de oscuridad ($p<0,001$).

El estudio de las variaciones diurnas de las moléculas de adhesión es muy limitado y sus resultados controvertidos. Se ha comunicado, en un estudio en sujetos sanos, variaciones diurnas para la sSelectina-E y sICAM-1 (Maple C et al, 1998). Sin embargo, otro estudio realizado en pacientes con y sin enfermedad arterial coronaria, de

forma contradictoria, no encontró variaciones para estas moléculas y, en cambio, si demuestra variaciones diurnas en los niveles séricos de sSelectina-P (Osmancik P et al, 2004).

El reclutamiento de células inflamatorias en el área lesionada y la formación de radicales libres por el infarto agudo de miocardio genera mediadores inflamatorios y activación de factores nucleares, particularmente el NF- κ B. Éste cumple una importante función en la síntesis de las citocinas pro-inflamatorias (Barnes PJ, Karin M, 1997) y además interviene en la expresión de la VCAM-1, entre otras moléculas de adhesión (Lu L et al, 2004; Min JK et al, 2005). Es conocida la capacidad de la melatonina para reducir la expresión de las moléculas de adhesión como la selectina-P y la ICAM (Cuzzocrea S et al, 2001) y la inhibición que produce sobre la activación del NF- κ B (Lezovalc'h F et al, 1998).

Niveles séricos luz /oscuridad de OxLDL.

En nuestro estudio, los niveles séricos de OxLDL no mostraron variaciones diurnas en los pacientes con infarto agudo de miocardio ni en los sujetos control. Sin embargo, los pacientes con infarto agudo de miocardio mostraron niveles de OxLDL significativamente mayores que los sujetos control, tanto en la fase de luz ($p < 0,001$) como en la fase de oscuridad ($p < 0,001$).

Varios estudios han señalado la existencia de niveles de OxLDL significativamente mayores en pacientes con síndrome coronario agudo, indicado que las OxLDL podrían ser un interesante marcador para la aterosclerosis (Holvoet P et al, 1998; Steinberg D, 1997). Nuestros resultados en pacientes con infarto agudo de miocardio concuerdan con estos hallazgos y confirman los que recientemente hemos comunicado (Domínguez Rodríguez et al, 2005-bis). En éste estudio se sugiere, además, una asociación entre los niveles nocturnos de OxLDL y melatonina en los pacientes con infarto agudo de miocardio.

La OxLDL es un factor crítico en el inicio y progresión de la aterosclerosis y contribuye a la disfunción endotelial y la desestabilización de la placa aterosclerótica a través de múltiples mecanismos (Holvoet Pet al, 1994; Landmesser U, Harrison DG, 2001). La presencia de OxLDL y otros lípidos oxidados en las placas ateroscleróticas se ha puesto de manifiesto en estudios en humanos (Witzum JL, Steinberg D, 2001). Las partículas de LDL del plasma infiltran los espacios de la íntima de las arterias y son oxidadas por radicales libres de oxígeno (hidroxil y peroxil radicales) que inicialmente atacan a los más fácilmente oxidables ácidos grasos poliinsaturados, mediante la sustracción de un átomo de hidrógeno de un enlace alílico en un grupo metileno de sus cadenas laterales. La formación de radicales dienil lipídicos provocan el reajuste de las cadenas, que se estabilizan con la formación de conjugados dieno, productos intermedios de la peroxidación lipídica, los cuales tras la captura de oxígeno forman peroxil radicales. La propagación de la cadena reactiva prosigue, dando lugar a la formación de hidroxiperoxidos (Steinberg D et al, 1989).

El inicio de la peroxidación lipídica está íntimamente relacionado con las concentraciones de variadas sustancias antioxidantes como son la vitamina E, licopeno, retinoides y carotenoides (Esterbauer H et al, 1989; Babiy AV et al, 1990). La melatonina debido a sus múltiples acciones antioxidantes produciría acciones protectoras a nivel cardíaco bajo condiciones de alto estrés oxidativo: es un potente

recolector de radicales libres y es significativamente más eficiente con los radicales hidroxil que el propio glutatión intracelular (Stasica P et al, 1998); también lo es de los peroxil radicales (Pieri C et al, 1994); del altamente tóxico anión peroxinitrito (Cuzzocrea S et al, 1997); y puede inhibir la oxidación de la LDL a través de su capacidad como recolector de radicales alcoxil lipídicos (Esterbauer H et al 1992).

Los niveles circulantes nocturnos de melatonina fisiológica pueden ser requeridos, junto con otros antioxidantes fisiológicos, para mantener el estatus oxidativo total de las células tan bajo como sea posible, y de esta forma contribuir en parte, a descender los niveles de OxLDL circulantes, comportándose la melatonina como una hormona con probables propiedades anti-aterogénicas.

Niveles séricos luz /oscuridad de MPO.

En nuestro estudio los niveles séricos de MPO en los sujetos control no mostraron variaciones diurnas. Se apreció una tendencia hacia valores más altos en las concentraciones séricas en la fase de oscuridad respecto a las de la fase de luz, pero sin llegar a la significación estadística ($p=0,06$). En los pacientes con infarto agudo de miocardio encontramos valores séricos de MPO significativamente superiores a los de los sujetos control, con el interesante hallazgo de variaciones diurnas en los niveles de MPO: los niveles en la fase de oscuridad fueron significativamente mayores que en la fase de luz ($p < 0,0001$).

Nuestros resultados en los pacientes con infarto agudo de miocardio concuerdan con lo descrito en la literatura. La MPO juega un papel importante en la patogénesis de los síndromes coronarios agudos a través de su participación en la desestabilización y transformación de placas estables en inestables. Leucocitos circulantes y macrófagos que infiltran las placas culpables de los síndromes coronarios agudos secretan MMPs y MPO que degrada la matriz colágena de la fina capa que recubre el ateroma haciéndolo más propenso a la ruptura o erosión (Sugiyama S et al, 2001). Diversos estudios evalúan la actividad en sangre y leucocitos de MPO en sujetos con y sin enfermedad coronaria, demostrando que los niveles elevados de MPO se asocian con la presencia de enfermedad arterial coronaria (Zhang R et al, 2001). Esta asociación se mantiene de forma significativa incluso tras controlar los niveles de PCR y los factores de riesgo clásicos (Zhang R et al, 2001). Además, los niveles circulantes de MPO son un potente marcador de riesgo tanto en los pacientes que se presentan con dolor torácico como con síndrome coronario agudo, demostrándose su utilidad para la estratificación pronóstica en los mismos, encontrándose que sus niveles son predictores de futuros eventos cardiovasculares en los pacientes, con un mayor efecto en los pacientes con troponina T “negativa” (Brenan ML et al, 2003; Baldus S et al, 2003).

Multitud de observaciones han puesto de relieve el papel que juega la peroxidación lipídica y su interacción con el endotelio vascular en el inicio y progresión de la arteriosclerosis (Griendling KK, FitzGerald GA, 2003; Nicholls SJ, Hazen SL, 2005). La MPO es miembro de la superfamilia de las hemoperoxidasas, que secretada por los neutrófilos activados, monocitos y algunos macrófagos, es capaz de generar numerosas especies reactivas de oxígeno y radicales libres. Se ha demostrado su importante papel en la promoción de estrés oxidativo a nivel de la respuesta

inflamatoria vascular y su intervención en la peroxidación lipídica (Podrez EA et al, 2000; Zhang R et al 2002; Zhang R et al, 2002-bis). De acuerdo con estas evidencias, en nuestro estudio encontramos, como ya se ha comentado, niveles de OxLDL en los pacientes con infarto agudo de miocardio significativamente mayores que en los sujetos control, tanto en la fase de luz como en la fase de oscuridad. Éste hallazgo posiblemente esté influenciado, al menos en parte, por unos mayores niveles de MPO en los pacientes con infarto agudo de miocardio.

La melatonina posee potentes propiedades antioxidantes (Beyer CE et al, 1998; Allegra M et al, 2003; Reiter RJ et al, 1994). Se ha demostrado que es un eficiente recolector de radicales libres cuya eficacia es superior a la del glutatión y la de otros antioxidantes endógenos como la vitamina E (Beyer CE et al, 1998; Pieri C et al, 1994; Pieri C et al 1995). La oxidación de la melatonina da lugar a compuestos kinuramínicos como N(1)-acetil-N(2)-formil-5-metoxikinurenamina y N(1)-acetil-5-metoxikinurenamina que poseen también potente acción antioxidante (Silva SO et al, 2004). Varios estudios demuestran que el mecanismo de oxidación de la melatonina por parte de leucocitos y macrófagos depende de la MPO (Rodrigues MR et al, 2003; Silva SO et al, 2004; Ximenes VF et al, 2005).

Es particularmente interesante el hallazgo de variaciones diurnas en los niveles de MPO: los niveles en la fase de oscuridad fueron significativamente mayores que en la fase de luz. Las variaciones circadianas en los niveles de melatonina pueden ser responsables, al menos en parte, de las variaciones diurnas encontradas en la producción de MPO en los pacientes con infarto agudo de miocardio. En el infarto agudo de miocardio existe un importante fenómeno de reclutamiento de células inflamatorias hacia el área lesionada así como la formación de radicales libres (Granger DN, 1997). El estrés oxidativo, al que contribuye la MPO, es capaz de promover la activación de factores nucleares, particularmente el NF- κ B, quien promueve la transcripción de la síntesis de citocinas pro-inflamatorias (Barnes PJ, Karin M, 1997) y factores quimiotácticos para leucocitos, monocitos y macrófagos (Lu L et al, 2004; Min JK et al, 2005). La capacidad de la melatonina para inhibir la activación del NF- κ B (Lezvalc'h F et al 1998; Reiter RJ et al 2000), sería un paso limitante en el reclutamiento de las células inflamatorias que una vez activadas producirían MPO. Estas acciones podrían explicar la influencia que las variaciones circadianas de los niveles de melatonina podrían ejercer, al menos en parte, sobre las variaciones diurnas de los niveles de MPO observadas en los pacientes con infarto agudo de miocardio y hacen considerar el papel

“antiinflamatorio” que puede jugar la melatonina en los mismos, mediante un efecto limitante de la respuesta inflamatoria.

Niveles séricos luz /oscuridad de MMP-9.

Los resultados de nuestro estudio revelan que los pacientes con infarto agudo de miocardio presentan valores séricos de MMP-9 significativamente superiores a los de los sujetos control. Además encontramos que, mientras que los sujetos control no presentan variaciones diurnas en los niveles séricos de MMP-9, en los pacientes con infarto agudo de miocardio los niveles séricos de MMP-9 si muestran variaciones diurnas: los niveles en la fase de luz fueron significativamente mayores que en la fase de oscuridad ($p=0,0005$).

La información sobre variaciones diurnas de la MMP-9 es muy limitada. Nuestros resultados en los sujetos control concuerdan con los de un estudio reciente (Tayebjee MH et al, 2005) en relación a la ausencia de variaciones diurnas en los niveles séricos de MMP-9 en sujetos sanos. Sin embargo, hasta donde conocemos, en la literatura no existen estudios que evalúen este aspecto en pacientes con infarto agudo de miocardio.

Las metaloproteinasas de la matriz (MMPs) pertenecen a la familia de las endoproteinasas con las que comparten similitud estructural y funcional, a pesar de sus diferencias en cuanto a su fuente de origen, especificidad por el sustrato e inducibilidad (Visse R, Nagase, 2003). Estas enzimas intervienen en el remodelado vascular, la inestabilización de la placa aterosclerótica y el remodelado ventricular postisquémico (Lu L et al, 2000). Estudios previos demuestran que los niveles séricos de MMP-9 en pacientes con infarto agudo de miocardio y síndrome coronario agudo son mayores en relación con los de sujetos control (Kai H et al, 1998; Inokubo Y et al, 2001). Los resultados de nuestro estudio coinciden con ellos.

Los radicales libres pueden modular y modificar la actividad de las MMPs. Varios estudios demuestran que las especies reactivas de oxígeno, y por consiguiente el estrés oxidativo, pueden activar la MMPs (Wainwright CL, 2004; Rajagopalan S et al 1996). La MMP-9 es expresada principalmente por las células inflamatorias que infiltran los tejidos miocárdicos lesionados, como neutrófilos y macrófagos (Cheung PY et al, 2000; Lindsey M et al 2001). En el infarto agudo de miocardio existe un importante reclutamiento de leucocitos activados hacia los tejidos lesionados (Granger DN, 1997). Una vez alcanzado su objetivo estas células generan mediadores inflamatorios y promueven la activación de factores de transcripción nuclear sensibles al estrés oxidativo, en particular el NF- κ B. Se ha demostrado que el NF- κ B es capaz de

inducir la expresión de MMP-9 (Mori N et al, 2003). La demostrada capacidad de la melatonina de inhibir la activación del factor de transcripción NF- κ B puede constituir una posible explicación para que las variaciones circadianas en los niveles de melatonina sean responsables, al menos en parte, de las variaciones diurnas de la MMP-9 en los pacientes con infarto agudo de miocardio.

Niveles séricos luz /oscuridad de sCD40L.

En los sujetos control, en nuestro estudio, los niveles séricos de sCD40L no mostraron variaciones diurnas. Sin embargo, en los pacientes con infarto agudo de miocardio las concentraciones séricas de sCD40L mostraron variaciones diurnas, con niveles en la fase de luz significativamente superiores a los de la fase de oscuridad ($p < 0,0001$). En los pacientes con infarto agudo de miocardio sólo los niveles de sCD40L en la fase de luz fueron significativamente mayores que los de los sujetos control, tanto en la fase de luz ($p < 0,001$) como en la de oscuridad ($p < 0,001$). El estudio de las variaciones diurnas de las concentraciones de sCD40L es inexistente. En la literatura no encontramos referencias sobre posibles variaciones en los niveles séricos de sCD40L en sujetos sanos ni en pacientes con síndrome coronario agudo.

Numerosas evidencias científicas ponen de manifiesto que el sistema CD40-CD40L juega un papel central en el inicio y progresión de la aterosclerosis (Schönbeck U, Libby P, 2001). El CD40 es una proteína integral de la membrana citoplásmica de 50 kDa perteneciente a la superfamilia de receptores del TNF que incluye TNF-R1, TNF-R2, CD30, CD27 y Fas entre otros. El ligando del CD40, CD40L (también denominado CD154), es también un miembro de ésta familia, de 39 kDa. El sistema CD40-CD40L fue considerado originalmente como un sistema de intercomunicación entre linfocitos de tipo B y T, pero se sabe que también se expresa en otros tipos celulares como células dendríticas, monocitos, macrófagos, células endoteliales y fibroblastos (Schönbeck U, Libby P, 2001). La activación del sistema CD40-CD40L mediante la unión del CD40L a su receptor CD40 promueve una serie de respuestas cruciales para la expresión de moléculas de adhesión celular, quimiocinas, citocinas proinflamatorias así como MMPs (Coope HJ et al 2002; Zoog Sj et al, 2004). CD40 y CD40L están presentes en las placas y se expresa en macrófagos, células endoteliales, linfocitos T y células musculares lisas en todos los estadios de la lesión aterosclerótica (March F et al, 1997). Un amplio y creciente conjunto de datos conectan cada vez más inflamación y trombosis en el inicio y desarrollo de la aterosclerosis, involucrando en ello al sistema CD40-CD40L. Una prueba fehaciente de esta conexión en los síndromes coronarios agudos lo aporta la formación de agregados heterotípicos entre plaquetas y monocitos, demostrándose que los mismos son un marcador precoz en el infarto agudo de miocardio (Furman MI et al, 2001). El endotelio activado, leucocitos y células musculares lisas son capaces de promover la trombosis. El sistema CD40-CD40L

induce la expresión de TF tanto en células endoteliales como células musculares lisas (Schonbeck U et al, 2000; Bavendiek U et al, 2002), lo cual favorece un estado procoagulante. Las plaquetas, por su parte, son capaces de promocionar la vía inflamatoria: las plaquetas activadas y el trombo fresco expresan altos niveles de CD40L. La activación plaquetaria produce la rápida translocación a la superficie del CD40L. El CD40L expresado en la superficie plaquetaria es escindido en un periodo de minutos a horas y genera el fragmento soluble sCD40L. Se estima que el 95% del sCD40L circulante se deriva de las plaquetas (André P et al, 2003).

Nuestros resultados demuestran la existencia de niveles circulantes más elevados de sCD40L en los pacientes con infarto agudo de miocardio respecto a los sujetos control. Se ha demostrado la presencia de niveles circulantes elevados de sCD40L en pacientes con síndrome coronario agudo (Aukrust P et al, 1999; Lee Y et al, 1999; Garlich CD et al, 2001), así como su valor predictor de riesgo de futuros eventos cardiovasculares asociado a distintas situaciones (Garlich CD et al, 2001; Schönbeck U et al, 2001; Heeschen C et al, 2003).

Múltiples evidencias sugieren que la actividad plaquetaria está influenciada por los niveles circulantes de melatonina. Se ha documentado la existencia de variaciones circadianas en el número de las plaquetas circulantes con un pico vespertino (Haus E et al, 1984; Bremner WF et al, 2000) y en la agregabilidad plaquetaria con pico matutino (Jovicic A, Mandil S, 1991; Jafri SM et al, 1992). La variabilidad circadiana en la presentación de los sucesos isquémicos con un pico matutino coincide con el pico matutino de la agregabilidad plaquetaria (Toffler GE et al, 1987). Estas observaciones coinciden con los resultados en los niveles de sCD40L en nuestros pacientes con infarto agudo de miocardio en los que hemos encontrado una significativa mayor concentración sérica de sCD40L en la fase de luz que en la fase de oscuridad.

El sCD40L modula la respuesta inflamatoria y trombótica dependiente de las plaquetas (Henn V et al, 1998). Diversos estudios ponen de manifiesto las acciones del estrés oxidativo en el incremento en la expresión del CD40L (Pignatelli P et al, 2004). Se ha demostrado que la incubación de células endoteliales humanas y células musculares lisas con Ox-LDL incrementa la expresión del CD40 y CD40L en las mismas (Schönbeck U et al, 2002). A su vez, se ha observado recientemente que el CD40L promueve la activación y agregación de las plaquetas y su conjugación con leucocitos, e incrementa en las mismas la liberación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (Chakrabarti S et al, 2005). Tanto la expresión plaquetaria del CD40L como

la liberación de radicales libres de oxígeno por las plaquetas, pueden ser inhibidos por sustancias con acción antioxidante (Carr AC et al, 2000; Pignatelli P et al 2005). La melatonina posee potentes propiedades antioxidantes (Beyer CE et al, 1998; Allegra M et al, 2003; Reiter RJ et al, 1994) cuya eficacia es superior a la del glutatión y la de otros antioxidantes endógenos como la vitamina E (Pieri C et al, 1995; Beyer CE et al, 1998). Un hecho de particular interés es la existencia de receptores en la membrana plaquetaria para la melatonina (Vacas MI et al, 1992). Además, recientemente se ha demostrado la existencia de melatonina en las propias plaquetas (Morera AL, Abreu P, 2005). La melatonina ejerce acciones a nivel plaquetario a diversos niveles: se ha descrito su capacidad para inhibir la agregabilidad plaquetaria, inhibir los mecanismos secretorios plaquetarios a través de la reducción en la liberación de serotonina y ATP e inhibir la producción de tromboxano B₂ (Cardinali DP et al 1993; Kornblihtt LI et al, 1993; Vacas MI et al, 1991). Por lo tanto la melatonina se mostraría como una molécula capaz de ejercer una función moduladora sobre la respuesta inflamatoria y trombótica dependiente de las plaquetas en los pacientes con infarto agudo de miocardio.

Niveles séricos luz /oscuridad de PAPP-A

PAPP-A es una metaloproteinasa de la matriz ligadora de zinc, perteneciente a la superfamilia de las metzincin peptidasas, de 200 kDa, sintetizada por el sincitiotrofoblasto y típicamente determinada durante el embarazo para el *screening* del síndrome de Down (Wald NJ et al, 1996). Además de la placenta es expresada, aunque a mucho menor nivel, por endometrio, testículos, riñón, colon y en múltiples tejidos proliferantes tanto adultos como fetales (Overgaard MT et al, 1999).

En nuestro estudio no se apreciaron variaciones diurnas en las concentraciones séricas de PAPP-A en los sujetos control ($p=0,35$) ni en los pacientes con infarto agudo de miocardio ($p=0,41$). Tampoco se apreció diferencias significativas en las concentraciones séricas de PAPP-A entre pacientes con infarto agudo de miocardio y sujetos control.

Estudios recientes ponen en relación la existencia de niveles séricos elevados de PAPP-A con la presencia, extensión y complejidad morfológica de la estenosis vascular en pacientes con enfermedad arterial coronaria (Cosin-Sales J et al, 2004; Cosin-Sales J et al, 2005). Además, se ha propuesto la determinación de sus niveles circulantes como nuevo marcador biológico en síndrome coronario agudo (Bayes-Genís A et al, 2001). En un estudio en pacientes con sospecha de infarto agudo de miocardio y niveles de troponina Ic negativos, la determinación de los niveles circulantes de PAPP-A, con un nivel de corte de 2,9 mIU/L, se mostró como un potente predictor independiente de eventos isquémicos cardiacos (Lund J et al, 2003). Estos hallazgos parecen confirmarse en otro reciente estudio en 547 pacientes con síndrome coronario agudo, con demostración angiográfica, que mostró que los niveles elevados de PAPP-A fueron un indicador de mayor riesgo de muerte e infarto de miocardio respecto a una población heterogénea de pacientes con dolor torácico, discriminando incluso un grupo de mayor riesgo entre los pacientes con valores de troponina Tc negativa. La validación prospectiva en pacientes con dolor torácico confirmó que los niveles de PAPP-A identificaron fiablemente a los pacientes de alto riesgo (Heeschen C et al, 2005). Sin embargo, otro estudio en 346 pacientes que se presentaron con síndrome coronario agudo en servicios de urgencia, las concentraciones circulantes de PAPP-A para predecir eventos adversos a los 30 días fue modesta, incluso inferior a la de la troponina Tc (Laterza OF et al, 2004).

Nuestros hallazgos confirman los resultados recientemente publicados de un estudio previo que pone en evidencia que los niveles de PAPP-A no son un marcador precoz ideal para el diagnóstico del infarto agudo de miocardio. Este estudio no encontró diferencias significativas entre los pacientes con infarto agudo de miocardio y los sujetos control en las concentraciones séricas de PAPP-A (Domínguez Rodríguez et al, 2005-bis 3). Las razones de estos controvertidos hallazgos en los distintos estudios se han intentado explicar en base a la metodología utilizada para las determinaciones de los niveles circulantes de PAPP-A y a la propia naturaleza de esta proteína. Así se ha sostenido que el PAPP-A circulante asociado a los síndromes coronarios agudos es de naturaleza sensiblemente diferente del PAPP-A relacionado con el embarazo, por lo que requiere del concurso de inmunoensayos más apropiados (Qin QP et al, 2005; Qin QP et al, 2006). Además, la controversia se amplía sobre el exacto papel que juega el PAPP-A en los síndromes coronarios agudos, atribuyéndosele un papel promotor de la reparación del daño tisular y supresor de la inflamación en virtud de sus acciones IGF-1-dependientes sobre la vasculogénesis, el preconditionamiento y la supervivencia celular y la sensibilidad insulínica (Conti E et al, 2004).

Niveles séricos luz /oscuridad de PCR.

En nuestro estudio los niveles séricos de PCR no mostraron variaciones diurnas en los sujetos control. Sin embargo, resulta interesante el singular hallazgo de variaciones diurnas en los niveles de PCR en los pacientes con infarto agudo de miocardio, con la particularidad de que los niveles en la fase de luz fueron significativamente mayores que en la fase de oscuridad ($p < 0,0001$). Estos resultados confirman los hallazgos de un estudio previo recientemente comunicado (Domínguez Rodríguez et al, 2006).

Está descrita en la literatura biomédica la existencia de variaciones circadianas en los niveles circulantes de algunas citocinas y reactantes de fase aguda (Sothorn RB et al, 1995; Kanikowska D et al, 2001). Sin embargo, no se ha demostrado la existencia de variaciones circadianas en los niveles circulantes de PCR en sujetos sanos (Meier-Ewert HK et al, 2001). En nuestro estudio, los resultados obtenidos en los sujetos control en condiciones basales, concuerdan con esta observación. Sin embargo, en los pacientes con infarto agudo de miocardio hemos encontrado variaciones diurnas en los niveles séricos de PCR, los cuales fueron significativamente mayores en la fase de luz en comparación con los de la fase de oscuridad.

Las variaciones circadianas en los niveles de melatonina encontradas en este estudio pueden ser responsables, al menos en parte, de las variaciones diurnas encontradas en la producción de PCR en los pacientes con infarto agudo de miocardio. La PCR del plasma es producida por los hepatocitos (Pepys MB & Hirschfield GM, 2003). La síntesis hepática de PCR esta predominantemente bajo control transcripcional por la IL-6 y comienza, *de novo*, muy rápidamente en respuesta a los estímulos apropiados, como por ejemplo la isquemia miocárdica, con concentraciones séricas que se elevan por encima de 5 mg/L alrededor de 6 horas después (Pepys MB & Hirschfield GM, 2003). En este estudio, el déficit nocturno de melatonina se ha puesto en relación con su capacidad de actuar como recolector de radicales libres producidos durante el infarto agudo de miocardio (Domínguez Rodríguez et al, 2002). Así mismo, los niveles séricos de IL-6 en los pacientes con infarto agudo de miocardio, en éste y otros estudios (Domínguez Rodríguez et al, 2003; Domínguez Rodríguez et al 2004), muestran variaciones diurnas. Las variaciones diurnas en los niveles de IL-6 en los pacientes con infarto agudo de miocardio se ha relacionado con la secreción circadiana de melatonina, estableciéndose que el déficit nocturno de melatonina observado en los mismos puede

contribuir, al menos en parte, al incremento nocturno de IL-6 (Domínguez Rodríguez et al, 2004). Por ello una posible razón para explicar la relación entre los niveles de melatonina y PCR encontrada en nuestro estudio podría ser que los niveles de melatonina nocturnos reducidos modularían los niveles de IL-6 (Domínguez Rodríguez et al, 2006).

CONCLUSIONES

Las conclusiones que se derivan del presente estudio pueden sintetizarse en los siguientes puntos:

1. En los diversos estadios de la enfermedad aterosclerótica coronaria donde intervienen: a) marcadores de actividad inmunitaria celular (neopterina, IL-1 β , IL-6, IL-8 e IL-10), b) mediadores en el inicio, progresión y desestabilización de la placa (sVCAM-1, OxLDL, MPO y MMP-9), c) marcadores inflamatorios involucrados en la ruptura de la placa (sCD40L y PAPP-A) y d) reactantes de fase aguda (PCR), las variaciones luz / oscuridad de algunas de estas moléculas durante las 24 horas del día permitiría, hipotéticamente, identificar los momentos del día o de la noche en los que “picos de actividad inflamatoria”, pudieran asociarse con una mayor incidencia de acontecimientos cardiovasculares.
2. El sustrato inflamatorio involucrado en los síndromes coronarios agudos es extremadamente complejo, con un gran número de factores implicados tanto en su activación como en su modulación. Entre estos factores se encuentran las variaciones diurnas de hormonas circadianas como la melatonina.
3. Parece probable que las variaciones circadianas en el equilibrio entre procesos protrombóticos e inflamatorios en la enfermedad aterosclerótica coronaria, puedan estar influenciadas, al menos en parte, por el reloj biológico localizado en el núcleo supraquiasmático, cuyo ritmo se encuentra determinado por la alternancia día - noche, es decir, por el ritmo luz / oscuridad.
4. Los pacientes con infarto agudo de miocardio conservan el ritmo circadiano de las concentraciones séricas de melatonina. Sin embargo, y posiblemente como consecuencia del consumo de la misma como recolector de radicales libres generados en las primeras 24 horas del infarto, su amplitud en el ritmo es menor.
5. Los hallazgos del presente estudio abren las puertas a nuevas investigaciones en el campo de los ritmos biológicos en humanos, en el que se hacen necesarios más estudios que ayuden a aclarar los mecanismos que subyacen a la periodicidad de la presentación de los síndromes coronarios agudos. Sin duda alguna, este estudio representa un gran estímulo para futuros proyectos de investigación y para el

eventual desarrollo de nuevas modalidades terapéuticas, basada en los avances que se produzcan en el campo de la inflamación y su relación con variables “ritmométricas” en la patología cardiovascular.

REFERENCIAS

Abo T, Kawate T, Itoh K, Kumagai K. Studies on the bioperiodicity of the immune response. I. Circadian rhythms of human T, B, and K cell traffic in the peripheral blood. *J Immunol* 1981; 126: 1360 - 1363.

Adams DH, Shaw S. Leucocyte-endothelial interactions and regulation of leucocyte migration. *Lancet* 1994; 343: 831 - 836.

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

Alpert JS, Thygesen K, Antman E, Bassand JP et al. Myocardial infarction redefined - a consensus document of The Joint European Society of Cardiology / American College of Cardiology Committee for redefinition of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2000; 36: 959 - 969.

Altun A, Yaprak M, Aktoz M, Vardar A, Betul UA, Ozbay G. Impaired nocturnal synthesis of melatonin in patients with cardiac syndrome X. *Neurosci Lett* 2002; 327: 143 - 145.

André P, Nannizzi-Alaimo L, Prasad SK, Phillips DR. Platelet-derived CD40L: the switch-hitting player of cardiovascular disease. *Circulation* 2002; 106: 896 – 899.

Andreotti F, Kluff C. Circadian variation of fibrinolytic activity in blood. *Chronobiol Int* 1991; 8: 336 - 351.

Armstrong EJ, Morrow DA, Sabatine MS. Inflammatory biomarkers in acute coronary syndromes. Part II: acute-phase reactants and biomarkers of endothelial cell activation. *Circulation* 2006; 113: 152 - 155.

Auerbach G, Nar H. The pathway from GTP to tetrahydrobiopterin: three-dimensional structures of GTP cyclohydrolase I and 6-pyruvoyl tetrahydropterin synthase. *Biol Chem* 1997; 378: 185 -192.

Aukrust P, Müller F, Ueland T, Berget T, Aaser E, Brunsvig A, et al. Enhanced levels of soluble and membrane-bound CD40 ligand in patients with unstable angina. Possible reflection of T lymphocyte and platelet involvement in the pathogenesis of acute coronary syndromes. *Circulation* 1999; 100: 614 – 620.

Auzéby A, Bogdan A, Krosi Z, Touitou Y. Time-dependence of urinary neopterin, a marker of cellular immune activity. *Clin Chem* 1988; 34: 1866 - 1867.

Babiy AV, Gebicki JM Sullivan DR. Vitamin E content and low density lipoprotein oxidizability induced by free radicals. *Atherosclerosis* 1990; 81: 175 - 182.

Baldus S, Heeschen C, Meinertz T, Zeiher AM, Eiserich JP, Munzel T, et al. CAPTURE Investigators. Myeloperoxidase serum levels predict risk in patients with acute coronary syndromes. *Circulation* 2003; 108: 1440 - 1445.

Barnes PJ, Karin M. Nuclear factor- κ B: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med* 1997; 336: 1066 - 1071.

Bavendiek U, Libby P, Kilbride M, Reynolds R, Mackman N, Schönbeck U. Induction of tissue factor expression in human endothelial cells by CD40 ligand is mediated via activator protein 1, nuclear factor kappa B, and Egr-1. *J Biol Chem* 2002; 277: 25032 - 25039.

Bayes-Genís A, Conover CA, Overgaard MT, Bailey KR, Christiansen M, Holmes DR, et al. Pregnancy-associated plasma protein-A as marker of acute coronary syndrome. *N Engl J Med* 2001; 345: 1022 - 1029.

Becker RC, Corrao JM. Circadian variations in cardiovascular disease. *Cleve Clin J Med* 1989; 56: 676 - 680.

Beyer CE, Steketee JD, Saphier D. Antioxidant properties of melatonin – an emerging mystery. *Biochem Pharmacol* 1998; 56: 1265 - 1272.

Biasucci LM, Liuzzo G, Grillo JR, Caliguri G, Rebuzzi AG, Buffon A, et al. Elevated levels of C-reactive protein at discharge in patients with unstable angina predict recurrent instability. *Circulation* 1999; 99: 855 - 860.

Blake GJ, Ridker PM. Novel clinical markers of vascular wall inflammation. *Circ Res* 2001; 89: 763 - 771.

Blake GJ, Ridker PM. C-reactive protein and prognosis after percutaneous coronary intervention. *Eur Heart J* 2002; 23: 923 - 925.

(bis) Blake GJ, Ridker PM. Tumour necrosis factor-alpha, inflammatory biomarkers, and atherogenesis. *Eur Heart J* 2002; 23: 345 – 347

Bremner WF, Sothorn RB, Kanabrocki EL, Ryan M, McCormick JB, Dawson S, et al. Relation between circadian patterns in levels of circulating lipoprotein (a), fibrinogen, platelets, and related lipid variables in men. *Am Heart J* 2000; 139: 164 - 173.

Brennan ML, Penn MS, Van Lente F, Nambi V, Shishehbor MH, Aviles RJ et al. Prognostic value of myeloperoxidase in patients with chest pain. *N Eng J Med* 2003; 349: 1595 - 1604.

Brugger P, Marktl W, Herold M. Impaired nocturnal secretion of melatonin in coronary heart disease. *Lancet* 1995; 345: 1408.

Brzezinski A. Melatonin in humans. *N Eng J Med* 1997; 336: 186 - 195.

Cardinali DP. Melatonin. A mammalian pineal hormone. *Endocr Rev* 1981; 2: 327 - 346.

Cardinali DP, Lynch HJ, Wurtman RJ. Binding of melatonin to human and rat plasma proteins. *Endocrinology* 1972; 91: 1213 - 1218.

Cardinali DP, Del Zar MM, Vacas MI. The effects of melatonin in human platelets. *Acta Physiol Pharmacol Ther Latinoam* 1993; 43: 1 - 13.

Carr AC, Zhu BZ, Frei B. Potential antiatherogenic mechanisms of ascorbate (vitamin C) and alpha-tocopherol (vitamin E). *Circ Res* 2000; 87: 349 - 354.

Carrillo-Vico A, Garcia-Maurino S, Calvo JR, Guerrero JM. Melatonin counteracts the inhibitory effect of PGE2 on IL-2 production in human lymphocytes via its mt1 membrane receptor. *FASEB J* 2003; 17: 755 - 757.

Carrillo-Vico A, Calvo JR, Abreu P, Lardone P, García-Mauriño S, Reiter RJ, Guerrero JM. Evidence of melatonin synthesis by human lymphocytes and its physiological significance: possible role as intracrine, autocrine, and/or paracrine substance. *FASEB J* 2004; 18: 537 - 539.

Carrillo-Vico A, Guerrero JM, Lardone PJ, Reiter RJ. A review of the multiple actions of melatonin on the immune system. *Endocrine* 2005; 27: 189 - 200.

Cassone VM, Natesan AK. Time and time again: the phylogeny of melatonin as a transducer of biological time. *J Biol Rhythms* 1997; 12: 489 - 497

Chakrabarti S, Varghese S, Vitseva O, Tanriverdi K, Freedman JE. CD40 ligand influences platelet release of reactive oxygen intermediates. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 2428 - 2434.

Cheung PY, Sawicki G, Wozniak M, Wang W, Radomski MW, Schulz R. Matrix metalloproteinase-2 contributes to ischemia-reperfusion injury in the heart. *Circulation* 2000; 101: 1833 - 1839.

Chobanian AV, Dzau VJ. Renin angiotensin system and atherosclerotic vascular disease. In: Fuster V, Ross R, Topol EJ, eds. *Atherosclerosis and coronary artery disease*. Vol 1. Philadelphia: Lippincott - Raven, 1996: 237 - 242.

Conti E, Andreotti F, Zuppi C. Pregnancy-associated plasma protein a as predictor of outcome in patients with suspected acute coronary syndromes. *Circulation*. 2004; 109: 211 - 212.

Cooke JP, Tsao PS. Is NO an endogenous antiatherogenic molecule? *Arterioscler Thromb* 1994; 14: 653 – 655.

Coope HJ, Atkinson PG, Huhse B, Belich M, Janzen J, Holman MJ, et al. CD40 regulates the processing of NF-kappaB2 p100 to p52. *EMBO J* 2002; 21: 5375 - 5385.

Cosin-Sales J, Christiansen M, Kaminski P, Oxvig C, Overgaard MT, Cole D, et al. Pregnancy-associated plasma protein A and its endogenous inhibitor, the proform of eosinophil major basic protein (proMBP), are related to complex stenosis morphology in patients with stable angina pectoris. *Circulation* 2004; 109: 1724 - 1728.

Cosin-Sales J, Kaski JC, Christiansen M, Kaminski P, Oxvig C, Overgaard MT, et al. Relationship among pregnancy associated plasma protein-A levels, clinical characteristics, and coronary artery disease extent in patients with chronic stable angina pectoris. *Eur Heart J* 2005; 26: 2093 - 2098.

Cuzzocrea S, Zingarelli B, Gilad E, Hake P, Salzman AL, Szabo C. Protective effect of melatonin in carrageenan-induced models of local inflammation: relationship to its inhibitory effect on nitric oxide production and its peroxynitrite scavenging activity. *J Pineal Res* 1997; 23: 106- 116.

Cuzzocrea S, Mazzon E, Serriano I, Lepore V, Terranova ML, Ciccolo A, Caputi AP. Melatonin reduces dinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis. *J Pineal Res* 2001; 30: 1-12.

Cuzzocrea S, Reiter RJ. Pharmacological actions of melatonin in shock, inflammation and ischemia/reperfusion injury. *Eur J Pharmacol* 2001; 426: 1-10.

Davies MJ, Gordon JL, Gearing AJ, Pigott R, Wolf N, Katz D, Kyriakopoulos A. The expression of the adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, PECAM, and E-selectin in human atherosclerosis. *J Pathol* 1993; 171: 223 - 229.

DiCorleto PE. Cellular mechanisms of atherogenesis. *Am J Hypertens* 1993; 6: 314S - 318S.

Dinçol D, Akbulut H, Büyükçelik A, İçli F. Diurnal variations of serum GM-CSF levels. *Cytokine* 2000; 12: 1151 - 1155.

Domínguez Rodríguez A, Abreu González P, García González MJ, Sanchez J, Marrero F, De Armas-Trujillo D. Decreased nocturnal melatonin levels during acute myocardial infarction. *Journal of Pineal Research* 2002; 33: 248 - 252.

Domínguez Rodríguez A, Abreu González P, García González MJ, De la Rosa A, Vargas M, Marrero F. Ritmo luz / oscuridad de las citocinas proinflamatorias en el infarto agudo de miocardio. *Rev Esp Cardiol* 2003; 56: 555 - 560.

Domínguez Rodríguez A, Abreu González P, García González MJ, Ferrer J, De la Rosa A, Vargas M, Reiter RJ. Light / dark patterns of interleukin – 6 in relation to the pineal hormone melatonin in patients with acute myocardial infarction. *Cytokine* 2004; 26: 89 - 93.

Domínguez Rodríguez A, Abreu González P, de la Rosa A, Vargas M, Ferrer J, García González MJ. Role of endogenous interleukin-10 production and lipid peroxidation in patients with acute myocardial infarction treated with primary percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Int J Cardiol* 2005; 99: 77 - 81.

(bis) Domínguez Rodríguez A, Abreu González P, García González M, Ferrer Hita J, Vargas M, Reiter RJ. Elevated levels of oxidized low-density lipoprotein and impaired nocturnal synthesis of melatonin in patients with myocardial infarction. *Atherosclerosis* 2005; 180: 101 - 105.

(bis 2) Domínguez Rodríguez A, Abreu González P, García González MJ, Ferrer Hita J. Asociación entre concentraciones séricas de interleucina 10 y desarrollo de insuficiencia cardíaca en pacientes con infarto agudo de miocardio tratados con angioplastia primaria. *Rev Esp Cardiol* 2005; 58: 626 - 630.

(bis 3) Domínguez Rodríguez A, Abreu González P, García González MJ, Ferrer J, Vargas M. Circulating pregnancy-associated plasma protein A is not an early marker of acute myocardial infarction. *Clin Biochem* 2005; 38: 180 - 182.

Domínguez Rodríguez A, García González MJ, Abreu González P, Ferrer J, Kaski JC. Relation of nocturnal melatonin levels to C-reactive protein concentration in patients with ST-segment elevation myocardial infarction. *Am J Cardiol* 2006; 97: 10 - 12.

Ekmekcioglu C, Haslmayer P, Philipp C, Mehrabi MR, Glogar, HD, Grimm M, et al. Expression of the mt1 melatonin receptor subtype in human coronary arteries. *J Receptor Signal Transduction Res* 2001; 21: 85 - 91.

Ekmekcioglu C, Haslmayer P, Philipp C, Mehrabi MR, Glogar HD, Grimm M, et al. The melatonin receptor subtype mt2 is presented in the human cardiovascular system. *J Pineal Res* 2003; 35: 40 - 44.

Esterbauer H, Striegl G, Puhl H, Oberreither S, Rotheneder M, el-Saadani M, Jurgens G. The role of vitamin E and carotenoids in preventing oxidation of low density lipoproteins. *Ann N Y Acad Sci* 1989; 570: 254 - 267.

Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, Jurgens G. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic Biol Med* 1992; 13: 341 - 390.

Furman MI, Barnard MR, Krueger LA, Fox ML, Shilale EA, Lessard DM, et al. Circulating monocyte-platelet aggregates are an early marker of acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2001; 38: 1002 – 1006.

Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (1). *N Engl J Med* 1992; 326: 242 - 250.

Gaenzer H, Sturm W, Kirchmair R, Neumayr G, Ritsch A, Patsch J. Circadian variation of endothelium-dependent vasodilatation of the brachial artery as a confounding factor in the evaluation of endothelial function. *Atherosclerosis* 2000; 149: 227 – 228.

García González MJ, Domínguez Rodríguez A, Abreu González P. Diurnal variations in serum neopterin levels are associated with the pineal hormone melatonin circadian rhythm in healthy human subjects. *J Pineal Res* 2006; 40: 288 - 289.

García-Moll X, Coccolo F, Cole D, Kaski JC. Serum neopterin and complex stenosis morphology in patients with instable angina. *J Am Coll Cardiol* 2000; 35: 956 - 962.

Garlichs CD, Eskafi S, Raaz D, Schmidt A, Ludwig J, Herrmann M, et al. Patients with acute coronary syndromes express enhanced CD40 ligand/CD154 on platelets. *Heart* 2001; 86: 649 – 655.

Garlichs CD, John S, Schmeisser A, Eskafi S, Strumpf C, Karl M, et al. Upregulation of CD40 and CD40 ligand (CD154) in patients with moderate hypercholesterolemia. *Circulation* 2001; 104: 2395 – 2400.

Gawaz M, Langer H, May AE. Platelets in inflammation and atherogenesis. *J Clin Invest* 2005; 115: 3378 – 3384.

Gilad E, Wong HR, Zingarelli B, Virag L, O'Connor M, Salzman AL, Szabo C. Melatonin inhibits expresión of the inducible isoform of nitric oxide synthase in murine macrophages: role of inhibition of NF kappa β activation. *FASEB J* 1998; 12: 685 - 693.

Girerd XJ, Hirsch AT, Cooke JP, Dzau VJ, Creager MA. L-arginine augments endothelium-dependent vasodilation in cholesterol-fed rabbits. *Circ Res* 1990; 67: 1301 – 1308.

Giri JG, Lomedico PT, Mizel SB. Studies on the synthesis and secretion of interleukin – 1. I. A 33,000 molecular weight precursor for interleukin – 1. *J Immunol* 1985; 134: 343 – 349.

- Granger DN. I/R injury: role of leukocyte-endothelial adhesion. *News Physiol Sci* 1997; 12: 142 - 143.
- Griendling KK & FitzGerald GA. Oxidative stress and cardiovascular injury. Part II: animal and human studies. *Circulation* 2003; 108: 2034 - 2040.
- Guerrero JM, Reiter RJ. Melatonin – immune system relationship. *Curr Top Med Chem* 2002; 2: 167 - 179.
- Gudewill S, Pollmächer T, Vedder H, Schreiber W, Fassbender K, Holsboer F. Nocturnal plasma levels of cytokines in healthy men. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 1992; 242: 53 - 56.
- Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis and coronary artery disease. *N Eng J Med* 2005; 352: 1685 - 1695
- Harvey EJ, Ramji DP. Interferon-gamma and atherosclerosis: pro- or anti-atherogenic? *Cardiovasc Res* 2005; 67: 11 - 20.
- Haus E, Cusulos M, Sackett-Lundeen L, Swoyer J. Circadian variations in blood coagulation parameters, alpha-antitrypsin antigen and platelet aggregation and retention in clinically healthy subjects. *Chronobiol Inter* 1990; 7: 203 - 216.
- Haus E, Lakatia DJ, Sackett-Lundeen LL, Swoyer J. Chronobiology in laboratory medicine. In Rietveld WJ, ed. *Clinical aspects of chronobiology*. Leiden, The Netherlands: Hoechst Medication Service, 1984; 13 - 83.
- Haus E, Smolensky MH. Biologic rhythms in the immune system. *Chronobiol Int* 1999; 16: 581 - 622.
- Heeschen C, Dimmeler S, Hamm CW, van den Brand MJ, Boersma E, Zeiher AM, et al. CAPTURE Study Investigators. Soluble CD40 ligand in acute coronary syndromes, *N Engl J Med* 2003; 348: 1104 – 1111.
- Heeschen C, Dimmeler S, Hamm CW, Fichtlscherer S, Simoons ML, Zeiher AM; CAPTURE Study Investigators. Pregnancy-associated plasma protein-A levels in patients with acute coronary syndromes: comparison with markers of systemic inflammation, platelet activation, and myocardial necrosis. *J Am Coll Cardiol* 2005; 45: 229 - 237.
- Henn V, Slupsky JR, Grafe M, Anagnostopoulos I, Forster R, Muller-Berghaus G, Kroczeck RA. CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature* 1998; 391: 591 – 594.

Hernandes Fernandes E, Coelho D, Missel Correa JR, Kumpinski D. Alteraciones circadianas del sistema cardiovascular. *Rev Esp Cardiol* 2000; 53: 117 - 122.

Hoffmann G, Schobersberger W, Frede S, Pelzer L, Fandrey J, Wachter H, et al. Neopterin activates transcription factor nuclear factor-kappa β in vascular smooth muscle cells. *FESB Lett* 1996; 391: 181 - 184.

Holvoet P, Collen D. Oxidized lipoproteins in atherosclerosis and thrombosis. *FASEB J* 1994; 8: 1279 - 1284.

Holvoet P, Vanhaecke J, Janssens S, Van der Werf F, Collen D. Oxidized LDL and malondialdehyde-modified LDL in patients with acute coronary syndromes and stable coronary artery disease. *Circulation* 1998; 98: 1487 - 1494.

Huber C, Batchelor JR, Fuchs D, Hausen A, Lang A, Niederwieser D, et al. Immune response-associated production of neopterin. Release from macrophages primarily under control of interferon-gamma. *J Exp Med* 1984; 160: 310 - 316.

Hummel SG, Fischer AJ, Martin SM, Schafer FQ, Buettner GR. Nitric oxide as a cellular antioxidant: A little goes a long way. *Free Radic Biol Med* 2006; 40: 501 - 506

Hwang SJ, Ballantyne CM, Sharrett AR, Smith LC, Davis CE, Gotto AM, Boerwinkle E. Circulating adhesion molecules VCAM-1, ICAM-1 and E-selectin in carotid atherosclerosis and incident coronary heart disease cases: the Atherosclerosis Risk In Communities (ARIC) study. *Circulation* 1997; 96: 4219 - 4225.

Ikeda U, Ito T, Shimada K. Interleukin-6 and acute coronary syndrome. *Clin Cardiol* 2001; 24: 701 - 704.

Inokubo Y, Hanada H, Ishizaka H, Fukushi T, Kamada T, Okumura K. Plasma levels of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 are increased in the coronary circulation in patients with acute coronary syndrome. *Am Heart J* 2001; 141: 211-217.

Instituto Nacional de Estadística. Defunciones según la causa de Muerte 1999. Madrid: Instituto Nacional de Estadística, 2002.

Jafri SM, VanRollins M, Ozawa T, Mammen EF, Goldberg AD, Golstein S. Circadian variation in platelet function in healthy volunteers. *Am J Cardiol* 1992; 69: 951 - 954.

Jang YJ, Hong HN, Lee JD, Hwang O. Down-regulation of GPT cyclohydrolase I and tetrahydrobiopterin by melatonin. *Neuroreport* 2000; 11: 3627 - 3630.

Jankovic BD. Neuroimmunomodulation. From phenomenology to molecular evidence. *Ann N Y Acad Sci* 1994; 741: 1 - 38.

Jonasson L, Holm J, Skalli O, Bondjers G, Hansson GK. Regional accumulation of T cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque. *Atherosclerosis* 1986; 6: 131 - 138.

Joshi MS, Ponthier JL, Lancaster JR Jr. Cellular antioxidant and pro-oxidant actions of nitric oxide. *Free Radic Biol Med* 1999; 27: 1357 – 1366.

Jovicic A, Mandic S. Circadian variations of platelet aggregability and fibrinolytic activity in healthy subjects. *Thromb Res* 1991; 62: 65 - 74.

Kai H, Ikeda H, Yasukawa H, Kai M, Seki Y, Kuwahara F, et al. Peripheral blood levels of matrix metalloproteinases-2 and -9 are elevated in patients with acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol* 1998; 32: 368 - 372.

Kanabrocki EL, Sothorn RB, Messmore HL, Roitman-Johnson B, McCormick JB, Dawson S et al. Circadian interrelationships among levels of plasma fibrinogen, blood platelets, and serum interleukin – 6. *Clin Appl Thromb Hemost* 1999; 5: 37 - 42.

Kanabrocki EL, George M, Hermida RC, Messmore HL, Ryan MD, Ayala DE, et al. Day-night variations in blood levels of nitric oxide, T-TFPI, and E-Selectin. *Clin Appl Thromb Hemost* 2001; 7: 339 - 345.

Kanikowska D, Hirata Y, Hyun K, Tokura H. Acute phase proteins, body temperature and urinary melatonin under the influence of bright and dim light intensities during the daytime. *J Physiol Anthropol Appl Human Sci* 2001; 20: 333 - 338.

Kaski JC. Pathophysiology and management of patients with chest pain and normal coronary arteriograms (cardiac syndrome X). *Circulation* 2004; 109: 568 - 572.

Kaski JC, Avanzas P, Arroyo-Espliguero R. Neopterin - a forgotten biomarker. *J Am Coll Cardiol* 2003; 42: 1142 - 1143.

Kornblihtt LI, Finocchiaro L, Molinas FC. Inhibitory effect of melatonin on platelet activation induced by collagen and arachidonic acid. *J Pineal Res* 1993; 14: 184 - 191.

Kvetnoy I. Extrapineal melatonin in pathology: new perspectives for diagnosis, prognosis and treatment of illness. *Neuro Endocrinol Lett*. 2002; 23: 92 – 96.

Landmesser U, Harrison DG. Oxidant stress as a marker for cardiovascular events: Ox marks the spot. *Circulation* 2001; 104: 2638 - 2640.

Laterza OF, Cameron SJ, Chappell D, Sokoll LJ, Green GB. Evaluation of pregnancy-associated plasma protein A as a prognostic indicator in acute coronary syndrome patients. *Clin Chim Acta.* 2004; 348: 163 - 169.

Le JM, Vilcek J. Interleukin-6: a multifunctional cytokine regulating immune reactions and the acute phase protein response. *Lab Invest* 1989; 61: 588 - 602.

Lee Y, Lee WH, Lee SC, Ahn KJ, Choi YH, Park SW, et al. CD40L activation in circulating platelets in patients with acute coronary syndrome. *Cardiology* 1999; 92: 11 – 16.

de Lemos JA, Hennekens CH, Ridker PM. Plasma concentration of soluble vascular cell adhesion molecule-1 and subsequent cardiovascular risk. *J Am Coll Cardiol* 2000; 36: 423 – 426.

Leonard EJ, Yoshimura T. Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP- 1). *Immunol Today* 1990; 11: 97 - 101.

Lerner AB, Case JD, Takahashi Y, Lee TH, Mori W. Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. *J Am Chem Soc* 1958; 80: 2587.

Levi FA, Canon C, Touitou Y, Sulon J, Mechkouri M, Ponsart ED, et al. Circadian rhythms in circulating T lymphocyte subtypes and plasma testosterone, total and free cortisol in five healthy men. *Clin Exp Immunol* 1988; 71: 329 - 335.

Lezoualc'h F, Sparapani M, Behl C. N-acetyl-serotonin (normelatonin) and melatonin protect neurons against oxidative challenges and suppress the activity of the transcription factor NF-kappaB. *J Pineal Res* 1998; 24: 168 - 178.

Li JJ. Circadian variation in myocardial ischemia: the possible mechanisms involving in this phenomenon. *Med Hypotheses* 2003; 61: 240 - 243.

Libby P, Ross R. Cytokines and growth regulatory molecules. In: Fuster V, Ross R, Topol EJ, eds. *Atherosclerosis and coronary artery disease.* Vol 1. Philadelphia: Lippincott – Raven, 1996: 585 - 594.

Libby P, Egan D, Skarlatos S. Roles of infectious agents in atherosclerosis and reestenosis: an assessment of the evidence and need for future research. *Circulation* 1997; 96: 4095 - 4103.

Libby P. Current concepts of the pathogenesis of the acute coronary syndromes. *Circulation* 2001; 104: 365 - 372.

Libby P, Simon DI. Inflammation and thrombosis: the clot thickens. *Circulation* 2001; 103: 1718 - 1720.

Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 2002; 105: 1135 - 1143.

Lin MC, Almus-Jacobs F, Chen HH, Parry GC, Mackman N, Shyy JY, et al. Shear stress induction of the tissue factor gene. *J Clin Invest* 1997; 99: 737 - 744.

Lindsey M, Wedin K, Brown MD, Keller C, Evans AJ, Smolen J, et al. Matrix-dependent mechanism of neutrophil-mediated release and activation of matrix metalloproteinase 9 in myocardial ischemia/reperfusion. *Circulation* 2001; 103: 2181 – 2187.

Lissoni P, Rovelli F, Meregalli S, Fumagalli L, Musco F, Brivio F, et al. Melatonin as a new possible anti-inflammatory agent. *J Biol Regul Homeost Agents* 1997; 11: 157 - 159.

Lissoni P, Rovelli F, Brivio F, Brivio O, Fumagalli L. Circadian secretions of IL-2, IL-12, IL-6 and IL-10 in relation to the light/dark rhythm of the pineal hormone melatonin in healthy humans. *Nat Immun* 1998; 16: 1 - 5.

Lu L, Chen SS, Zhang JQ, Ramires FJ, Sun Y. Activation of nuclear factor-kappa β and its proinflammatory mediator cascade in the infarcted rat heart. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 321: 879 - 885.

Lu L, Gunja-Smith Z, Woessner JF, Ursell PC, Nissen T, Galardy RE, et al. Matrix metalloproteinases and collagen ultrastructure in moderate myocardial ischemia and reperfusion in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 279: H601 - H609.

Lund J, Qin QP, Ilva T, Pettersson K, Voipio-Pulkki LM, Porela P, Pulkki K. Circulating pregnancy-associated plasma protein A predicts outcome in patients with acute coronary syndrome but no troponin I elevation. *Circulation*. 2003; 108: 1924 - 1926.

Macchi MM, Bruce JN. Human pineal physiology and functional significance of melatonin. *Front Neuroendocrinol*. 2004; 25: 177 - 195.

Maestroni GJ. The immunoneuroendocrine role of melatonin. *J Pineal Res* 1993; 14: 1 - 10.

March F, Schönbeck U, Sukhova GK, Bourcier T, Bonnefoy JY, Pober JS, Libby P. Functional CD40 ligand is expressed on human vascular endothelial cells, smooth muscle cells, and macrophages: implications for CD40-CD40 ligand signaling in atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 1931 - 1936.

Markey SP, Higa S, Shih M, Danforth DN, Tamarkin L. The correlation between human plasma melatonin levels and urinary 6-hydroxymelatonin excretion. *Clin Chim Acta* 1985; 150: 221 - 225.

Marrugat J, Elosúa R, Martí H. Epidemiología de la cardiopatía isquémica en España: estimación del número de casos y de las tendencias entre 1997 y 2005. *Rev Esp Cardiol* 2002; 55: 337 - 346.

Maple C, Kirk G, McLaren M, Veale D, Belch JJ. A circadian variation exists for soluble levels of intercellular adhesion molecule-1 and E-selectin in healthy volunteers. *Clin Sci* 1998; 94: 537 - 540.

Master AM. The role of effort and occupation (including physicians) in coronary occlusion. *JAMA* 1960; 174: 942-948.

Marler JR, Price TR, Clark GL, Muller JE, Robertson T, Mohr JP, et al. Morning increase in onset of ischemic stroke. *Stroke* 1989; 20: 473 - 476.

Matsushima K, Oppenheim JJ. Interleukin 8 and MCAF: novel inflammatory cytokines inducible by IL-1 and TNF. *Cytokine* 1989; 1: 2 - 13.

Meier-Ewert HK, Ridker PM, Rafai N, Price N, Dinges DF, Mullington JM. Absence of diurnal variation of C-reactive protein concentrations in healthy human subjects. *Clin Chem* 2001; 47: 426 - 430.

Mills R, Bhatt DL. The Ying and Yang of arterial inflammation. *J Am Coll Cardiol* 2004; 44: 50 - 52.

Min JK, Kim YM, Kim SW, Kwon MC, Kong YY, Hwang IK, et al. TNF-related activation-induced cytokine enhances leukocyte adhesiveness: induction of ICAM-1 and VCAM-1 via TNF receptor-associated factor and protein kinase C-dependent NF-kappa β activation in endothelial cells. *J Immunol* 2005; 175: 531 - 540.

Mohan N, Sadeghi K, Reiter RJ, Meltz ML. The neurohormone melatonin inhibits cytokine, mitogen and ionizing radiation induced NF-kappa β . *Biochem Mol Biol Int* 1995; 37: 1063 - 1070.

Moore KW, O'Garra A, de Waal Malefyt R, Vieira P, Mosmann TR. Interleukin - 10. *Annu Rev Immunol* 1993; 11: 165 - 190.

Moreau M, Brocheriou I, Petit L, Ninio E, Chapman MJ, Rouis M. Interleukin-8 mediates downregulation of tissue factor inhibitor of metalloproteinase-1 expression in cholesterol-loaded human macrophages: relevance of stability of atherosclerotic plaque. *Circulation* 1999; 99: 420 - 426.

Morera AL, Abreu P. Existence of melatonin in human platelets. *J Pineal Res* 2005; 39: 432 - 433.

Mori N, Sato H, Hayashibara T, Senba M, Geleziunas R, Wada A, et al. Helicobacter pylori induces matrix metalloproteinase-9 through activation of nuclear factor kappaB. *Gastroenterology* 2003; 124: 983 - 992.

Morrey KM, McLachlan JA, Serkin CD, Bakouche O. Activation of human monocytes by the pineal hormone melatonin. *J Immunol* 1994; 153: 2671 - 2680.

Muller JE, Stone PH, Turi ZG, Rutherford JD, Czeisler CA, Parker C, et al. The MILIS Study Group. Circadian variations in the frequency of onset of acute myocardial infarction. *N Eng J Med* 1985; 313: 1315 - 1322.

Murr C, Widner B, Wirleitner B, Fuchs D. Neopterin as a marker for immune system activation. *Curr Drug Metab* 2002; 3: 175 - 187.

Nagel T, Resnick N, Atkinson WJ, Dewey CF Jr, Gimbrone MA Jr. Shear stress selectively upregulates intercellular adhesion molecule-1 expression in cultured human vascular endothelial cells. *J Clin Invest* 1994; 94: 885 - 891.

Naghavi M, Libby P, Falk E, Casscells SW, Litovsky S, Rumberg J, et al. From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: part I. *Circulation* 2003; 108: 1664 - 1672.

Naghavi M, Libby P, Falk E, Casscells SW, Litovsky S, Rumberg J, et al. From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: part II. *Circulation* 2003; 108: 1772 - 1778.

National Cholesterol Education Program. Second report of the Expert Panel on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel II). Bethesda, Md. National Heart, Lung, and Blood Institute, 1993 (NIH publication no.93-3095).

Nehler MR, Taylor LM Jr, Porter JM. Homocysteinemia as a risk factor for atherosclerosis: a review. *Cardiovasc Surg* 1997; 5: 559 - 567.

Nicholls SJ, Hazen SL. Myeloperoxidase and Cardiovascular Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 1102 - 1111.

Obraztsov VP, Strazhesko ND. The symptomatology and diagnosis of coronary thrombosis. En: Vorobeva VA, Konchalovski MP (Eds): *Works of the first Congress of Russian Therapists 1910*: 26 - 43.

Otto ME, Svatikova A, Barretto RB, Santos S, Hoffmann M, Khandheria B, Somers V. Early morning attenuation of endothelial function in healthy humans. *Circulation* 2004; 109: 2507 – 2510.

Osmancik P, Kvasnicka J, Widimsky P, Tarnok A. Diurnal variation of soluble E- and P- selectin, and intercellular adhesion molecule-1 in patients with and without coronary artery disease. *Cardiology* 2004; 102: 194 - 199.

Overgaard MT, Oxvig C, Christiansen M, Lawrence JB, Conover CA, Gleich GJ, et al. Messenger ribonucleic acid levels of pregnancy-associated plasma protein-A and the proform of eosinophil major basic protein: expression in human reproductive and nonreproductive tissues. *Biol Reprod* 1999; 61: 1083 - 1089.

Pangerl B, Pangerl A, Reiter RJ. Circadian variations of adrenergic receptors in the mammalian pineal gland: a review. *J Neural Transm Gen Sect* 1990; 81: 17 - 29.

Pasceri V, Willerson JT, Yeh ET. Direct proinflammatory effect of C-reactive protein on human endothelial cells. *Circulation* 2000; 102: 2165 - 2168.

Pérez Fernández R, Kaski JC. Interleukin-10 and coronary disease. *Rev Esp Cardiol* 2002; 55: 738 – 750.

Petrovsky N, McNair P, Harrison LC. Diurnal rhythms of pro-inflammatory cytokines: regulation by plasma cortisol and therapeutic implications. *Cytokine* 1998; 10: 307 - 312.

Petrovsky N, Harrison LC. The chronobiology of human cytokine production. *Int Rev Immunol* 1998; 16: 635 - 649.

Pepys MB, Hirschfield GM. C-reactive protein: a critical update. *J Clin Invest* 2003; 111: 1805 - 1812.

Phipps C. Contributory causes of coronary thrombosis. *JAMA* 1936; 106: 761-762.

Pieri C, Marra M, Moroni F, Recchioni R, Marcheselli F. Melatonin: a peroxy radical scavenger more effective than vitamin E. *Life Sci* 1994; 55: 271 – 276.

Pieri C, Moroni F, Marra M, Marcheselli F, Recchioni R. Melatonin is an efficient antioxidant. *Arch Gerontol Geriatr* 1995; 20: 159 - 165.

Pignatelli P, Sanguigni V, Lenti L, Ferro G, Finocchi A, Rossi A, Violi F. Gp91phox-dependent expression of platelet CD40 ligand. *Circulation* 2004; 110: 1326 - 1329.

Pignatelli P, Sanguigni V, Paola GS, Lo Coco M, Lenti L, Violi F. Vitamin C inhibits platelet expression of CD40 ligand. *Free Rad Biol Med* 2005; 38: 1662 - 1666.

Podrez EA, Abu-Soud HM, Hazen SL. Myeloperoxidase-generated oxidants and atherosclerosis. *Free Radic Biol Med* 2000; 28: 1717 – 1725.

Qin QP, Kokkala S, Lund J, Tamm N, Voipio-Pulkki LM, Pettersson K. Molecular distinction of circulating pregnancy-associated plasma protein A in myocardial infarction and pregnancy. *Clin Chem* 2005; 51: 75 - 83.

Qin QP, Kokkala S, Lund J, Tamm N, Qin X, Lepantalo M, Pettersson K. Immunoassays developed for pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) in pregnancy may not recognize PAPP-A in acute coronary syndromes. *Clin Chem* 2006; 52: 398 - 404.

Rachek LI, Grishko VI, Ledoux SP, Wilson GL. Role of nitric oxide-induced mtDNA damage in mitochondrial dysfunction and apoptosis. *Free Radic Biol Med* 2006; 40: 754 – 762

Raines EW, Rosenfeld ME, Ross R. The role of macrophages. In: Fuster V, Ross R, Topol EJ, eds. *Atherosclerosis and coronary artery disease*. Vol 1. Philadelphia: Lippincott – Raven, 1996: 539 - 555.

Rajagopalan S, Meng XP, Ramasamy S, Harrison DG, Galis ZS. Reactive oxygen species produced by macrophage-derived foam cells regulate the activity of vascular matrix metalloproteinases in vitro. Implications for atherosclerotic plaque stability. *J Clin Invest* 1996; 98: 2572 – 2579.

Razumovitch JA, Fuchs D, Semenkova GN, Cherenkevich SN. Influence of neopterin on the generation of reactive species by myeloperoxidase in human neutrophils. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1672: 46 - 50.

Reiter RJ. The pineal and its hormones in the control of reproduction in mammals. *Endocr Rev* 1980; 1: 109 - 131.

Reiter RJ. Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocr Rev* 1991; 12: 151 - 180.

Reiter RJ. The melatonin rhythm: both a clock and a calendar. *Experientia* 1993; 49: 654 – 664.

Reiter RJ, Tan DX, Poeggeler B, Menendez-Pelaez A, Chen LD, Saarela S. Melatonin as a free radical scavenger: implications for aging and age-related diseases. *Ann N Y Acad Sci* 1994; 719: 1 - 12.

Reiter RJ, Calvo JR, Karbownik M, Qi W, Tan DX. Melatonin and its relation to the immune system and inflammation. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 917: 376 – 386.

Reiter RJ, Tan DX, Manchester LC, Qi W. Biochemical reactivity of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species: a review of the evidence. *Cell Biochem Biophys* 2001; 34: 237 - 256.

Reiter RJ, Tan DX. Melatonin: a novel protective agent against oxidative injury of the ischemic / reperfused heart. *Cardiovasc Res* 2003; 58: 10 - 19.

Resnick N, Collins T, Atkinson W, Bonthron DT, Dewey CF Jr, Gimbrone MA Jr. Platelet- derived growth factor B chain promoter contains a cis-acting fluid shear-stress-responsive element. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 4591 - 4595.

Ridker PM, Rifai N, Stampfer MJ, Hennekens CH. Plasma concentrations of interleukin-6 and the risk of future myocardial infarction among apparently healthy men. *Circulation* 2000; 101: 1767 - 1772.

Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE, Rifai N. C-reactive protein and others markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *N Eng J Med* 2000; 342: 836 - 843.

Ridker PM, Buring JE, Cook NR, Rifai N. C-reactive protein, the metabolic syndrome, and risk of incident cardiovascular events: an 8-year follow-up of 14,719 initially healthy American women. *Circulation* 2003; 107: 391 - 397.

Rocco MB, Barry J, Campbell S, Nabel E, Cook EF, Goldman L, Selwyn A. Circadian variations of transient myocardial ischemia in patients with coronary artery disease. *Circulation* 1987; 75: 395 – 400.

Rodrigues MR, Rodriguez D, Henrique Catalani L, Russo M, Campa A. Interferon-gamma independent oxidation of melatonin by macrophages. *J Pineal Res* 2003; 34: 69 – 74.

Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993; 362: 801 - 809.

Ross R. Atherosclerosis – an inflammatory disease, *N Eng J Med* 1999; 340: 115 - 126.

Rubio A, Guerrero JM, Reiter RJ, Osuna C. Involvement of alpha- and beta-adrenergic receptors in the regulation of rat pineal N-acetyltransferase activity during development. *Endocrinology* 1993; 132: 393 - 398.

Saini HK, Xu YJ, Arneja AS, Tappia PS, Dhalla NS. Pharmacological basis of different targets for the treatment of atherosclerosis. *J Cell Mol Med* 2005; 9: 818 – 839

Sakotnik A, Liebmann P, Stoschitzki K, Lercher P, Schauenstein K, Klein W, Eber B. Decreased melatonin synthesis in patients with coronary artery disease. *Eur Heart J* 1999; 20: 1314 – 1317.

Schieffer B, Schieffer E, Hilfiker-Kleiner D, Hilfiker A, Kovanen PT, Kaartinen M et al. Expression of angiotensin II and interleukin-6 in human coronary atherosclerotic plaques: potential implications for inflammation and plaque instability. *Circulation* 2000; 101: 1372 - 1378.

Schonbeck U, Mach F, Sukhova GK, Herman M, Graber P, Kehry MR, Libby P. CD40 ligation induces tissue factor expression in human vascular smooth muscle cells. *Am J Pathol* 2000; 156: 7 - 14.

Schönbeck U, Libby P. CD40 signaling and plaque instability. *Circ Res* 2001; 89: 1092 -1103.

Schönbeck U, Varo N, Libby P, Buring J, Ridker PM. Soluble CD40L and cardiovascular risk in women. *Circulation* 2001; 104: 2266 – 2268.

Schönbeck U, Gerdes N, Varo N, Reynolds RS, Horton DB, Bavendiek U, et al. Oxidized low-density lipoprotein augments and 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors limit CD40 and CD40L expression in human vascular cells. *Circulation* 2002; 106: 2888 - 2893.

Schottelius AJ, Mayo MW, Sartor RB, Baldwin AS Jr. Interleukin-10 signaling blocks inhibitor of kappaß kinase activity and nuclear factor kappaß DNA binding. *J Biol Chem* 1999; 274: 31868 - 31874.

Schumacher M, Halwachs G, Tatzber F, Fruhwald FM, Zweiker R, Watzinger N, et al. Increased neopterin in patients with chronic and acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol.* 1997; 30: 703 - 707.

Shaw JA, Chin-Dusting JP, Kingwell BA, Dart AM. Diurnal variation in endothelium-dependent vasodilatation is not apparent in coronary artery disease. *Circulation* 2001; 103: 806 - 812.

Shibata M, Endo S, Inada K, Kuriki S, Harada M, Takino T, et al. Elevated plasma levels of interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-10 in patients with acute myocardial infarction. *J Interferon Cytokine Res* 1997; 17: 145 - 150.

Silva SO, Rodrigues MR, Carvalho SR, Catalani LH, Campa A, Ximenes VF. Oxidation of melatonin and its catabolites, N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine and N1-acetyl-5-methoxykynuramine, by activated leukocytes. *J Pineal Res* 2004; 37: 171 – 175.

Silva OS, Rodrigues MR, Ximenes VF, Bueno-da-Silva AE, Amarante-Mendes GP, Campa A. Neutrophils as a specific target for melatonin and kynuramines: effects on cytokine release. *J Neuroimmunol* 2004; 156: 146 - 152.

Sothorn RB, Roitman-Johnson B, Kanabrocki EL, Yager JG, Roodell MM, Weatherbee JA, et al. Circadian characteristics of circulating interleukin-6 in men. *J Allergy Clin Immunol* 1995; 95: 1029 - 1035.

Stary HC. The histological classification of atherosclerosis lesions in human coronary arteries. In: Fuster V, Ross R, Topol EJ, eds. *Atherosclerosis and coronary artery disease*. Vol 1. Philadelphia: Lippincott - Raven, 1996: 463 - 474.

Stasica P, Ulanski P, Rosiak JM. Melatonin as hydroxyl radical scavenger. *J Pineal Res* 1998; 25: 65 - 66.

Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL. Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Eng J Med* 1989; 320: 915 - 924.

Steinberg D. Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *J Biol Chem* 1997; 272: 20963 - 20966.

Sugiyama S, Okada Y, Sukhova GK, Virmani R, Heinecke JW, Libby P. Macrophage myeloperoxidase regulation by granulocyte macrophage colony-stimulating factor in human atherosclerosis and implications in acute coronary syndromes. *Am J Pathol* 2001; 158: 879 - 891.

Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, Plummer BF, Hardies LJ, et al Weintraub ST, et al. A novel melatonin metabolite, cyclic 3-hydroxymelatonin: a biomarker of in vivo hydroxyl radical generation. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 253: 614 - 620.

Tan DX, Manchester LC, Burkhardt S, Sainz RM, Mayo JC, Kohen R, et al. N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine, a biogenic amine and melatonin metabolite, functions as a potent antioxidant. *FASEB J* 2001; 15: 2294 - 2296.

Tanaka A, Kawarabayashi T, Fukuda D, Nishibori Y, Sakamoto T, Nishida Y, et al. Circadian variation of plaque rupture in acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 2004; 93: 1 - 5.

Tayebjee MH, Lip GY, Blann AD, MacFadyen RJ. Effects of age, gender, ethnicity, diurnal variation and exercise on circulating levels of matrix metalloproteinases (MMP)-2 and -9, and their inhibitors, tissue inhibitors of matrix metalloproteinases (TIMP)-1 and -2. *Thromb Res* 2005; 115: 205 - 210.

Thompson DR, Blandford RL, Sutton TW, Marchant PR. Time of onset of chest pain in acute myocardial infarction. *Int J Cardiol* 1985; 7: 139 – 148.

Tofler GE, Brezinski DA, Schafer AI, Czesler CA, Rutherford JD, Willich SN et al. Concurrent morning increase in platelet aggregability and the risk of myocardial infarction and sudden cardiac death. *N Eng J Med* 1987; 316: 1514 -1518.

Tofler GH, Muller JE, Stone PH, Forman S, Solomon RE, Knatterud GL, Braunwald E. Modifiers of timing and possible triggers of acute myocardial infarction in the Thrombolysis In Myocardial Infarction Phase II (TIMI II) Study Group. *J Am Coll Cardiol* 1992; 20: 1049 - 1055.

Vacas MI, Del Zar MM, Martinuzzo M, Cardinali DP. Binding sites for [3H]-melatonin in human platelets. *J Pineal Res* 1992; 13: 60 - 65.

Vacas MI, Del Zar MM, Martinuzzo M, Falcon C, Carreras LO, Cardinali DP. Inhibition of human platelet aggregation and thromboxane B₂ production by melatonin. Correlation with plasma melatonin levels. *J Pineal Res* 1991; 11: 135 -139.

Van Benthem J, Ebels I, Balemans MG, de Moree A, Mans DR. The effect of reduced neopterin on the synthesis of several methylated indoles in the pineal gland of adult male golden hamsters kept under standardized conditions. *J Neural Transm* 1985; 62: 137 - 154.

Vane JR, Anggard EE, Botting RM. Regulatory functions of the vascular endothelium. *N Eng J Med* 1990; 323: 27 - 36.

Vanhoutte PM. Endothelial control of vasomotor function. *Circ J*. 2003; 67: 572 -575.

Verma S, Badiwala MV, Weisesl RD, Li SH, Wang CH, Fedak PW, et al. C-reactive protein activates the nuclear factor- κ B signal transduction pathway in saphenous vein endothelial cells: implications for atherosclerosis and restenosis. *J Thorac Cardiovas Surg* 2003; 126: 1886 – 1891.

Verma S, Szmítko PE, Yeh ET. C-reactive protein: structure affects function. *Circulation* 2004; 109: 1914 - 1917.

Vidal F, Colome C, Martinez-Gonzalez J, Badimon L. Atherogenic concentrations of native low-density lipoproteins down-regulate nitric-oxide-synthase mRNA and protein levels in endothelial cells. *Eur J Biochem* 1998; 252: 378 – 384.

Villar Álvarez F, Banegas Banegas JR, de la Mata Donado Campos J, Rodríguez Artalejo F. Las Enfermedades cardiovasculares y sus factores de riesgo en España: hechos y cifras. Informe SEA 2003. Sociedad Española de Arteriosclerosis.

Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases; structure, function and biochemistry. *Circ Res* 2003; 92: 827 – 839.

Wainwright CL. Matrix metalloproteinases, oxidative stress and the acute response to acute myocardial ischaemia and reperfusion. *Curr Opin in Pharmacol* 2004; 4: 132 – 138.

Wald NJ, George L Smith D, Densem JW, Petterson K. Serum screening for Down's syndrome between 8 and 14 weeks of pregnancy. Internacional Prenatal Screening Research Group. *Br J Obstet Gynaecol* 1996; 103: 407 - 412.

Weiss D, Sorescu D, Taylor WR. Angiotensin II and atherosclerosis. *Am J Cardiol* 2001; 87: 25C - 32C.

White CR, Brock TA, Chang LY, Crapo J, Briscoe P, Ku D, et al. Superoxide and peroxynitrite in atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 1044 – 1048.

Willich SN, Levy D, Rocco MB, Tofler GH, Stone PH, Muller JE. Circadian variation in the incidence of sudden cardiac death in the Framingham Heart Study population. *Am J Cardiol* 1987; 60: 801 - 806.

Willich SN, Linderer T, Wegscheider K, Leizorovicz A, Alamercury I, Schroder R. Increased morning incidence of myocardial infarction in the ISAM study: absence with prior beta-adrenergic blockade. ISAM Study Group. *Circulation* 1989; 80: 853 - 858.

Witztum JL, Steinberg D. The oxidative modification hypothesis of atherosclerosis: does it hold for humans? *Trends Cardiovasc Med* 2001; 11: 93 – 102.

Ximenes VF, Silva SO, Rodrigues MR, Catalani LH, Maghzal GJ, Kettle AJ, Campa A. Superoxide-dependent oxidation of melatonin by myeloperoxidase. *J Biol Chem* 2005; 280: 38160 - 38169.

Yamagishi M, Higashikata T, Ishibashi-Ueda H, Sasaki H, Ogino H, Iihara K, et al. Sustained upregulation of inflammatory chemokine and its receptor in aneurysmal and occlusive atherosclerotic disease: results from tissue analysis with cDNA macroarray and real-time reverse transcriptional polymerase chain reaction methods. *Circ J* 2005; 69: 1490 - 1495.

Young JL, Libby P, Schönbeck U. Cytokines in the pathogenesis of atherosclerosis. *Thromb Haemost* 2002; 88: 554 – 567.

Yudkin JS, Stehouwer CD, Emeis JJ, Coppack SW. C-reactive protein in healthy subjects: associations with obesity, insulin resistance, and endothelial dysfunction: a potential role for cytokines originating from adipose tissue? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 972 - 978.

Zhang R, Brennan ML, Fu X, Aviles RJ, Pearce GL, Penn MS, et al. Association between myeloperoxidase levels and risk of coronary artery disease. *JAMA* 2001; 286: 2136 – 2142.

Zhang R, Brennan ML, Shen Z, MacPherson JC, Schmitt D, Molenda CE, Hazen SL. Myeloperoxidase functions as a major enzymatic catalyst for initiation of lipid peroxidation at sites of inflammation. *J Biol Chem* 2002; 277: 46116 – 46122.

Zhang R, Shen Z, Nauseef WM, Hazen SL. Defects in leukocyte-mediated initiation of lipid peroxidation in plasma as studied in myeloperoxidase-deficient subjects: systematic identification of multiple endogenous diffusible substrates for myeloperoxidase in plasma. *Blood* 2002; 99: 1802 – 1810.

Zoog SJ, Papov VV, Pullen SS, Jakes S, Kehry MR. Signaling and protein associations of a cell permeable CD40 complex in B cells. *Mol Immunol* 2004; 40: 681 - 694.

ANEXOS

Decreased nocturnal melatonin levels during acute myocardial infarction

Abstract: Acute myocardial infarction is accompanied by an increase in cellular oxidative stress in the pericardial coverings of the heart. Melatonin is a highly potent and efficient radical scavenger. Little research has been carried out concerning the relationship between this antioxidant and acute myocardial infarction in humans. In this work, serum levels of melatonin and parameters of oxidative stress, such as glutathione peroxidase and lipid peroxidation levels were examined in light/dark periods in patients with acute myocardial infarction. Twenty-five patients diagnosed with acute myocardial infarction were studied and 25 patients with no evidence of coronary artery disease served as controls. Venous blood samples were obtained from the patients and control subjects to determine melatonin, glutathione peroxidase and lipid peroxidation; the samples were collected at 10:00 hr (light period) and 03:00 hr (dark period) in the first 24 hr after admission to the coronary care unit. Our results demonstrate the existence of differences between changes in melatonin levels in control subjects and acute myocardial infarction patients, revealing a reduced nocturnal elevation in the acute myocardial infarction group. Glutathione peroxidase levels were lower after acute myocardial infarction and did not show diurnal variations. In the control group, lipid peroxidation levels presented a light/dark pattern but in the acute myocardial infarction group diurnal variations of this parameter were lost. Our data show that acute myocardial infarction is associated with a nocturnal serum melatonin deficit as well as increased oxidative stress, suggesting that melatonin is, at least in part, depleted during the dark phase to reduce the free radicals formed in acute myocardial infarction.

Alberto Domínguez-Rodríguez¹, Pedro Abreu-González², Martín J. García¹, Juan Sánchez², Francisco Marrero¹ and Diego de Armas-Trujillo¹

¹Department of Cardiology, Hospital Universitario de Canarias; ²Department of Physiology, University of La Laguna, School of Medicine, Tenerife, Spain

Key words: antioxidants, free radicals, ischemia, light/dark, melatonin, myocardial infarction

Address reprint requests to: Pedro Abreu-González, Departamento de Enfermería, E.U. de Enfermería y Fisioterapia, Universidad de La Laguna, Campus de Ciencias de La Salud, La Cuesta, La Laguna 38200, Tenerife, Spain. E-mail: pabreu@ull.es

Received June 3, 2002;
accepted July 22, 2002.

Introduction

Melatonin (N-acetyl-5-methoxytryptamine) is synthesized by the pineal gland of vertebrates, including humans, and released following a circadian rhythm that regulates several physiological and neuroendocrine functions [1]. Synthesis and release of melatonin is stimulated at night by norepinephrine via β_1 -adrenoceptors, and this process is further potentiated by stimulation of α_1 -adrenoceptors [2]. Serum melatonin is hydroxylated in the liver to 6-hydroxymelatonin, which, in turn, is conjugated to either sulphate (70–80%) or glucuronide (5%) derivatives. These conjugates are then excreted in the urine [3]. Furthermore, it is also non-enzymatically metabolized to cyclic 3-hydroxymelatonin when it scavenges the hydroxyl radical (OH^\cdot) [4].

Myocardial ischemia occurs when oxygen delivery to the myocardium is insufficient to satisfy mitochondrial oxidation. During ischemia, there is insufficient oxygen availability but oxygen free radicals are still formed from the residual molecular oxygen [5]. Also, the activities of the mitochondrial electron-transport chain are reduced increasing electron leakage from the respiratory chain, which reacts with residual molecular oxygen and forms, among other free radicals, the superoxide anion ($\text{O}_2^{\cdot-}$).

In acute myocardial infarction, excess production of active oxygen species such as $\text{O}_2^{\cdot-}$ and hydrogen peroxide (H_2O_2) [6] can lead to the generation of more toxic oxidants such as the OH^\cdot [7]. If biomembranes are near the site of these reactive radicals, the membrane fatty acids are peroxidized and several different aldehyde products are generated. These aldehydes, malondialdehyde (MDA) + 4-hydroxyalkenals (4-HDA), appear to be intimately involved in cell degeneration induced by oxidative stress [8]. Glutathione peroxidase (GSH-Px) activity appears to account for all the hydroperoxide-reducing activity in human plasma. Considering the potentially deleterious effects of fatty acid hydroperoxides, this peroxidase may play an important protective role against hydroperoxide pathology [9]. Therefore, levels of these aldehydes and of GSH-Px in serum, are a good index of oxidative cellular stress.

Melatonin protects against certain pathological conditions by scavenging reactive oxygen species [10] and reduces ischemic injury in several organs, the brain [11], the liver [12] and the heart [13].

There has been little published research, in humans, concerning the possible relevance of melatonin and free radical production in acute myocardial infarction. In the

present work, we studied the relationship between serum levels of melatonin and of GSH-Px and lipid peroxidation as marker of free radical production, in acute myocardial infarction over a light/dark period.

Materials and methods

Subjects

In the present study, the sample consisted of 25 consecutive patients with acute myocardial infarction and 25 healthy subjects who served as controls. All patients and healthy volunteers selected were given a full explanation of the study and agreed to participate. The study was approved by the local ethics committee on human research (University of La Laguna). Subjects were studied under carefully controlled conditions in the coronary care unit of HUC (Hospital Universitario de Canarias, Canary Islands, Spain). The light/dark period in the hospital unit was 14 hr (1745 ± 33 lux):12 hr (1.33 ± 0.3 lux); lights came on 07:00 hr. All subjects had normal kidney and liver function. None of them took sedatives, antiepileptic drugs, tricyclic antidepressants or any medication known to influence melatonin metabolism. Because of their possible effects on melatonin synthesis, subjects with psychiatric sleeping disorders, infectious and endocrine illness (e.g., diabetes mellitus), shift workers or subjects with jet-lag syndrome were excluded from the study. The variables studied were: sex, age, smoking, hypertension, hypercholesterolemia and hypertriglyceridemia.

Patients

The study included 25 consecutive patients (18 men and 7 women, mean age 59 ± 12 yr) diagnosed with acute myocardial infarction as defined by the following criteria [14]: typical rise and gradual fall (troponin) or more rapid rise and fall (creatinine kinase MB) of biochemical markers of myocardial necrosis with at least one of the following: (a) ischemic symptoms, (b) development of pathological Q waves on the electrocardiograph, (c) electrocardiograph changes indicative of ischemia (ST segment elevation or depression), or (d) coronary artery intervention (e.g. coronary angioplasty).

Control group

The control group was composed of 25 age- and sex-matched healthy volunteers (17 men and 8 women, mean age 53 ± 13 yr) who had been recruited by the physicians at our institution.

Experimental protocol

On admission to the coronary care unit, a catheter with a heparin lock was implanted in the antecubital vein for blood sample withdrawal. Venous blood samples obtained from the patients and control subjects to determine melatonin, GSH-Px and lipid peroxidation collected in the first 24 hr after admission to the coronary care unit.

The blood samples for melatonin, GSH-Px and lipid peroxidation measurement, were collected at 10:00 hr (light period) and 03:00 hr (dark period). When blood samples were collected at night in the dark, the subjects were sleeping and the nurse used a small torch with a dim red light (intensity <100 lux) taking care not to shine it directly on the patient's face. Serum samples were aliquoted into several tubes and stored at -30°C until analysis.

Laboratory measurements

Melatonin levels in serum samples were measured by an enzyme-immunoassay kit (DRG International, Marburg, Germany). The selenoenzyme GSH-Px activity was assayed using an enzyme-immunoassay kit (Calbiochem, San Diego, CA, USA). Serum lipid peroxidation, as malondialdehyde (MDA) + 4-hydroxyalkenals (4-HDA), was measured spectrophotometrically at an absorbance of 586 nm in accordance with the kit's instructions (Calbiochem, San Diego, CA, USA).

Serum total cholesterol, high density lipoprotein (HDL) cholesterol and triglyceride levels were determined using enzymatic methods [Boehringer-Mannheim, Barcelona, Spain; in the case of HDL cholesterol after precipitation of low density lipoprotein (LDL) cholesterol with phosphotungstate]. Serum LDL cholesterol levels were determined by the Friedewald method. Plasma glucose levels were determined with a glucose analyzer II (Beckman Instruments, Palo Alto, CA, USA). Determination of creatine kinase MB was done by the immunological technique NAC-activated creatine kinase MB, where the subunits of creatine kinase M are inhibited by a specific antibody without affecting creatine kinase B. Troponin I was determined by an isoenzymatic method based on the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) sandwich technique (Boehringer-Mannheim, Barcelona, Spain).

Statistical analysis

Data were analyzed by the SPSS software package 10.0.1 for PC (Analytical Software, Chicago, IL, USA). All quantitative variables are expressed as mean ± S.E.M. and the categorical variables as percentages. Light-dark changes in melatonin, glutathione peroxidase and lipid peroxidation were analyzed by means of a paired *t*-test. Categorical variables were done with the χ^2 test. An unpaired *t*-test was used to compare the continuous variables between acute myocardial infarction and controls. A statistical significance level of $P < 0.05$ was chosen.

Results

The general characteristics of the study populations are shown in Tables 1 and 2. Table 1 shows the baseline characteristics of all participants. As expected, patients in the acute myocardial infarction had more numerous conventional risk factors than control subjects. Mean age, sex and conventional risk factors for coronary artery disease were not significantly different between cases and controls, except for the variable smoking. In the acute myocardial

	AMI (n = 25)	Control subjects (n = 25)	P
Age (yr)	59 ± 2.4	53 ± 2.6	0.10
Smoking (%)	44.0	4.0	< 0.001
Hypertension (%)	33.3	20.0	0.29
Hypercholesterolemia (%)	32.0	12.0	0.08
Hypertriglyceridemia (%)	4.0	0	0.31
Sex: men/women	18/7	17/8	0.76

Data are expressed as mean ± S.E.M.

	AMI (n = 25)	Control subjects (n = 25)	P
Total cholesterol (mg/dL)	194.4 ± 8.4	200.3 ± 8.9	0.63
LDL cholesterol (mg/dL)	113.0 ± 6.6	119.0 ± 8.2	0.57
HDL cholesterol (mg/dL)	54.0 ± 2.2	50.8 ± 2.9	0.38
Triglycerides (mg/dL)	135.3 ± 16.2	154.6 ± 17.6	0.42
Glucose (mg/dL)	111.1 ± 2.3	100 ± 3.0	0.005
CK-MB (U/L)	321.6 ± 53.1	20.2 ± 1.6	< 0.001
Troponin I (ng/mL)	4.33 ± 1.0	0.01 ± 0.002	< 0.001

Data are expressed as mean ± S.E.M.

Table 1. Baseline characteristics of acute myocardial infarction patients and control subjects

Table 2. Analytical parameters in acute myocardial infarction patients and control subjects

infarction group, 60% of patients received thrombolytic treatment (reteplase) and 40%, coronary angioplasty.

Table 2 shows that mean total cholesterol, HDL cholesterol, LDL cholesterol and triglycerides were similar among cases and control subjects, except for glucose. As expected, levels of creatine kinase MB and troponin I were significantly higher in acute myocardial infarction patients than in control subjects.

Serum melatonin levels are shown in Fig. 1A. There were significant differences between the melatonin levels obtained during the light phase (10:00 hr) and the dark phase (03:00 hr) ($P < 0.001$). However, in the acute myocardial infarction group the light/dark difference was less than that seen in the controls ($P < 0.05$). Moreover, a significant reduction in nocturnal melatonin levels was observed in acute myocardial infarction patients compared with controls and the absolute values recorded in the acute myocardial infarction group were always lower than their corresponding control values ($P < 0.05$).

Serum levels of protein GSH-Px are shown in Fig. 1B. In contrast to melatonin, there were no significant changes in GSH-Px with changing light/dark period. However, significant differences were found between patients with acute myocardial infarction and controls at both time periods.

Serum lipid peroxidation is represented in Fig. 1C as levels of MDA + 4-HDA. In the control group, there are significant differences between lipid peroxidation values in the light and dark phases ($P < 0.05$), which are clearly lost when the patient suffers an acute myocardial infarction. Moreover, in acute myocardial infarction patients, nocturnal levels of lipid peroxidation significantly increased relative to the corresponding controls ($P < 0.05$).

Discussion

In this paper, we studied the light/dark patterns of serum levels of melatonin, GSH-Px and lipid peroxidation in

patients with acute myocardial infarction. Levels of melatonin and lipid peroxidation in human serum presented diurnal variations in the control group. In the acute myocardial infarction group, melatonin maintained diurnal variations but with a significantly smaller amplitude. However, in these patients lipid peroxidation lost this diurnal rhythm. Serum GSH-Px did not exhibit circadian variations either and values were lower in acute myocardial infarction than in the controls. These results suggest that melatonin is, at least in part, responsible for the nocturnal reduction in serum lipid peroxidation in control subjects.

Lipid peroxidation is frequently used as an index of oxidative stress in tissues. This is caused by free radical damage to membrane components of the cell and results in the activation of lysosomal enzymes and, in extreme cases, induces cell necrosis and inflammation [15]. Using human serum levels MDA + 4HDA as a criterion of lipid peroxidation, we found that this peroxidation was significantly greater at night in patients with acute myocardial infarction. Simultaneously, another parameter of lipid peroxidation, serum GSH-Px, was significantly lower in acute myocardial infarction patients, and no differences were found in relation to the light/dark period. Comparative data from other authors only exist in relation to the light/dark cycle in animal models. Indeed, Pablos [16] demonstrate, in chick brain, that physiological melatonin may act synergically on the antioxidant defense system not only as a direct radical scavenger, but also indirectly as a stimulator of GSH-Px activity.

In recent years, there has been considerable interest in the antioxidant properties of melatonin. This agent has a high lipid solubility and readily enters the cytosol and cellular compartments where it acts as an endogenous antioxidant and a radical scavenger of toxic free radicals [17]. The melatonin has been reported to be an efficient scavenger of the hydroxyl radical [18]. Human melatonin levels in blood shows a strong circadian rhythm with high nocturnal values

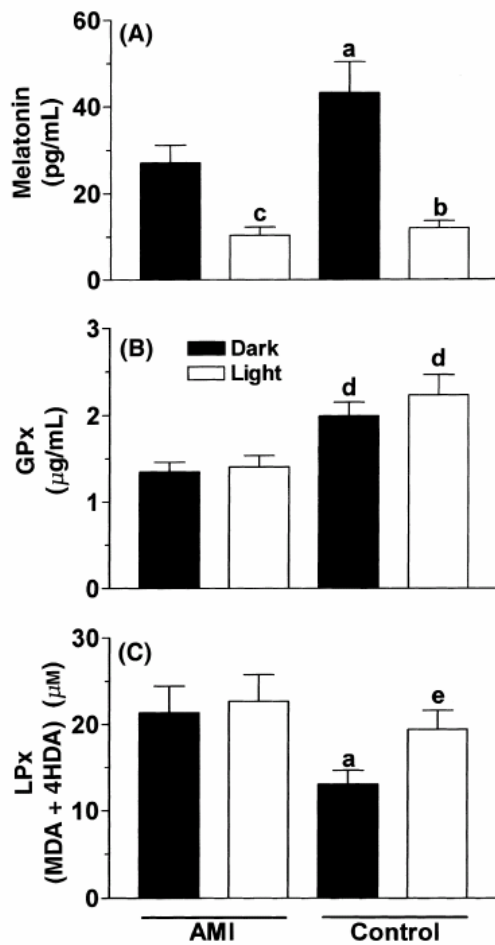


Fig. 1. Light/dark pattern in serum levels of patients with acute myocardial infarction compared with controls : Melatonin (A), glutathione peroxidase (GPx) (B) and lipid peroxidation products (MDA + 4HDA) (C). Blood samples were collected at 10:00 hr (light period) and 03:00 hr (dark period). Bars represent the mean \pm S.E.M. of 25 patients and 25 controls per group. (a) $P < 0.05$ versus acute myocardial infarction-dark, (b) $P < 0.001$ versus control - dark, (c) $P < 0.01$ versus acute myocardial infarction - dark, (d) $P < 0.01$ versus acute myocardial infarction, (e) $P < 0.05$ versus control - dark. AMI = acute myocardial infarction.

[19]. In our results, in both controls and in acute myocardial infarction patients, serum melatonin showed a light/dark pattern. Nevertheless, in spite of acute myocardial infarction cases maintaining a circadian rhythm, the nocturnal serum melatonin was significantly lower than in the control group. These results suggest that possibly melatonin is, at least in part, was depleted at night because of its scavenging action on free radicals formed during the first 24 hr of acute myocardial infarction. It is document in humans that the

total antioxidant status of the blood exhibits a 24-hr rhythm with a nocturnal peak. Moreover, exposure of volunteers to light during the night resulted in a clear decrease of both antioxidant status and melatonin levels [20].

There are two possible mechanisms for melatonin's antioxidant role in the acute myocardial infarction group: (a) via a direct action as a free radical scavenger, as melatonin has the ability to detoxify reactive oxygen and nitrogen species by non-enzymatic pathways. This results in the formation another potent antioxidant, N¹-acetyl-N²-formyl-5-methoxykynuramine [21] or; (b) by indirect antioxidant activity, via the stimulation of several antioxidant enzymes and the stabilization of membrane fluidity [22].

There is significant controversy concerning the pineal response to stress. Muñoz-Hoyos et al. [23] showed that nocturnal melatonin levels were increased in a model of human acute stress. In rats, chronic stress reduced pineal function during the dark phase of the diurnal cycle although the precise mechanisms responsible for this effect are unclear. This result does imply, however, that these effects are related to changes in sympathetic neuronal activity and are not mediated by stress-induced elevation in plasma catecholamines [24]. In addition, Troiani et al. [25, 26] showed, in an animal model that, neither hormones secreted from the pituitary gland nor catecholamines secreted from the sympathetic nerves, are involved in the reduction in pineal melatonin level. In our opinion, decreased nocturnal melatonin levels in the acute myocardial infarction group were, at least in part, produced by the increase in free radicals, without ruling out a possible contribution of sympathetic stress.

In a preliminary clinical study, a relationship between melatonin and coronary artery disease has been suggested. Similarly, Brugger et al. [27] reported reduced levels of plasma melatonin measured at 02:00 hr in coronary artery disease patients and other authors have shown low levels of urinary 6-sulfatoxymelatonin in these patients [28]. Yet, few published data have associated melatonin and free radical production with acute myocardial infarction.

The data obtained using this research approach provides clear cut evidence for a reduced nocturnal melatonin production in patients with acute myocardial infarction. Our results suggest that physiological levels of melatonin in human serum may be required, along with other physiological antioxidants, to maintain the total cellular oxidative status as low as possible.

In conclusion, this study demonstrates that acute myocardial infarction is associated with an antioxidant deficit as well as an increased oxidative stress and lipid peroxidation. Low serum melatonin levels in patients with acute myocardial infarction are insufficient to protect the heart from damage during myocardial infarction.

Clinical cardiovascular data in melatonin treatment are very scarce in humans [29]. Tan et al. [12] studied the protective effects of melatonin in isolated heart from ischemia/reperfusion-induced arrhythmias. More research is required into the effects of therapeutically modulating the melatonergic system on cardiovascular haemodynamics and rhythm under varying physiopathological conditions and the possible impact on cardiovascular morbidity and mortality.

Acknowledgments

The authors wish to express their special thanks to the nursing staff of the Coronary Care Unit of Hospital Universitario de Canarias for their assistance in the blood sample collection. Without their support, this study would not have been possible. We thank Alejandro Jimenez for assisting with the statistical programming.

We would also like to thank ITALFARMACO and MERCK Companies, for their financial support for the melatonin, glutathione peroxidase and lipid peroxidation analyses. We are grateful to Professor Dr. Diego de Armas Trujillo, *posthumous title*, for his constant help and expert assistance.

References

1. REITER RJ. Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocr Rev* 1991; **12**:151–180.
2. KLEIN DC, SUGDEN D, WELLER JL. Postsynaptic alpha adrenergic receptors potentiate the beta adrenergic stimulation of pineal serotonin N-acetyltransferase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; **80**:599–603.
3. CARDINALI DP. Melatonin. A mammalian pineal hormone. *Endocr Rev* 1981; **2**:327–346.
4. TAN DX, MANCHESTER LC, REITER RJ et al. A novel melatonin metabolite, cyclic 3-hydroxy-melatonin: a biomarker of in vivo hydroxyl radical generation. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; **253**:614–620.
5. JENNING RB. Myocardial ischaemia observations, definitions and speculation. *J Mol Cell Cardiol* 1970; **1**:345–349.
6. MCCORD JM. Oxygen-derived free radicals in post-ischemic tissue injury. *N Eng J Med* 1985; **312**:159–163.
7. KARWATOWSKA-PROKOPCZUK E, CZARNOWKA E, BERECEWICZ A. Iron availability and free radical induced injury in the isolated ischaemic/reperfusion rat heart. *Cardiovasc Res* 1992; **26**:58–66.
8. ESTERBAUER H, SCHAUR RJ, ZOLLNER H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med* 1991; **11**:81–128.
9. MADDIPATI KR, MARNETT LJ. Characterization of the major hydroperoxide-reducing activity of human plasma. *J Biol Chem* 1987; **262**:17,398–17,403.
10. REITER RJ. Melatonin: lowering the high Price of Free Radicals. *News in Physiol Sci* 2000; **15**:246–250.
11. CHO S, JOH TH, BALK HH et al. Melatonin administration protects CA1 hippocampal neurons after transient forebrain ischemia in rats. *Brain Res* 1997; **755**:335–338.
12. SEWERYNEK E, REITER RJ, MELCHIORRI D et al. Oxidative damage in the liver induced by ischemia-reperfusion: protection by melatonin. *Hepatology* 1996; **43**:898–903.
13. TAN DX, MANCHESTER LC, REITER RJ et al. Ischemia/reperfusion-induced arrhythmias in the isolated rat heart: prevention by melatonin. *J Pineal Res* 1998; **25**:184–191.
14. Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee. Myocardial infarction redefined. A consensus document of the Joint European Society of Cardiology/ American College of Cardiology Committee for the redefinition of myocardial infarction. *Eur Heart J* 2000; **21**:1502–1513.
15. SALMINEN A, VIHKO V. Lipid peroxidation in exercise myopathy. *Exp Mol Pathol* 1983; **38**:380–388.
16. PABLOS MI, REITER RJ, ORTIZ GG et al. Rhythms of glutathione peroxidase and glutathione reductase in brain of chick and their inhibition by light. *Neurochem Int* 1998; **32**:69–75.
17. HARDELAND R, RODRIGUEZ C. Versatile melatonin: a pervasive molecule serves various functions in signaling and protection. *Chronobiol Int* 1995; **12**:157–165.
18. TAN DX, CHEN LD, POEGGELER LC et al. Melatonin: a potent, endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocrine J* 1993; **1**:57–60.
19. BROWN GM. Day-night rhythm disturbance, pineal function and human disease. *Horm Res* 1992; **37**:105–111.
20. BENOT S, GOBERNA R, REITER RJ et al. Physiological levels of melatonin contribute to antioxidant capacity of human serum. *J Pineal Res* 1999; **27**:59–64.
21. TAN DX, MANCHESTER LC, BURKHARDT S et al. N-acetyl-N-formyl-5-methoxykynuramine, a biogenic amine and melatonin metabolite, functions as a potent antioxidant. *FASEB J* 2001; **15**:2294–2296.
22. REITER RJ, TAN DX, MANCHESTER LC et al. Biochemical reactivity of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species. *Cell Biochem Biophys* 2001; **34**:237–256.
23. MUÑOZ-HOYOS A, RODRIGUEZ-CABEZAS T, MOLINA-CARBALLO A et al. Melatonin concentration in the umbilical artery and vein in human preterm and term neonates and neonates with acute fetal distress. *J Pineal Res* 1992; **13**:184–191.
24. YOCCA FD, FRIEDMAN E. Effect of immobilization stress on rat pineal β -adrenergic receptor-mediated function. *J Neurochem* 1984; **42**:1427–1432.
25. TROIANI ME, REITER RJ, VAUGHAN MK et al. Swimming depresses nighttime melatonin content without changing N-acetyl-transferase activity in the rat pineal gland. *Neuroendocrinology* 1988; **47**:55–60.
26. TROIANI ME, REITER RJ, TANNEBAUM MG et al. Neither the pituitary gland nor the sympathetic nervous system is responsible for eliciting the large drop in elevated rat pineal melatonin levels due to swimming. *J Neural Transm* 1988; **74**:149–160.
27. BRUGGER P, MARKTL W, HEROLD M. Impaired nocturnal secretion of melatonin in coronary heart disease. *Lancet* 1995; **345**:1408.
28. SAKOTNIK A, LIEBMANN P, STOSCHITZKI K et al. Decreased melatonin synthesis in patients with coronary artery disease. *Eur Heart J* 1999; **20**:1314–1317.
29. NISHIYAMA K, YASUE H, MORIYAMA Y et al. Acute effects of melatonin administration on cardiovascular autonomic regulation in healthy men. *Am Heart J* 2001; **141**:E9–E16.

Ritmo luz/oscuridad de las citocinas proinflamatorias en el infarto agudo de miocardio

Alberto Domínguez Rodríguez^a, Pedro Abreu González^b, Martín J. García^a, Alejandro de la Rosa^a, Manuel Vargas^a y Francisco Marrero^a

^aServicio de Cardiología. Hospital Universitario Nuestra Señora de Candelaria. Santa Cruz de Tenerife. España. ^bDepartamento de Fisiología. Universidad de la Laguna. Santa Cruz de Tenerife. España.

Introducción y objetivos. Determinadas citocinas proinflamatorias se han encontrado elevadas en pacientes con síndrome coronario agudo. En algunos estudios ha podido comprobarse que la distribución de los accidentes isquémicos coronarios a lo largo del día no es uniforme, sino que experimenta variaciones rítmicas. El objetivo de este estudio es determinar si existe un ritmo de luz/oscuridad de las citocinas proinflamatorias en los pacientes con infarto agudo de miocardio.

Pacientes y método. Se incluyeron 40 pacientes con infarto agudo de miocardio y 40 controles. Se determinaron los valores de interleucina 6 y 1 β en las primeras 24 h del episodio isquémico coronario agudo. Las muestras de sangre se extrajeron a las 03.00 (período oscuridad) y a las 10.00 h (período luz).

Resultados. Ambos grupos fueron similares en edad, sexo y factores de riesgo coronario. Las concentraciones de la interleucina 6 demostraron un ritmo luz/oscuridad significativo, tanto en los pacientes con infarto agudo de miocardio como en los controles ($41,93 \pm 5,90/100,39 \pm 13,60$ frente a $25,76 \pm 4,45/52,67 \pm 7,73$ pg/ml). Además, la interleucina 6 fue significativamente mayor en los pacientes con infarto agudo de miocardio que en los controles. La interleucina 1 β no demostró un ritmo luz/oscuridad.

Conclusiones. Tanto en el grupo control como en el de infarto agudo de miocardio, la interleucina 6 demostró un ritmo de luz/oscuridad. Los pacientes con infarto agudo de miocardio presentan concentraciones de interleucina 6 más altas, secundarias a una respuesta fisiológica a la lesión tisular. El ritmo luz/oscuridad puede afectar a diferentes parámetros fisiológicos y bioquímicos.

Palabras clave: Interleucina. Infarto de miocardio. Inflamación. Ritmo circadiano. Investigación básica.

Circadian Variations in Proinflammatory Cytokine Concentrations in Acute Myocardial Infarction

Introduction and objectives. The concentration of certain proinflammatory cytokines has been found to be elevated in patients with acute coronary syndrome. Many studies have shown that coronary ischemic accidents do not show a uniform distribution throughout the day, but instead exhibit rhythmic variations. The objective of this study is to determine whether there is a circadian pattern of variation in the concentrations of proinflammatory cytokines in patients with acute myocardial infarction.

Patients and method. The sample included 40 patients with acute myocardial infarction and 40 controls. Levels of interleukin 6 and 1 β were determined in the first 24 hours after the acute coronary ischemic episode. Blood samples were extracted at 3:00 a.m. (period of darkness) and at 10:00 a.m. (period of daylight).

Results. Both groups were similar in age, sex distribution, and coronary risk factors. Interleukin 6 levels showed a significant variation between daylight and nighttime concentrations in patients with acute myocardial infarction and controls ($41.93 \pm 5.90/100.39 \pm 13.60$ vs $25.76 \pm 4.45/52.67 \pm 7.73$ pg/ml). However, interleukin 6 concentrations were higher in the acute myocardial infarction group than in the control group. Interleukin 1 β concentrations did not vary between daylight and darkness.

Conclusions. In both the control group and acute myocardial infarction group, interleukin 6 concentrations varied between daylight and darkness. Patients with acute myocardial infarction shown a higher concentration of interleukin 6 secondary to the physiological response to tissue damage. Circadian variations can affect the measurements obtained for different physiological and biochemical parameters.

Key words: Interleukins. Myocardial infarction. Inflammation. Circadian rhythm. Basic research.

Full English text available at: www.revvespcardiol.org

Correspondencia: Dr. A. Domínguez Rodríguez.
La Longuera. c/ Teide, 7, 2.ª dcha. Los Realejos.
38410 Santa Cruz de Tenerife. España.
Correo electrónico: pabreu@ull.es

Recibido el 29 de julio de 2002.
Aceptado para su publicación el 4 de febrero de 2003.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años se ha observado que la inflamación es un mecanismo clave de la aterogénesis y de la progresión rápida de la enfermedad arterial coronaria¹.

ABREVIATURAS

CIT: citocinas.
IAM: infarto agudo de miocardio.
SCA: síndrome coronario agudo.
L/O: luz/oscuridad.
IL: interleucina.

La aterosclerosis es un proceso complejo que implica a diferentes tipos de células y numerosas familias de citocinas (CIT) y factores de crecimiento². Las CIT son péptidos señalizadores, mediadores químicos, que se producen como respuesta a una agresión a un tejido, causando la respuesta inflamatoria³. La mayoría de las CIT son moléculas multifuncionales que ejercen diferentes acciones en las diferentes células sobre las que actúan⁴. Así mismo, durante los últimos años se ha podido comprobar que la distribución de los síndromes coronarios a lo largo del día no es uniforme, sino que experimenta variaciones rítmicas. Se ha demostrado con claridad que el comienzo del infarto agudo de miocardio (IAM) sucede con mayor frecuencia en las primeras horas de la mañana, dando lugar a muchas investigaciones en las que se intenta averiguar las causas de la distribución circadiana, así como sus implicaciones clínicas y terapéuticas^{5,6}.

Se han apreciado modificaciones diarias de factores humorales, como el aumento de la agregabilidad plaquetaria en las primeras horas de la mañana⁷, disminución de la actividad de t-PA⁸ y aumento de las catecolaminas⁹, que podrían desencadenar fenómenos trombóticos. Existe un vínculo claro entre inflamación y trombosis, influyéndose de forma recíproca¹⁰. Las células endoteliales estimuladas por CIT producen sustancias procoagulantes, y las células inflamatorias activadas sintetizan moléculas que modulan la cascada trombótica. En pacientes con síndrome coronario agudo (SCA) se ha objetivado la existencia de valores aumentados de CIT proinflamatorias¹¹. En el momento actual existen pocos datos acerca del ritmo luz/oscuridad (L/O) de las CIT proinflamatorias en pacientes con SCA.

El objetivo de este trabajo fue estudiar el ritmo luz/oscuridad (L/O) de las CIT proinflamatorias utilizando valores en suero de interleucina (IL) 6 y 1 β . Las mediciones obtenidas se comparan con la realizada en pacientes con IAM y con las de un grupo de sujetos sanos.

PACIENTES Y MÉTODO

Pacientes

Desde mayo de 2001 hasta diciembre de 2001, 75 pacientes afectados de IAM fueron atendidos en la

unidad de cuidados intensivos cardiológicos del Hospital Universitario de Canarias. De esta población, 40 pacientes (53%) presentaban SCA con elevación prolongada del segmento ST, a los cuales se les realizó tratamiento de reperfusión. Así mismo, se seleccionó un grupo control compuesto por 40 sujetos sanos, de similares edad y sexo. Se controló la diabetes, introduciendo entre los criterios de inclusión sólo sujetos no diabéticos. El estudio fue aprobado por el comité ético y científico del Hospital Universitario de Canarias. Los sujetos fueron estudiados bajo unas condiciones ambientales cuidadosamente controladas en la unidad de cuidados intensivos cardiológicos. El periodo L/O en la unidad de cuidados intensivos cardiológicos fue de 14 h (1.745 \pm 33 lux)/10 h (1,33 \pm 0,3 lux); el encendido y apagado de las luces se produjo a las 07.00 y las 21.00 h, respectivamente.

Todos los sujetos del estudio, antes de ser incluidos, fueron evaluados mediante anamnesis, exploración física, radiografía de tórax y analítica de sangre. Los criterios de exclusión¹² para los sujetos del estudio fueron: infecciones específicas y no específicas, enfermedades autoinmunes y del tejido colágeno, enfermedades malignas, adicción a drogas, tratamiento con radioterapia, insuficiencia renal aguda o crónica, enfermedades hepáticas, tratamiento inmunodepresor o quimioterapia.

Casos

El presente estudio incluyó a 40 pacientes (23 varones y 17 mujeres, con una edad media de 59 \pm 3,4 años) diagnosticados de IAM definido según los siguientes criterios^{13,14}: aumento característico y disminución progresiva (troponina) o aumento y disminución más rápida (CK-MB masa) de marcadores biológicos de necrosis miocárdica, acompañados de al menos uno de los siguientes: *a)* síntomas de isquemia; *b)* aparición de nuevas ondas Q de necrosis en el electrocardiograma; *c)* cambios en el electrocardiograma sugestivos de isquemia (elevación o depresión del segmento ST), y *d)* intervención coronaria (p. ej., angioplastia coronaria).

Controles

El grupo control estaba compuesto de 40 voluntarios sanos, de los cuales 22 eran varones y 18 mujeres, con una edad media de 53 \pm 4,6 años. Todos ellos estaban asintomáticos, sin antecedentes de enfermedad y con un examen físico normal.

Protocolo experimental

A los sujetos del estudio, una vez ingresados en la unidad de cuidados intensivos cardiológicos, se les implantó un catéter en el antebrazo para la extracción de

sangre. Las muestras de sangre para determinar la IL 6 y 1 β fueron extraídas en las primeras 24 h del comienzo de los síntomas, en los casos. El tiempo medio de evolución de los síntomas en los pacientes en el momento de la extracción diurna y nocturna fue de $13,6 \pm 1,0$ y $7,6 \pm 1,2$ h, respectivamente.

Las muestras de sangre para determinar las IL fueron obtenidas a las 10.00 h (período luz) y 03.00 h (período oscuridad). Cuando las muestras de sangre fueron tomadas durante el período de oscuridad, los sujetos estaban durmiendo. Para ello, la enfermera usó una tenue luz de linterna roja (< 100 lux), que utilizó sólo para acceder a la boca del catéter enfocando puntualmente, en un tiempo lo más corto posible, dicha zona y evitando en todo momento dirigir la linterna hacia los ojos del paciente. Todos los sujetos permanecieron en reposo durante el estudio. Las muestras de suero procedente de la sangre fueron alicuotadas en varios tubos y almacenadas a -80 °C hasta su análisis.

Métodos de laboratorio

Se determinaron las concentraciones plasmáticas de glucosa, colesterol total, colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad (cHDL) y triglicéridos por métodos enzimaticocolorimétricos. El colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad (cLDL) se calculó mediante la fórmula de Friedewald.

Para determinar la isoenzima MB de la creatincinasa (CK-MB) se utilizó el método inmunológico de CK-MB NAC activado, donde las subunidades de la CK-M son inhibidas por un anticuerpo específico sin influir en las CK-B. La troponina I se determinó mediante el método inmunoenzimático, basado en una técnica de ELISA de sándwich (Boehringer Mannheim). Los valores séricos de las IL fueron determinadas por ELISA, siguiendo las especificaciones de la casa suministradora de los kits (DRG International, Marburg, Alemania).

Análisis estadístico

Se utilizó el programa estadístico SPSS versión 10.0 para Windows para el análisis de los datos. Las variables cualitativas se expresan como porcentajes, y las cuantitativas se expresan como media \pm desviación estándar. Se comprobó la proximidad a la normalidad de las distribuciones mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Para comparar dos variables cualitativas se utilizó el test de la χ^2 . Las diferencias de medias entre variables cuantitativas con distribución normal se analizaron con el test de la t de Student. Se realizó un análisis de regresión logística con el método introducir, para la estimación de las *odds ratio* (OR) de las variables confundentes. Las OR se expresan con su intervalo de confianza (IC) del 95%. Se consideró significativo un valor de $p < 0,05$.

TABLA 1. Características basales del grupo de estudio

	Casos (n = 40)	Controles (n = 40)	p
Tabaquismo	44,0	40,0	NS
Hipertensión arterial	33,3	22,0	NS
Hipercolesterolemia	32,0	14,0	NS
Hipertrigliceridemia	4,0	1,0	NS

Los datos se expresan en porcentaje.
NS: no significativo.

TABLA 2. Parámetros analíticos de los sujetos del estudio

	Casos (n = 40)	Controles (n = 40)	p
Colesterol total (mg/dl)	196,4 \pm 8,4	202,3 \pm 8,9	NS
cLDL (mg/dl)	115,0 \pm 6,6	121,0 \pm 8,2	NS
cHDL (mg/dl)	56,0 \pm 2,2	52,0 \pm 2,9	NS
Triglicéridos (mg/dl)	137,3 \pm 16,2	156,6 \pm 17,6	NS
Glucosa (mg/dl)	113,1 \pm 2,3	100,0 \pm 3,0	0,005
CK-MB (U/l)	324,6 \pm 53,0	19,2 \pm 1,6	< 0,001
Troponina I (ng/ml)	6,0 \pm 1,0	0,01 \pm 0,002	< 0,001

Valores expresados como media \pm DE
NS: no significativo.

TABLA 3. Asociación de la IL-6 y la presencia de IAM tras controlar los principales factores de riesgo coronario

	OR (IC del 95%)	p
IL-6* (pg/ml)	1,04 (1,01-1,06)	0,01
Hipertensión arterial	1,44 (0,35-5,88)	NS
Hipercolesterolemia	5,88 (0,60-10,0)	NS
Tabaquismo	2,55 (0,55-6,66)	NS

*Método condicional hacia delante en la estimación de la *odds ratio*.
IC: intervalo de confianza; NS: no significativo.

RESULTADOS

Las características clínicas y analíticas de los sujetos del estudio se exponen en las tablas 1 y 2. Como puede apreciarse en la tabla 1, los factores de riesgo para enfermedad arterial coronaria de los casos no demostró diferencias significativas con el grupo control. De los pacientes con IAM, el 60% recibieron tratamiento trombolítico con reteplase y en el 40% se realizó angioplastia primaria.

En la tabla 2 se exponen las concentraciones de glucosa, colesterol total con sus diferentes fracciones y triglicéridos de los casos comparado con los controles, no demostrando diferencias significativas, excepto los valores de glucosa. Con respecto a los marcadores de necrosis miocárdica, sí se observaron diferencias significativas entre los pacientes con IAM y los controles.

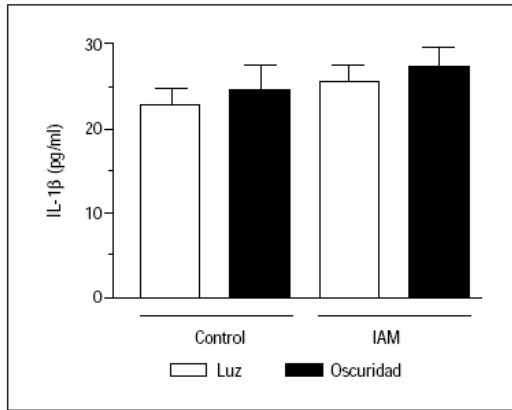


Fig. 1. Ritmo L/O de la IL-1β.

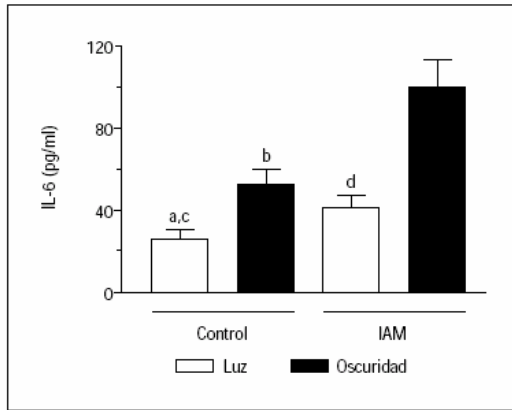


Fig. 2. Ritmo L/O de la IL-6.
^ap < 0,05 frente a IAM luz. ^bp < 0,007 frente a IAM oscuridad. ^cp < 0,005 frente a control oscuridad. ^dp < 0,0003 frente a IAM oscuridad.

En la tabla 3 se observa que, controlando los factores de riesgo principales independientes, se ha encontrado asociación entre los valores de IL-6 y la presencia de IAM.

En la figura 1 se observa la inexistencia de un ritmo L/O de la IL-1β, tanto en los controles como en los casos. Los valores medios de la IL-1β en el ritmo L/O fueron ligeramente mayores, pero no significativos, en los pacientes con IAM. Los valores medios de las concentraciones de IL-1β durante la oscuridad fueron mayores que durante la luz, tanto en los casos como en controles, no demostrando diferencias estadísticamente significativas.

En la figura 2 se expone el ritmo L/O de la IL-6, tanto en los pacientes con IAM (p < 0,0003) como en los controles (p < 0,005). La concentración de IL-6 en

la oscuridad es mayor en los pacientes con IAM que en los controles (p < 0,001). Así mismo, el valor de IL-6 en la luz entre casos y controles presenta diferencias significativas (p < 0,05).

DISCUSIÓN

Se ha acumulado un significativo número de experiencias que implican a células y a moléculas relacionadas con la respuesta inmunológica en el proceso de la lesión vascular con la arteriosclerosis y la aterosclerosis. La lesión de la pared vascular motiva, por una parte, la adhesión de monocitos y linfocitos T a la superficie endotelial y, por otra, la liberación de IL-6 por parte tanto de las células endoteliales como de los leucocitos¹⁵. Los resultados de nuestro estudio demuestran que la IL-6 está aumentada en los pacientes con IAM, probablemente producido por los miocitos y células inflamatorias activadas por la necrosis tisular¹⁶.

La IL-6 elevada en el curso de la enfermedad vascular refleja la activación inmune *in situ* pero, además, recientes evidencias indican que tanto el endotelio, estimulado por la hiperglucemia, como el tejido adiposo puede producir esta CIT. En nuestro estudio se introdujeron sólo sujetos no diabéticos, por lo que las diferencias significativas existentes en los valores de glucemia entre ambos grupos no explicaría el aumento de la IL-6¹⁷.

Así mismo, se demuestra la existencia de un patrón de L/O, tanto en los pacientes con IAM como en los controles. Se ha objetivado en diversos estudios que la secreción y actividad de las CIT están bajo control neuroendocrino central, y en concreto en relación con la glándula pineal a través de la secreción L/O de la hormona melatonina¹⁸.

Por el contrario, la IL-1β no presentó cambios significativos con respecto al patrón lumínico, probablemente por 2 motivos: a) la IL-6 es una CIT con potentes propiedades proinflamatorias donde regula la expresión de moléculas de adhesión y de otras CIT, como la IL-1β¹⁹, donde la actuación de esta, por parte de la IL-6, presenta un desfase temporal, y b) la IL-6 induce la migración y diferenciación de los macrófagos activados, siendo éstos los principales productores de IL-1β²⁰.

La existencia de un ritmo circadiano en los pacientes con IAM implica que podrían estar, de alguna manera, asociados o desencadenados por ritmos fisiológicos que presentan un pico de actividad en un determinado momento del día o de la noche²¹. En la actualidad se acepta que la rotura de una placa aterosclerótica y el posterior fenómeno de trombosis constituyen el sustrato fisiopatológico de la mayoría de los IAM. Existen diversas características que parecen definir la vulnerabilidad de las placas, entre ellos los factores directamente relacionados con las características

físicas de las placas y su composición tisular, y factores sistémicos que promueven su rotura y facilitan la trombosis.

En un estudio realizado por Schieffer et al¹⁹ encontraron que la IL-6 se localizaba en la intersección del endotelio disfuncionante que recubre la placa con el endotelio sano adyacente, lugar donde es más frecuente la rotura de las placas. Mehta et al²² observaron que la inflamación de las placas ateroscleróticas puede estar desencadenada, mantenida e incrementada por múltiples factores, como linfocitos y macrófagos activados, incremento de IL-6, IL-1, interferón gamma y lipoproteína (a). En las fases tardías de la aterosclerosis, la liberación de enzimas hidrolíticas y de CIT contribuye a degradar el tapón fibroso de la placa aterosclerótica, lo cual contribuye a la rotura de la misma. La IL-6 es una CIT con potentes propiedades proinflamatorias que contribuye al desencadenamiento de los SCA, al potenciar la síntesis de metaloproteasas y la expresión de receptores de LDL en los macrófagos, así como un aumento de la captación de cLDL y la secreción de sustancias quimiotácticas, como la proteína 1 quimiotáctica de monocitos²³.

LIMITACIONES DEL ESTUDIO

Entre las limitaciones de nuestro estudio se cuenta el reducido tamaño de la muestra. Se trata de un estudio de diseño de casos y controles, donde las características basales del grupo de estudio son similares (muestra de conveniencia). Este hecho, en el que el grupo control y el de los casos sean similares en los factores de riesgo analizados para enfermedad arterial coronaria, hace difícil encontrar diferencias significativas en el factor de exposición analizado: la IL-6.

Reconocemos que no se pueden establecer conclusiones definitivas acerca de que el ritmo L/O de la IL-6 con aumento mayor durante la oscuridad en los pacientes sea un factor causal que provoque el IAM. Son necesarios más estudios que nos ayuden a aclarar los mecanismos que subyacen en la periodicidad de la presentación del infarto, lo que se refleja en la importancia que se puede dar a intervenciones farmacológicas para una mejor protección en momentos de mayor riesgo.

CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio demuestran la existencia de un ritmo L/O de la IL-6 en los controles y en pacientes con IAM, presentando estos últimos unas concentraciones más altas, secundarias a una respuesta fisiológica a la lesión tisular. El estudio de las variaciones L/O de las CIT proinflamatorias, aunque aún carece de relevancia clínica, abre las puertas a nuevas investigaciones en el campo sobre los ritmos biológicos en humanos.

AGRADECIMIENTO

Agradecemos al Laboratorio Pfizer la ayuda económica para la compra de los kits de IL.

BIBLIOGRAFÍA

1. Van der Wal AC, Becker AE, Van der Loos CM, Das PK. Site of intimal rupture or erosion of thrombosed coronary atherosclerotic plaques is characterized by an inflammatory process irrespective of the dominant plaque morphology. *Circulation* 1994;89:36-44.
2. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective from the 1990s. *Nature* 1993;362:801-9.
3. Miller MD, Krangel MS. Biology and biochemistry of the chemokines; a family of chemotactic and inflammatory cytokines. *Crit Rev Immunol* 1992;12:17-46.
4. García-Moll X, Kaski JC. Cardiopatía isquémica: marcadores de inflamación y riesgo cardiovascular. *Rev Esp Cardiol* 1999;52:990-1003.
5. Muller JE, Stone PH, Turi ZG, Rutherford JD, Czeisler CA, Parker C, et al. Circadian variation in the frequency of onset of acute myocardial infarction. The MILLIS Study Group. *N Engl J Med* 1985;313:1315-22.
6. Thompson DR, Blandford RL, Sutton TW, Marchant PR. Time of onset of chest pain in acute myocardial infarction. *Int J Cardiol* 1985;7:139-48.
7. Toftler GH, Brezinski D, Schafer AI, Czeisler CA, Rutherford JD, Willich SN, et al. Concurrent morning increase in platelet aggregability and the risk of myocardial infarction and sudden cardiac death. *N Engl J Med* 1987;316:1514-8.
8. Andreotti F, Davies GJ, Hackett DR, Khan MI, De Bart AC, Aber VR, et al. Major circadian fluctuations in fibrinolytic factors and possible relevance to time of onset of myocardial infarction, sudden cardiac death and stroke. *Am J Cardiol* 1988;62:635-7.
9. Stene N, Panagiotis N, Tuck ML, Sowers JR, Mayes D, Berg G. Plasma norepinephrine levels are influenced by sodium intake, glucocorticoid administration, and circadian changes in normal man. *J Clin Endocrinol Metab* 1980;51:1340-5.
10. Loscalzo J. The relation between atherosclerosis and thrombosis. *Circulation* 1992;86(Suppl 3):95-9.
11. Biasucci LM, Liuzzo G, Fantuzzi G, Caligiuri G, Rebuzzi AG, Gimmetti F, et al. Increasing levels of interleukin (IL)-1Ra and IL-6 during the first 2 days of hospitalization in unstable angina are associated with increased risk of in-hospital coronary events. *Circulation* 1999;99:2079-84.
12. Balbay Y, Tikiz H, Baptiste RJ, Ayaz S, Sasmaz H, Korkmaz S. Circulating interleukin-1 beta, interleukin-6, tumor necrosis factor-alpha, and soluble ICAM-1 in patients with chronic stable angina and myocardial infarction. *Angiology* 2001;52:109-14.
13. López-Sendón J, López de Sá E. Nuevos criterios de diagnóstico de infarto agudo de miocardio: orden en el caos. *Rev Esp Cardiol* 2001;54:669-74.
14. The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee. Myocardial infarction redefined: a consensus document of the joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for redefinition of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2000;36:959-69.
15. Le J, Vilcek J. Interleukin-6: a multifunctional cytokine regulating immune reactions and the acute phase protein response. *Lab Invest* 1989;61:588-602.
16. Ikeda U, Ito T, Shimada K. Interleukin-6 and Acute Coronary Syndrome. *Clin Cardiol* 2001;24:701-4.

17. McCarthy MF. Interleukin-6 as central mediator of cardiovascular risk associated with chronic inflammation, smoking, diabetes and visceral obesity: down-regulation with essential fatty acids, ethanol, and pentoxifylline. *Med Hypotheses* 1999;52:465-77.
18. Sothorn RB, Roitman-Johnson B, Kanabrocki EL, Yager JG, Roodel MM, Weatherbee JA, et al. Circadian characteristics of circulating IL-6 in men. *J Allergy Clin Immunol* 1995;95:1029-35.
19. Schieffer B, Schieffer E, Hilfiker-Kleiner D, Hilfiker A, Kovanen PT, Kaartinen M, et al. Expression of angiotensin II and interleukin 6 in human coronary atherosclerotic plaques: Potential implications for inflammation and plaque instability. *Circulation* 2000; 101:1372-8.
20. Giri JG, Lomedico PT, Mizel SB. Studies on the synthesis and secretion of interleukin-1. I. A 33,000 molecular weight precursor for interleukin-1. *J Immunol* 1985;134:343-9.
21. Hernandez-Fernandes E, Coelho D, Missel-Correa JR, Kumpinski D. Alteraciones circadianas del sistema cardiovascular. *Rev Esp Cardiol* 2000;53:117-22.
22. Mehta JL, Saldeen TGP, Rand K. Interactive role of infection, inflammation and traditional risk factors in atherosclerosis and coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 1998;31:1217-25.
23. Pérez-Fernández R, Kaski JC. Interleucina-10 y enfermedad coronaria. *Rev Esp Cardiol* 2002;55:738-50.

Light/dark patterns of interleukin-6 in relation to the pineal hormone melatonin in patients with acute myocardial infarction

Alberto Dominguez-Rodriguez^{a,*}, Pedro Abreu-Gonzalez^b, Martin Garcia^a, Julio Ferrer^a, Alejandro de la Rosa^a, Manuel Vargas^a, Russel J. Reiter^c

^aDepartment of Cardiology (Coronary Care Unit), Hospital Universitario de Canarias, Spain

^bDepartment of Physiology, University of La Laguna, School of Medicine, Spain

^cDepartment of Cellular and Structural Biology, University of Texas, USA

Received 10 November 2003; received in revised form 19 January 2004; accepted 23 January 2004

Abstract

Aims: Atherosclerosis is a chronic disease that, from its origin to its ultimate complications, involves inflammatory cells, inflammatory proteins, and inflammatory responses from vascular cells. It has been demonstrated that cytokine activities are under neuroendocrine control, in part exerted by the pineal gland through the circadian secretion of its main product melatonin. Melatonin is mainly released during the night, but the precise relationship between melatonin and the light/dark rhythm of interleukin-6 in patients with acute myocardial infarction is still unclear.

Methods and results: The study included 60 patients diagnosed with acute myocardial infarction and 60 healthy volunteers whose venous blood samples were collected at 09:00 h (light period) and 02:00 h (dark period). Our results demonstrate that interleukin-6 concentrations presented a light/dark pattern with mean serum concentrations being higher in the acute myocardial infarction group than in the control group (101.26 ± 13.43 and 52.67 ± 7.73 pg/ml at 02:00 h, 41.93 ± 5.90 and 22.98 ± 4.49 pg/ml at 09:00 h, respectively, $p < 0.05$). Differences in the day/night changes in melatonin levels in control subjects (48.19 ± 7.82 at 02:00 h, 14.51 ± 2.36 at 09:00 h, pg/ml) and acute myocardial infarction patients (25.97 ± 3.90 at 02:00 h, 12.29 ± 4.01 at 09:00 h, pg/ml) ($p < 0.05$) were a result of a reduced nocturnal elevation of melatonin in the acute myocardial infarction group.

Conclusions: The current findings suggest that the circadian secretion of melatonin may be responsible at least in part for light/dark variations of endogenous interleukin-6 production in patients with acute myocardial infarction. In this study, the melatonin seems to have an anti-inflammatory effect.

© 2004 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Anti-inflammatory; Interleukin; Light–dark; Melatonin; Myocardial infarction

1. Introduction

It has been shown in patients with diverse manifestations of coronary atherosclerosis that increased mononuclear leukocyte secretion of cytokines [1] stimulates the expression of adhesion molecules on vascular tissues. The cytokines constitute a family of hormone-like

substances that transmit information between the different cells of the immune system [2]. It has also been clearly documented that the onset of myocardial infarction often occurs in the early morning and numerous studies have tried to establish the cause for this circadian rhythm and its clinical and therapeutic implications [3,4]. Experimental studies have shown that both immune cell number and immune functions may vary during the 24-h circadian period. The biological effects of exogenous cytokine administration have been shown to change during the light/dark cycle [5,6].

Recent advances in psychoneuroimmunology have shown that cytokine secretion and activity are under

* Corresponding author. Coronary Care Unit, Hospital Universitario de Canarias, Crta. La Cuesta-Taco, E-38320 Ofra, La Laguna, Tenerife, Spain. Tel.: +34-922-679030; fax: +34-922-319368.

E-mail address: pabreu@ull.es (A. Dominguez-Rodriguez).

central neuroendocrine control [7], and in particular, that the pineal gland plays a fundamental role in the neuroendocrine regulation of immunity through the light/dark secretion of its main hormone melatonin [8,9]. Several human and animal studies have documented that under physiological conditions melatonin is mainly produced during the night, with blood levels being low during the light period of the day [10].

Preliminary studies have reported daily variations in blood concentrations of interleukin-1, -2, -6, -10 and tumor necrosis factor- α [11], as well as of other immune factors such as soluble interleukin-2 receptors [12]. Since melatonin plays an essential role in the chronomodulation of the biological system [8], it is possible that pineal activity is involved in influencing the circadian secretion of cytokines.

There are few published reports on patients with acute myocardial infarction concerning the possible relevance of melatonin in relation to the light/dark rhythm of interleukin-6. The aim of the present study was to investigate the light/dark rhythm of the pro-inflammatory cytokine, interleukin-6, in patients with acute myocardial infarction in relation to the light/dark patterns of the melatonin. We hypothesized that melatonin, a circadian rhythm regulator, cooperates in modulating the light/dark inflammatory variations in acute myocardial infarction.

2. Results

2.1. Baseline characteristics

Baseline characteristics of patients with acute myocardial infarction and control subjects are presented in Table 1. Established risk factors for coronary artery

Table 1
Baseline characteristics of acute myocardial infarction patients and control subjects

	AMI (n = 60)	Control subjects (n = 60)	<i>p</i>
Men/women, <i>n</i>	45/15	40/20	0.28
Age (years)	61.7 (2.6)	55.5 (2.8)	0.12
Risk factors			
Diabetes (%)	60	44	0.26
Hypertension (%)	14	22	0.22
Smoking (%)	50	38	0.37
Dyslipidemia (%)	51	36	0.21
Family history (%)	34	35	0.64
Biochemistry			
Cholesterol (mg/dl)	231.8 (6.2)	223.0 (14.6)	0.54
Triglycerides (mg/dl)	203.4 (12.2)	183.4 (25.1)	0.48
Glucose (mg/dl)	101.3 (3.1)	99.3 (5.7)	0.39
CK-MB (U/l)	327.5 (57)	23.3 (2.0)	<0.001*
Troponin I (ng/ml)	13.33 (2.0)	0.01 (0.003)	<0.001*

Data are mean (SEM) unless otherwise indicated. AMI corresponds to acute myocardial infarction. *Statistically significant ($p < 0.05$).

disease were similar in the two groups. Total cholesterol level, triglycerides and glucose did not differ significantly between the two groups. As expected, levels of creatine kinase MB and troponin I were significantly higher in acute myocardial infarction patients than in control subjects.

Mean serum light/dark levels of interleukin-6 in relation to those of melatonin are illustrated in Fig. 1. As expected, mean nocturnal concentrations of melatonin were significantly higher than those found during the light period of the day ($p < 0.001$) in control subjects. In the acute myocardial infarction subjects, melatonin maintained a diurnal variation but with a significantly smaller amplitude ($p < 0.02$). The mean nocturnal melatonin value of acute myocardial infarction patients was reduced compared to control ($p < 0.02$) (Fig. 1A).

Interleukin-6 mean concentration observed at 02:00 h was significantly higher than that found during the light phase ($p < 0.001$) in control subjects. In the acute myocardial infarction group, concentrations of interleukin-6 maintained diurnal variations but with a significantly higher amplitude ($p < 0.0001$). The nocturnal interleukin-6 level of control subjects was reduced compared to that of the acute myocardial infarction group ($p < 0.002$) (Fig. 1B).

3. Discussion

As reported in the literature [13,14], this study confirms that secretion of the pineal hormone melatonin increases during the dark period of the day. The pineal gland is a fundamental modulator of the neuroendocrine system. The pineal gland functions as a true "biological clock" secreting its main neurohormone melatonin in a circadian fashion. However, various physiopathologic states can affect the melatonin rhythm. We have recently found that acute myocardial infarction is associated with a nocturnal serum melatonin deficit [15]. It remains unknown, however, whether reduced endogenous melatonin level in patients with acute myocardial infarction is a cause, an effect or even related to the compromised cardiovascular function.

In recent years, multiple scientific studies have emphasized the role of the immunological system cells (monocytes, lymphocytes, etc.) and pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β , IL-6, INF- γ , etc.) in the development of atherosclerosis [16,17]. Interleukin-6 is a cytokine with potent pro-inflammatory properties that induces the expression of reactants in the acute phase and the migration and differentiation of the activated macrophages [18]. It also contributes to triggering acute coronary syndromes by enabling the synthesis of metalloproteinases and the expression of LDL receptors in the macrophages, as well as an increase in cLDL capture and the secretion of chemoattractant substances, such as

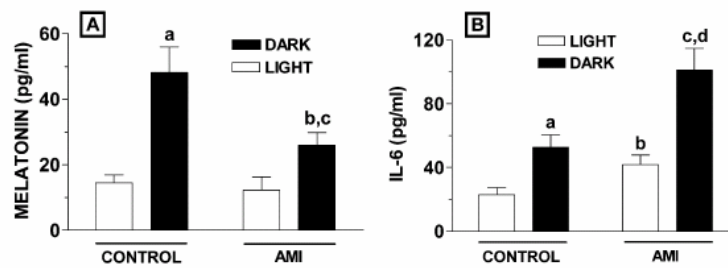


Fig. 1. Light/dark pattern of melatonin (A) and IL-6 (B) in human serum of patients with acute myocardial infarction (AMI) and controls. (A) General ANOVA $p < 0.0001$; (a) $p < 0.001$ vs control light; (b) $p < 0.02$ vs AMI light; (c) $p < 0.02$ vs control dark. (B) General ANOVA $p < 0.0001$; (a) $p < 0.001$ vs control light; (b) $p < 0.01$ vs control light; (c) $p < 0.0001$ vs AMI light; (d) $p < 0.002$ vs control dark. The values are represented as mean \pm SEM ($n = 60$).

MCP-1 [19]. Finally, it regulates the expression of adhesion molecules and cytokines, such as IL-1 β and TNF- α , which increase the inflammatory reaction [19].

The present findings may be comparable to those of a recent study by Dominguez-Rodriguez et al. [20], in which patients with acute myocardial infarction have a light/dark pattern of interleukin-6. Despite a clear association between the neuroendocrine and immune systems and the established circadian rhythmicity of the neuroendocrine system, the possibility that the immune system also fluctuates rhythmically has not been thoroughly studied in patients with acute myocardial infarction. Although melatonin has been reported several times to be pro-inflammatory [21–23], controversy persists in the literature, where anti-inflammatory properties have also been attributed to melatonin [24,25].

Although the rhythm of IL-6 seems to be controlled principally by the melatonin secretion of the pineal gland, this hormone is also synthesized by immunocompetent cells that are not associated with the nyctohemeral production. Carrillo-Vico et al. demonstrated that melatonin counteracts the inhibitory effect of PGE₂ on secretion of IL-2 production. This effect is through an mt1 membrane receptor in human lymphocytes. In this study the melatonin had a behaviour of a pro-inflammatory molecule, increasing the IL-2 production [26].

The results of our study show that the nocturnal melatonin deficit in patients with acute myocardial infarction can, at least partially, contribute to the increase in nocturnal interleukin-6, thereby possibly causing inflammation of the atherosclerotic plaques and favoring the triggering of acute coronary syndrome. An important occurrence in patients with acute myocardial infarction is the recruitment of activated leukocytes to the injured tissue [27]. Once at their target, these cells generate inflammatory mediators, e.g., leukotriene B₄, platelet-activating factor and others, and also lead to the activation of oxidant-sensitive nuclear transcription factors, in particular nuclear factor kappa B (NF- κ B).

These agents, combined with the generation of free radicals by the leukocytes, induce inflammatory mediators from endothelial cells and/or mast cells which cause the mobilization of adhesion molecules (selectins and ICAM). As a consequence, leukocytes adhere to the endothelium which leads to a cascade of events that contribute to cardiac damage [28].

It has also been found that synthesis of pro-inflammatory cytokines is largely mediated by the nuclear transcription factor NF- κ B. This is associated to protein encoding genes that are essential for inflammatory processes related to atherosclerotic plaque rupture [18]. This factor is activated by different stimuli such as cytokines, modified LDL and oxidative stress [29].

One possible explanation for the association between melatonin and interleukin-6 in acute myocardial infarction patients could be the ability of melatonin to reduce the expression of adhesion molecules P-selectin and ICAM [30] and inhibition of activation of the nuclear transcription NF- κ B [31,32]; these changes could result in a reduced synthesis of pro-inflammatory interleukins, adhesion molecules, growth and chemotactic factors of cells of the immune system thereby limiting the local inflammatory response in the atherosclerotic plaque.

In this study, the distribution of proatherogenic and pro-inflammatory risk factors was similar in patients with acute myocardial infarction and in healthy control subjects, making it improbable that a difference in the prevalence of these factors accounts for the differential expression of melatonin and interleukin-6. Of clinical significance is the question whether the observed large day–night variations in endogenous cytokine production and bioactivity of interleukin-6 could influence clinical decisions and the effectiveness of therapies in patients with acute myocardial infarction.

In conclusion, the present study demonstrates that the circadian secretion of melatonin could be responsible at least in part for light/dark variations in interleukin-6

endogenous production in patients with acute myocardial infarction. The action of melatonin on interleukin-6 suggests that indole has anti-inflammatory properties. Our findings highlight an intriguing relationship between melatonin and interleukin-6 in patients with acute myocardial infarction that merits further investigation.

4. Materials and methods

4.1. Study population

In the present study, the sample consisted of 60 consecutive patients with acute myocardial infarction and 60 healthy subjects who served as controls. All selected patients and healthy volunteers were given a full explanation of the study and they agreed to participate. The study was approved by the local ethics committee on human research (University of La Laguna).

Criteria used to diagnose acute myocardial infarction were as follows [33]: typical rise and gradual fall (troponin) or more rapid rise and fall (creatin kinase MB) of biochemical markers of myocardial necrosis with at least one of the following: (a) ischemic symptoms (b) development of pathological Q waves on the electrocardiograph, (c) electrocardiograph changes indicative of ischemia (ST segment elevation or depression), or (d) coronary artery intervention (e.g., coronary angioplasty). The control group was composed of 60 age- and sex-matched healthy volunteers who had been recruited by the physicians at our institution.

Exclusion criteria for the two groups were as follows: all nonspecific and specific infections, all autoimmune diseases, all collagen tissue diseases, malignant diseases, drug addiction, radiotherapy, acute or chronic renal or liver diseases, immunosuppressive treatment, patients taking sedatives, antiepileptic drugs, tricyclic antidepressants or any medication known to influence melatonin metabolism, psychiatric sleeping disorders, endocrine illness (e.g., diabetes mellitus), shift workers, and subjects with jet-lag syndrome.

4.2. Study protocol

Subjects were studied under carefully controlled conditions in the coronary care unit. The light/dark period in the coronary unit was 14 h (1745 ± 33 lx):10 h (1.33 ± 0.3 lx); lights on at 07:00 h. The blood samples for interleukin-6 and melatonin were collected at 09:00 h (light period) and 02:00 h (dark period). When blood samples were collected at night in the dark, the subjects were sleeping and the nurse used a small torch with a dim red light (intensity < 100 lx) taking care not to shine it directly on the patient's face. Serum samples were aliquoted into several tubes and stored at -80 °C until analysis.

4.3. Clinical assays

Interleukin-6 and melatonin levels in serum samples were measured by an enzyme-immunoassay kit (DRG International, city, Germany). All other biochemistry measurements were carried out by the analytical unit of the biochemistry department of our institution using standard methods.

4.4. Statistical analysis

Data were analyzed by the SPSS software package 10.0.1 for PC (Analytical Software, Chicago, IL, USA). All quantitative variables are expressed as mean ± SEM and the categorical variables as percentages. The normality of continuous variables was tested using the Kolmogorov–Smirnov test. Light–dark changes in melatonin and interleukin-6 were analyzed by a general ANOVA and unpaired *t*-tests were used to compare continuous variables. Categorical variables were compared using the χ^2 test. A statistical significance level of $p < 0.05$ was chosen.

Acknowledgements

The authors wish to express their special thanks to the nursing staff of the Coronary Care Unit of Hospital Universitario of Canarias for their assistance in the blood sample collection. Without their support this study would not have been possible. They also thank PFIZER Co., for the financial support for IL-10 and melatonin kits for serum samples analysis, and Yolanda Zahorik (technical assistance) and Ines Abreu-Afonso (idiomatic area) for their help in preparing the manuscript.

References

- [1] Vaddi K, Nicolini FA, Mehta P. Increased tumor necrosis factor- α and interferon- γ secretion by mononuclear leukocytes in ischemic heart disease. *J Am Coll Cardiol* 1992;19:240A.
- [2] Nilsson J. Cytokines and smooth muscle cells in atherosclerosis. *Cardiovasc Res* 1993;27:1184–90.
- [3] Muller JE, Stone PH, Turi ZG, Rutherford JD, Czeisler CA, Parker C, et al. Circadian variation in the frequency of onset of acute myocardial infarction. The MILLIS Study Group. *N Engl J Med* 1985;313:1315–22.
- [4] Thompson DR, Blandford RL, Sutton TW, Marchant PR. Time of onset of chest pain in acute myocardial infarction. *Int J Cardiol* 1985;7:139–48.
- [5] Abo T, Kawate K, Itoh K, Kumagai K. Studies on the bioperiodicity of the immune response. Circadian rhythms of human T, B and K cell traffic in the peripheral blood. *J Immunol* 1981;126:1360–6.
- [6] Levi FA, Canon C, Toutou Y, Sulon J, Mechakouri M, Ponsart ED, et al. Circadian rhythms in circulating T lymphocyte subtypes and plasma testosterone, total and free cortisol in five healthy men. *Clin Exp Immunol* 1988;71:329–35.

- [7] Jankovic BD. Neuroimmunomodulation. From phenomenology to molecular evidence. *Ann N Y Acad Sci* 1994;741:1–38.
- [8] Maestroni GJM, Conti A, Pierpaoli W. Pineal melatonin, its fundamental immunoregulatory role in aging and cancer. *Ann N Y Acad Sci* 1988;521:140–8.
- [9] Guerrero JM, Reiter RJ. Melatonin-immune system relationship. *Curr Top Med Chem* 2002;2:167–79.
- [10] Arendt J. Melatonin. *Clin Endocrinol* 1998;29:205–29.
- [11] Sothorn RB, Roitman-Johnson B, Kanabrocki EL, Yager JG, Roodel MM, Weatherbee JA, et al. Circadian characteristics of circulating IL-6 in men. *J Allergy Clin Immunol* 1995;95:1029–35.
- [12] Lemmer B, Schwulera U, Thrun A, Lissner R. Circadian rhythm of soluble interleukin-2 receptor in healthy individuals. *Eur Cytokine Netw* 1992;3:335–6.
- [13] Reiter RJ. Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocr Rev* 1991;12:151–80.
- [14] Brzezinski A. Melatonin in humans. *N Engl J Med* 1997;336:186–95.
- [15] Dominguez-Rodriguez A, Abreu-Gonzalez P, Garcia MJ, Sanchez J, Marrero F, de Armas-Trujillo D. Decreased nocturnal melatonin levels during acute myocardial infarction. *J Pineal Res* 2002;33:248–52.
- [16] Seino Y, Ikeda U, Ikeda M, Yamamoto K, Misawa Y, Hasegawa T, et al. Interleukin-6 gene transcripts are expressed in human atherosclerotic lesions. *Cytokine* 1994;6:87–91.
- [17] Ancy C, Corby P, Froger J, Delwail A, Wijdenes J, Gascan H, et al. Secretion of IL-6, IL-11 and LIF by human cardiomyocytes in primary culture. *Cytokine* 2002;18:199–205.
- [18] Perez-Fernandez R, Kaski JC. Interleucina-10 y enfermedad coronaria. *Rev Esp Cardiol* 2002;55:738–50.
- [19] Schieffer B, Schieffer E, Hilfiker-Kleiner D, Hilfiker A, Kovanen PT, Kaartinen M, et al. Expression of angiotensin II and interleukin-6 in human coronary atherosclerotic plaques. Potential implications for inflammation and plaque instability. *Circulation* 2000;101:1372–8.
- [20] Dominguez-Rodriguez A, Abreu-Gonzalez P, Garcia MJ, de la Rosa A, Vargas M, Marrero F. Ritmo luz/oscuridad de las citocinas proinflamatorias en el infarto agudo de miocardio. *Rev Esp Cardiol* 2003;56:555–60.
- [21] Garcia-Maurino S, Gonzalez-Haba MG, Calvo JR, Rafii-El-Idrissi M, Sánchez-Margalet V, Goberna R, et al. Melatonin enhances IL-2, IL-6, and INF- γ production by human circulating CD4⁺ cells: a possible nuclear receptor-mediated mechanism involving T helper type 1 lymphocytes and monocytes. *J Immunol* 1997;159:574–81.
- [22] Garcia-Maurino S, Pozo D, Carrillo-Vico A, Calvo JR, Guerrero JM. Melatonin activates Th1 lymphocytes by increasing IL-12 production. *Life Sci* 1999;65:2143–50.
- [23] Sutherland ER, Martin RJ, Ellison MC, Kraft M. Immunomodulatory effects of melatonin in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;166:1055–61.
- [24] Cuzzocrea S, Tan DX, Costantino G, Mazzon E, Caputi AP, Reiter RJ. The protective role of endogenous melatonin in carrageenan-induced pleurisy in the rat. *FASEB J* 1999;13:1930–8.
- [25] Lissoni P, Rovelli F, Meregalli S, Fumagalli L, Musco F, Brivio F, et al. Melatonin as a new possible anti-inflammatory agent. *J Biol Regul Homeost Agents* 1997;11:157–9.
- [26] Carrillo-Vico A, Garcia-Maurino S, Calvo JR, Guerrero JM. Melatonin counteracts the inhibitory effect of PGE₂ on IL-2 production in human lymphocytes via its mTl membrane receptor. *FASEB J* 2003;17:755–7.
- [27] Granger DN. I/R injury: role of leukocyte-endothelial adhesion. *News Physiol Sci* 1997;12:142–3.
- [28] Reiter RJ, Tan DX. Melatonin: a novel protective agent against oxidative injury of the ischemic/reperfused heart. *Cardiovasc Res* 2003;58:10–9.
- [29] Barnes PJ, Karin M. Nuclear factor- κ B. A pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med* 1997;336:1066–71.
- [30] Cuzzocrea S, Mazzon E, Serriano I, Lepore V, Terranova ML, Ciccolo A, et al. Melatonin reduces dinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis. *J Pineal Res* 2001;30:1–12.
- [31] Lezovak'h F, Szaropani M, Behl C. *N*-acetyl-serotonin (normelatonin) and melatonin protect neurons against oxidative challenges and suppresses the activity of the transcription factor NF Kappa B activation. *FASEB J* 1998;12:685–93.
- [32] Reiter RJ, Calvo JR, Karbownik M, Qi W, Tan DX. Melatonin and its relation to the immune system and inflammation. *Ann N Y Acad Sci* 2000;917:376–86.
- [33] López-Sendón J, López de Sá E. Nuevos criterios de diagnóstico de infarto agudo de miocardio: orden en el caos. *Rev Esp Cardiol* 2001;54:669–74.



Circulating pregnancy-associated plasma protein A is not an early marker of acute myocardial infarction

Alberto Dominguez-Rodriguez^{a,*}, Pedro Abreu-Gonzalez^b, Martín Garcia-Gonzalez^a, Julio Ferrer^a, Manuel Vargas^a

^aDepartment of Cardiology, Coronary Care Unit, Hospital Universitario de Canarias, Ofrá s/n La Cuesta E-38320, Tenerife, Spain

^bDepartment of Physiology, University of La Laguna, School of Medicine, Spain

Received 13 May 2004; received in revised form 6 October 2004; accepted 13 October 2004

Available online 8 December 2004

Abstract

Objective: The purpose of this study was to assess whether serum levels of pregnancy-associated plasma protein A (PAPP-A) are elevated early in patients with acute myocardial infarction (AMI).

Design and methods: We measured serum levels of PAPP-A in 80 patients with AMI and in 80 age-matched healthy control subjects. The mean (\pm SEM) time from onset of symptoms to blood sampling was 6.3 ± 2.8 h in the group with AMI.

Results: The PAPP-A levels did not differ between the control group and the AMI group (1.24 ± 0.07 vs. 1.29 ± 0.02 mIU/l; $P = 0.54$).

Conclusions: Measurement of serum PAPP-A does not seem to be a useful early marker for AMI.

© 2004 The Canadian Society of Clinical Chemists. All rights reserved.

Keywords: Acute myocardial infarction; PAPP-A; Acute coronary syndromes; ELISA

Introduction

It is well established that atherosclerosis is a chronic inflammatory disease of the arterial wall characterized by progressive accumulation of lipids, macrophages, T-lymphocytes, mast cells, smooth muscle cells, and extracellular matrix. Inflammation plays a crucial role in the vulnerability of an atherosclerotic plaque to rupture, which is a major pathophysiological event in the development of acute myocardial infarction (AMI) and unstable angina [1]. Biochemical markers of myocardial damage have been vital in the assessment and management of patients with acute coronary syndrome (ACS) [2].

Pregnancy-associated plasma protein A (PAPP-A) is a 200-kDa metalloproteinase belonging to the metzincin superfamily of zinc peptidases [3]. In addition to placenta, PAPP-A is evidently expressed, albeit at much lower levels,

in a wide variety of reproductive and nonreproductive organs, including endometrium, testis, kidney, and colon, and in a variety of actively proliferating adult and fetal tissues [4].

Elevated serum levels of PAPP-A have been reported in patients with ACS [5,6], and the determination of its circulating levels proposed as a novel cardiac biomarker. The aim of the present study was to investigate whether serum levels of PAPP-A are elevated early in patients with AMI.

Materials and methods

Patient population

We studied 80 consecutive patients with ST-segment elevation myocardial infarction (MI) admitted to our institution and 80 healthy controls without MI. All subjects gave written, informed consent as approved by our local ethical committee.

* Corresponding author. Fax: +34 922 319368.

E-mail address: adrdvg@hotmail.com (A. Dominguez-Rodriguez).

Table 1
Baseline characteristics of AMI patients and control subjects

	AMI (n = 80)	Control subjects (n = 80)	P*
Men/women, n	45/35	42/38	NS
Age, years	59 ± 13	55 ± 15	NS
Risk factors			
Diabetes, n (%)	29 (58)	21 (43)	NS
Hypertension, n (%)	8 (12)	9 (20)	NS
Smoking, n (%)	26 (48)	20 (38)	NS
Dyslipidemia, n (%)	21 (48)	19 (35)	NS
Biochemistry			
Cholesterol, mmol/L	5.97 ± 0.119	5.77 ± 0.377	NS
Triglycerides, mmol/L	2.30 ± 0.120	2.06 ± 0.295	NS
Glucose, mmol/L	5.62 ± 0.078	5.46 ± 0.372	NS

Data correspond to numbers (percent), mean ± SEM. AMI corresponds to acute myocardial infarction. NS means not significant.

* Statistically significant ($P < 0.05$).

Exclusion criteria were advanced kidney or liver failure, overt heart failure, and a history of major surgery or trauma within the previous month. Patients with known or suspected systemic thrombotic disorders (other than those of coronary origin) or inflammatory disease were excluded, as were those who were pregnant.

Laboratory analysis

Blood samples were obtained on the time of admission to the coronary care unit, before administration of any medications. Samples were placed on ice, centrifuged within 30 min at $2000 \times g$ for 10 min to produce serum, and stored in aliquots at -80°C until analysis. All samples were analyzed by personnel who had no knowledge of the subjects' clinical data. The mean (\pm SEM) time from onset of symptoms to blood sampling was 6.3 ± 2.8 h in the group with AMI. In control subjects, the blood samples were collected at the time of admission to hospital. PAPP-A serum levels were measured using a high-sensitivity quantitative enzyme immunoassay (DRG Co., Germany). This kit uses a microplate with wells coated with a polyclonal anti PAPP-A antibody. The coefficients of variation intra-assay and inter-assay were 3.5% and 5.5%, respectively. The detection limit of this PAPP-A ELISA assay was 0.418 mIU/l. All other biochemistry measurements were carried out by the analytical unit of the biochemistry department of our institution using standard methods.

Statistical analysis

Data were analyzed by the SPSS software package 10.0.1 for PC (Analytical Software, Chicago, IL, USA). All quantitative variables are expressed as mean \pm SEM and the categorical variables as percentages. Normality was tested using the Kolmogorov–Smirnov test. An unpaired t test was used to compare the continuous variables between

AMI and controls. Categorical data were analyzed using the χ^2 test. Associations of PAPP-A levels with risk of AMI were assessed using multiple logistic regression. A P value < 0.05 was considered to be statistically significant.

Results

Baseline characteristics of patients with AMI and control subjects are presented in Table 1. Established risk factors for coronary artery disease were similar in the two groups. Neither of these had a history of myocardial infarction or previous coronary interventions. Fig. 1 shows that the PAPP-A levels did not differ between the control group and the AMI group (Fig. 1A). As expected, levels of creatine kinase MB (Fig. 1B) and troponin I (Fig. 1C) were higher in AMI patients than in control subjects.

The age-adjusted logistic regression model for both men (odds ratio, 1.00; 95% CI, 0.92–1.09) and women (odds ratio, 1.00; 95% CI, 0.90–1.11) showed no association

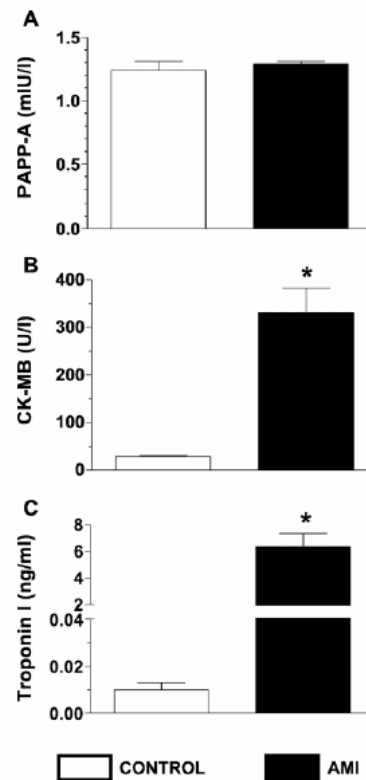


Fig. 1. Serum levels of (A) pregnancy-associated plasma protein (PAPP-A), (B) creatine kinase MB (CK-MB), and (C) troponin I. The bars are represented as mean \pm SEM. AMI corresponds to acute myocardial infarction. * $P < 0.001$ vs. control subjects.

between PAPP-A levels with the risk of AMI. Adjustment for age, serum total cholesterol, blood pressure, and smoking did not alter the relative risks. In our study, the troponin I levels ($r = 0.04$, $P = 0.82$) and creatine kinase MB ($r = 0.06$, $P = 0.78$) were not associated to PAPP-A levels.

Discussion

In this study, we found that PAPP-A may not be an ideal early marker for AMI. There was no correlation between PAPP-A and CK-MB or the troponin-I levels when the corresponding values for all samples were compared.

Previous studies have shown the circulating concentrations of PAPP-A to be significantly increased in patients with ACS. Bayes-Genis et al. [5] identified significantly higher levels of PAPP-A in patients with unstable angina and AMI relative to the levels found in stable angina and in control subjects. At a cut-off value of 10 mIU/l, PAPP-A was shown to detect patients with ACS with a sensitivity of 89.2% and a specificity of 81.3%, suggesting that PAPP-A is a valuable marker for the identification of patients with ACS. On the other hand, the same authors showed that troponin I levels ($r = 0.07$) and creatine kinase MB ($r = 0.1$) were not associated with PAPP-A levels. In contrast, our study showed no significant difference between the AMI (1.29 ± 0.02 mIU/l) and control (1.24 ± 0.07 mIU/l) groups ($P = 0.54$).

Our analytical data for the ELISA kit used to measure serum PAPP-A provided similar results in sensitivity compared to earlier studies that used different analytical methods [7]. It is noteworthy that the normal reference interval for the PAPP-A kit used in this study was lower than that reported by Bayes-Genis et al. [5]. They used an assay configured with a polyclonal antibody for capture and combination of monoclonal antibodies for detection. In our assay kit, the sensitivity of 0.418 mIU/l should be sufficient to analyze all the serum samples with no apparent issue with assay sensitivity.

Khosravi et al. [6] demonstrated a significant association between the levels of PAPP-A and troponin T. The authors concluded that PAPP-A, like troponin T, might also be produced in response to myocardial damage. However, to our knowledge, the study was limited in terms of clinical information, particularly in relation to sampling time relative to patient presentation.

The present findings may be comparable to those of a recent study by Qin et al. [8] demonstrating that PAPP-A is an additional marker for ACS, but it does not seem to be a useful early marker for AMI. In their study, significantly increased PAPP-A levels were observed in 10 of 15 cases with ACS (14 patients with AMI and 1 patient with unstable

angina). Furthermore, this study [8] found that the release pattern levels in the AMI appear as late 30 h after the onset of chest pain. In our work, the absence of a significant association could be because the blood samples for PAPP-A determination that were obtained relatively early, 6.3 ± 2.8 h from onset of symptoms. Recently, Lund et al. [9] demonstrated that PAPP-A levels predict outcome in ACS patients having no elevation in troponin I.

In summary, our results show that circulating PAPP-A levels do not seem to be a useful early marker for AMI. Properly designed prospective studies should be performed to investigate the association between circulating PAPP-A levels and AMI.

Acknowledgments

The authors wish to express their gratitude to Sanofi-Synthelabo Co. for their financial support of the PAPP-A kits to carry out serum samples analysis. Besides, we thank to Ines Abreu-Afonso for the linguistic aid in preparing the manuscript.

References

- [1] Falk E, Shah PK, Fuster V. Coronary plaque disruption. *Circulation* 1995;92:657–71.
- [2] Christenson RH, Azzazy HME. Biochemical markers of the acute coronary syndromes. *Clin Chem* 1998;44:1855–64.
- [3] Oxvig C, Sand O, Kristensen T, Gleich CJ, Sottrup-Jensen L. Circulating human pregnancy-associated plasma protein-A is disulfide-bridge to proform of eosinophil major basic protein. *J Biol Chem* 1993;268:12243–6.
- [4] Overgaard MT, Oxvig C, Christiansen M, et al. Messenger ribonucleic acid levels of pregnancy-associated plasma protein-A and the proform of eosinophil major basic protein: expression in human reproductive and nonreproductive tissues. *Biol Reprod* 1999;61:1083–9.
- [5] Bayes-Genis A, Conover CA, Overgaard MT, et al. Pregnancy-associated plasma protein-A as marker of acute coronary syndrome. *N Engl J Med* 2001;345:1022–9.
- [6] Khosravi J, Diamandi A, Krishna RG, Bodani U, Mistry J, Khaja N. Pregnancy-associated plasma protein-A: ultrasensitive immunoassay and determination in coronary heart disease. *Clin Biochem* 2002;35:531–8.
- [7] Qin QP, Christiansen M, Oxvig C, et al. Double-monoclonal immunofluorometric assays for pregnancy-associated plasma protein A/pro-eosinophil major basic protein (PAPP-A/proMBP) complex in first-trimester maternal serum screening for Down syndrome. *Clin Chem* 1997;43:2323–32.
- [8] Qin QP, Laitinen P, Majamaa-Voltti K, Eriksson S, Kumpulainen EK, Pettersson K. Release patterns of pregnancy-associated plasma protein A (PAPP-A) in patients with acute coronary syndromes. *Scand Cardiovasc J* 2002;36:358–61.
- [9] Lund J, Qin QP, Ilva T, et al. Circulating pregnancy-associated plasma protein A predicts outcome in patients with acute coronary syndrome but no troponin I elevation. *Circulation* 2003;108:1924–6.

Elevated levels of oxidized low-density lipoprotein and impaired nocturnal synthesis of melatonin in patients with myocardial infarction

A. Dominguez-Rodriguez^{a,*}, P. Abreu-Gonzalez^b, M. Garcia-Gonzalez^a,
J. Ferrer-Hita^a, M. Vargas^a, R.J. Reiter^c

^a Department of Cardiology, Hospital Universitario de Canarias, Crta. La Cuesta-Taco, 38320 Ofra, La Laguna, Tenerife, Spain

^b Department of Physiology, University of La Laguna, School of Medicine, La Laguna, 38320, Tenerife, Spain

^c Department of Cellular and Structural Biology, University of Texas Health Science Center at San Antonio, TX, USA

Received 24 June 2004; received in revised form 5 August 2004; accepted 4 November 2004
Available online 19 December 2004

Abstract

This study was designed to investigate the relationship between nocturnal serum melatonin (MEL) levels and oxidized low-density lipoprotein (OxLDL) in patients with acute coronary syndrome (ACS). OxLDL plays a pivotal role in the development of atherosclerosis. Patients with coronary heart disease have an impaired nocturnal secretion of MEL. To date, there are no clinical human studies concerning the relationship of MEL to low-density lipoprotein (LDL) oxidation in patients with acute myocardial infarction (AMI). The study population contained 60 patients with AMI and 60 control subjects. Levels of circulating OxLDL were measured by a monoclonal antibody 4E6-based competition ELISA. Levels of circulating MEL were measured by an enzyme-immunoassay kit after chloroform extraction. Comparison of levels between AMI and controls, adjusted for age, revealed significantly higher nocturnal serum OxLDL levels (95.47 ± 6.81 versus 68.35 ± 4.07 U/l; $p = 0.004$) in the AMI subjects. Nocturnal serum levels of MEL were lower in AMI than the control group (20.97 ± 3.90 versus 53.19 ± 7.80 pg/ml; $p = 0.009$). Serum levels of total, high-density lipoprotein (HDL), and LDL cholesterol did not differ between the groups. Multiple regression analysis was performed on cases to study the association between AMI and serum levels of OxLDL and MEL (OR: 2.93; 95% CI, 2.89–2.98, $p = 0.01$ and OR: 0.94; 95% CI, 0.89–0.97, $p = 0.02$, respectively). This study demonstrates for the first time an independent association between nocturnal levels of OxLDL and MEL in patients with AMI. Additional population studies are necessary to further document these.

© 2004 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: Oxidized LDL; Melatonin; Oxygen radicals; Myocardial infarction; Ischemia

1. Introduction

Oxidized low-density lipoprotein (OxLDL) is a critical factor in the initiation and progression of atherosclerosis and contributes to endothelial dysfunction and plaque destabi-

lization through multiple mechanisms [1]. Human studies have confirmed that OxLDL and oxidized lipid by products are present within atherosclerotic plaques [2]. Low-density lipoprotein (LDL) particles which accumulate in the plasma infiltrate the intimal space of the arteries and are oxidized by oxygen free radicals. During the initial step of LDL oxidation, lipid peroxidation is induced by oxygen free radicals which attack polyunsaturated fatty acids, molecules that are easily oxidized. This reaction results in the formation of lipid radicals. Lipid radicals generate conjugated dienes, intermediate lipid peroxidation products, and eventually resulting in the formation of peroxy radicals, which are sufficiently reactive to propagate the chain reaction of lipid peroxidation. As

* Corresponding author. Present address: Coronary Care Unit of Hospital Universitario de Canarias, Crta. La Cuesta-Taco, 38320 Ofra, La Laguna, Tenerife, Spain. Tel.: +34 922 679030; fax: +34 922 362716.

E-mail addresses: adrvdg@hotmail.com (A. Dominguez-Rodriguez), pabreu@ull.es (P. Abreu-Gonzalez), MJGG181262@hotmail.com (M. Garcia-Gonzalez), juliojferre@hotmail.com (J. Ferrer-Hita), manuel040972@hotmail.com (M. Vargas), reiter@uthscsa.edu (R.J. Reiter).

a result of, lipid peroxidation several non-radical products are formed, including malondialdehyde and other reactive aldehydes [3].

Melatonin (MEL) (*N*-acetyl-5-methoxytryptamine) is the main product of the pineal gland; this indole is synthesized from serotonin in a rhythmic manner [4]. In young healthy humans, serum MEL levels are low during the day and high during the night [5]. Several recent publications present evidence that MEL, a newly discovered antioxidant, has marked protective actions against cardiac damage induced by free radicals [6]. In previous studies, it was reported that patients with coronary heart disease have an impaired nocturnal secretion of MEL [7–9]. MEL is a powerful scavenger of oxygen free radicals, quenching both the hydroxyl radical [10] and perhaps less efficiently the peroxy radical [11,12]. MEL also has been suggested to play a protective role in both initial and advanced stages of diseases whose pathogenesis involves oxygen free radical-induced damage [13]. According to Pieri et al. [14] and Kelly and Loo [15], MEL inhibits oxidative LDL modification. Furthermore, Seegar et al. [16] demonstrated that, although MEL itself seems to have little anti-atherogenic activity during LDL oxidation, its precursors and breakdown products inhibit LDL oxidation at a level comparable to Vitamin E.

Acute cardiovascular events are known to exhibit a circadian pattern of onset with two peak, one occurring in the morning hours and the other during the night hours. This night-time peak has been assumed to be related to physiological quiescence during sleep [17]. The role of OxLDL and MEL in the acute coronary syndrome (ACS), has not been fully established. The main purpose of this study was to investigate the relationship between nocturnal MEL and OxLDL in patients with acute myocardial infarction (AMI).

2. Methods

2.1. Study subject

The study groups consisted of 60 patients with AMI, and 60 age-matched control subjects who were healthy volunteers free of symptomatic atherosclerosis. All subjects gave written, informed consent to be included in the present study, which was approved by our local ethical committee. AMI was defined by the following criteria [18]: typical rise and gradual fall (troponin) or more rapid rise and fall (creatin kinase MB) of biochemical markers of myocardial necrosis with at least one of the following: (a) ischemic symptoms; (b) development of pathological Q waves on the electrocardiograph; (c) electrocardiograph changes indicative of ischemia (ST segment elevation or depression); or (d) coronary artery intervention (e.g. coronary angioplasty).

Exclusion criteria for the two groups were: all nonspecific and specific infections, all autoimmune diseases, all collagen tissue diseases, malignant diseases, drug addiction, radiotherapy, acute or chronic renal or liver diseases, immunosuppres-

sive treatment, patients taking sedatives, antiepileptic drugs, tricyclic antidepressants or any medication known to influence melatonin metabolism, psychiatric sleeping disorders, endocrine illness (e.g. diabetes mellitus), shift workers, and subjects with jet-lag syndrome.

2.2. Study protocol

Subjects were studied under carefully controlled conditions in the coronary care unit. The blood samples for OxLDL and MEL were collected at 03:00 h (dark period). When blood samples were collected at night in the dark, the subjects were sleeping and the nurse used a small torch with a dim red light (intensity <35 lx) taking care not to shine it directly on the patient's face. Serum samples were aliquoted into several tubes and stored at -80°C until analysis.

2.3. Determination of OxLDL and MEL levels

OxLDL in serum has been measured using a ELISA kit (DRG Instruments GmbH, Marburg, Germany). This ELISA kit uses a specific murine monoclonal antibody, mAb-4E6 m [19]. In this assay, the lowest detection limit was <1 U/l. The coefficients of variation (CV), were 6.3% to intra-assay and 4.73% to inter-assay.

MEL levels in serum samples were measured using an enzyme-immunoassay kit after the samples had been extracted with chloroform (DRG Instruments GmbH, Marburg, Germany). In this ELISA assay, the lowest detection limit of MEL was 3.0 pg/ml. The coefficients of variation (CV) were 7.53 and 11.3% for intra-assay and inter-assay variability, respectively.

2.4. Statistical analysis

Data were analyzed by the SPSS software package 10.0.1 for PC (Analytical Software, Chicago, IL, USA). All quantitative variables are expressed as mean \pm S.E.M. and the categorical variables as percentages. Normality was tested using the Kolmogorov–Smirnov test. An unpaired *t*-test was used to compare the continuous variables between AMI and controls. Categorical data were analyzed using the χ^2 -test. Multiple regression analysis was performed to evaluate the association between AMI (independent variable) and OxLDL or MEL (response) after controlling for age, sex, LDL cholesterol, and HDL cholesterol. A *p*-value <0.05 was considered to be statistically significant.

3. Results

3.1. Patient characteristics

The clinical characteristics of the study group are presented in the Table 1. Established risk factors for coronary artery disease were similar in the two groups. Neither group

Table 1
Baseline characteristics of AMI patients and control subjects

	AMI (n = 60)	Control subjects (n = 60)	p-Value*
Men/women, n	35/25	32/28	NS
Age, y	60 ± 13	57 ± 15	NS
Risk factors			
Diabetes	20	13	NS
Hypertension	50	38	NS
Smoking	38	33	NS
Hypercholesterolemia	50	43	NS
Biochemistry			
Total cholesterol (mg/dl)	201 ± 9	195 ± 8	NS
LDL cholesterol (mg/dl)	120 ± 8	114 ± 7	NS
HDL cholesterol (mg/dl)	51 ± 3	54 ± 2	NS
Triglycerides (mg/dl)	155 ± 18	136 ± 16	NS
Troponin I (ng/dl)	9 ± 2	0.01 ± 0.003	<0.001*

Data are presented as the mean value ± S.E.M. or percent of subjects. AMI: acute myocardial infarction; NS: not significant; p: level of significance.

* Statistically significant ($p < 0.05$).

Table 2
Multiple regression analysis of association between AMI and serum levels of OxLDL or MEL

	OR	95% CI	P
OxLDL	2.93	2.89–2.98	0.01
MEL	0.94	0.89–0.97	0.02

Analysis included 60 patients with AMI, the values were obtained after correction for age, sex, LDL cholesterol, and HDL cholesterol. OR: odds ratio; CI: confidence interval; p: level of significance; MEL: melatonin; OxLDL: oxidized low-density lipoprotein.

had a history of myocardial infarction or previous coronary interventions (coronary artery bypass graft or percutaneous transluminal coronary angioplasty). The type of AMI was anterior infarction in 28 patients, inferior infarction in 22 and posterior infarction in 10.

There were no differences in age, sex, or serum levels of total cholesterol, HDL cholesterol, or LDL cholesterol or triglyceride between patients with AMI and control subjects. As was expected, levels of troponin I were significantly higher in AMI patients than in control subjects.

3.2. Nocturnal OxLDL and MEL levels

Serum OxLDL concentrations were significantly higher in the AMI group compared with control subjects (95.47 ± 6.81 versus 68.35 ± 4.07 U/l; $p = 0.004$). Serum levels of MEL were lower in AMI patients than in the control group (20.97 ± 3.90 versus 53.19 ± 7.80 pg/ml; $p = 0.009$) (Fig. 1).

Table 2 shows the results of the multiple regression analysis, performed to evaluate the adjusted odds ratios of AMI and serum levels for OxLDL and MEL.

4. Discussion

In the present study, we demonstrate, for the first time, the novel observation of an association between nocturnal serum

levels of OxLDL and MEL in patients with AMI. Several previous studies showed that OxLDL levels were significantly higher in patients with ACS such as AMI and unstable angina, indicating that OxLDL might be a marker for atherosclerosis [20,21]. Recent studies have analyzed circulating OxLDL levels using different antibodies and assay procedures and they have shown an association with coronary artery disease [22]. Ehara et al. [23] found that circulating OxLDL-DLH3 levels, as measured on isolated LDL rather than plasma, reflected the presence of immunochemically detected OxLDL in coronary atherectomy specimens. They also appeared to differentiate, to some extent, the severity of the underlying clinical presentation. Other studies [24] using antibodies to measure “fully oxidized” LDL, such as malondialdehyde-LDL and Cu-OxLDL, showed that OxLDL measured in the emergency room setting, in conjunction with troponin measurements, is a strong predictor of the presence of ACS. Our

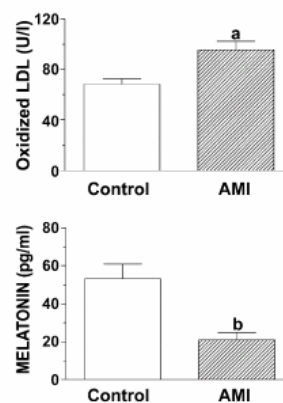


Fig. 1. Nocturnal serum levels of OxLDL and MEL in patients with AMI. Bars represent the mean ± S.E.M. (a) $p < 0.004$ and (b) $p < 0.009$ vs. control group. AMI: acute myocardial infarction; MEL: melatonin; OxLDL: oxidized low-density lipoprotein.

results document that serum levels of OxLDL are significantly higher in patients with AMI than in control subjects. In the current study, the concentration of OxLDL in serum was measured by a sandwich ELISA procedure using the murine monoclonal antibody, mAb-4E6 as the capture antibody bound to microtitration wells, and a peroxidase conjugated anti-apolipoprotein B antibody recognizing OxLDL bound to the solid phase. Therefore, our results coincide with those obtained by Holvoet et al. [25] using the same monoclonal antibody to determine OxLDL [19,20].

Several studies have reported that humans with cardiovascular diseases have noticeably lower circulating MEL levels [26,27] than do age-matched subjects without significant cardiovascular deterioration. Similarly, patients suffering with cardiac syndrome X have an attenuated nocturnal peak in serum MEL levels relative to those of age-matched individuals with no cardiac pathology [28]. Recently, we demonstrated that AMI is associated with a nocturnal serum MEL deficit [29]. It remains unknown, however, whether reduced endogenous MEL levels in patients with AMI is a cause, an effect or even related to the compromised cardiovascular function.

The initiation of LDL peroxidation is intimately linked to the concentrations of various antioxidants including Vitamin E, lycopene, retinoids, and carotenoids [30,31]. MEL has been shown to reduce plasma levels of total cholesterol and of the very low-density lipoprotein-cholesterol plus the LDL-cholesterol subfraction in hypercholesterolemic rats [32,33]. MEL is also a strong free radical scavenger and is significantly more efficient in scavenging hydroxyl radicals than is the intracellular antioxidants glutathione [34]. In addition, MEL may be capable of scavenging peroxy radicals [11]. Furthermore, MEL also scavenges highly toxic peroxy nitrite anions, which are reaction products of superoxide and nitric oxide and induce oxidative damage [35]. Moreover, MEL may inhibit LDL oxidation by scavenging lipid alkoxyl radicals [36].

Interestingly, the present study shows an association between OxLDL and MEL in patients with AMI. Oxidative modification of lipoproteins is widely accepted as a key event in the genesis of atherosclerosis [37]. Lipid peroxidation of LDL may be initiated by any primary free radical (hydroxyl radicals, peroxy radicals) with sufficient reactivity to abstract an allylic hydrogen atom from a reactive methylene group of polyunsaturated fatty acid side-chains [38]. The formation of the dienyl radical is followed by bond rearrangement which results in stabilization by conjugated diene formation and after oxygen uptake, the formation of the peroxy radical. Propagation reactions follow leading to the formation of lipid hydroperoxides [38]. On this basis, of a large amount of data, we hypothesize that MEL protective actions in the heart under conditions of high oxidative stress are magnified by its multiple antioxidative actions. For example, MEL directly neutralizes and indirectly detoxifies oxygen and nitrogen-based reactant, MEL may also act at the level of the mitochondrial respiratory chain to reduce elec-

tron leakage and free radical generation [39]. The ability of the MEL to reduce electron leakage is inferred from its stimulatory action on the activities of complex I and complex IV, its promotion of ATP production, and its action in reducing oxidative damage to mitochondrial DNA [40,41].

In conclusion, this study demonstrates, for the first time, an association between nocturnal elevated serum levels of OxLDL and lowered circulating MEL levels in patients with AMI. Our results suggest that physiological levels of melatonin in the circulating blood, during the night time, may be required, along with other physiological antioxidants to maintaining the total cellular oxidative status as low as possible. Therefore MEL, more than determinant molecule, to contributes, at least in part, to the decrease of concentration of circulating OxLDL. Since these findings may have clinical importance, additional studies in this field should be of high priority.

Acknowledgements

The authors wish to express their gratitude to PFIZER Co., for their financial support for the OxLDL and MEL kits to carry out serum samples analysis. Besides, we thank Ines Abreu-Afonso for the linguistic aids in preparing the manuscript.

References

- [1] Landmesser U, Harrison DG. Oxidant stress as a marker for cardiovascular events: Ox marks the spot. *Circulation* 2001;104:2638–40.
- [2] Witztum JL, Steinberg D. The oxidative modification hypothesis of atherosclerosis: does it hold for humans? *Trends Cardiovasc Med* 2001;11:93–102.
- [3] Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL. Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med* 1989;320:915–24.
- [4] Reiter RJ. Pineal melatonin. Cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocr Rev* 1991;12:151–80.
- [5] Zaidan R, Geoffriau M, Brun J. Melatonin able to influence its secretion in humans: description of a phase-response curve. *Neuroendocrinology* 1994;60:105–12.
- [6] Reiter RJ, Tan DX. Melatonin: a novel protective agent against oxidative injury of the ischemic/reperfused heart. *Cardiovasc Res* 2003;58:10–9.
- [7] Brugger P, Marktl W, Herold M. Impaired nocturnal secretion of melatonin in coronary artery disease. *Lancet* 1995;345:1408.
- [8] Sakotnik A, Liebmann PM, Stoschitzky K, et al. Decreased melatonin synthesis in patients with coronary artery disease. *Eur Heart J* 1999;20:1314–7.
- [9] Marktl W, Brugger P, Herold M. Melatonin and coronary heart disease. *Wien Klin Wochenschr* 1997;109:747–9.
- [10] Tan DX, Chen LD, Poeggeler B, Manchester LC, Reiter RJ. Melatonin: a potent, endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocr J* 1993;1:57–60.
- [11] Pieri C, Marra M, Moroni F, Recchioni R, Marcheselli F. Melatonin: a peroxy radical scavenger more effective than Vitamin E. *Life Sci* 1994;55:PL271–6.
- [12] Allegra M, Reiter RJ, Tan DX, et al. The chemistry of melatonin's interaction with reactive species. *J Pineal Res* 2003;34:1–10.

- [13] Reiter RJ, Tan DX, Poeggeler B, et al. Melatonin as a free radical scavenger: implications for aging and age-related diseases. *Ann NY Acad Sci* 1994;719:1–12.
- [14] Pieri C, Marra M, Gaspar R, Damjanovich S. Melatonin protects LDL from oxidation but does not prevent the apolipoprotein derivatization. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;222:256–60.
- [15] Kelly MR, Loo G. Melatonin inhibits oxidative modification of human low-density lipoprotein. *J Pineal Res* 1997;22:203–9.
- [16] Seegar H, Mueck AO, Lippert TH. Effect of melatonin and metabolites on copper-mediated oxidation of low density lipoprotein. *Br J Clin Pharmacol* 1997;44:283–4.
- [17] Cohen MC, Rothla KM, Lavery CL, Muller JE, Mittleman MA. Meta-analysis of the morning excess of acute myocardial infarction and sudden cardiac death. *Am J Cardiol* 1997;79:1512–6.
- [18] Myocardial infarction redefined—a consensus document of The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the redefinition of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2000;36:959–69.
- [19] Weinbrenner T, Cladellas M, Isabel Covas M, et al. High oxidative stress in patients with stable coronary heart disease. *Atherosclerosis* 2003;168:99–106.
- [20] Holvoet P, Vanhaecke J, Janssens S, Van de Werf F, Collen D. Oxidized LDL and malondialdehyde-modified LDL in patients with acute coronary syndromes and stable coronary artery disease. *Circulation* 1998;15:1487–94.
- [21] Steinberg D. Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *J Biol Chem* 1997;272:20963–6.
- [22] Tsimikas S, Witztum JL. Measuring circulating oxidized low-density lipoprotein to evaluate coronary risk. *Circulation* 2001;103:1930–2.
- [23] Ehara S, Ueda M, Naruko T, et al. Elevated levels of oxidized low density lipoprotein show a positive relationship with severity of acute coronary syndromes. *Circulation* 2001;103:1955–60.
- [24] Holvoet P, Collen D, van de Werf F. Malondialdehyde-modified LDL as marker of acute coronary syndromes. *JAMA* 1999;281:1718–21.
- [25] Holvoet P, Mertens A, Verhamme P, et al. Circulating oxidized LDL is a useful marker for identifying patients with coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:844–8.
- [26] Yaprak M, Altun A, Vardar A, et al. Decreased nocturnal synthesis of melatonin in patients with coronary artery disease. *Int J Cardiol* 2003;89:103–7.
- [27] Girotti L, Lago M, Ianovsky O, et al. Low urinary 6-sulphatoxymelatonin levels in patients with coronary artery disease. *J Pineal Res* 2000;29:138–42.
- [28] Altun A, Yaprak M, Aktöz M, et al. Impaired nocturnal synthesis of melatonin in patients with cardiac syndrome X. *Neurosci Lett* 2002;327:143–5.
- [29] Dominguez-Rodriguez A, Abreu-Gonzalez P, Garcia MJ, et al. Decreased nocturnal melatonin levels during acute myocardial infarction. *J Pineal Res* 2002;33:248–52.
- [30] Esterbauer H, Striegl G, Puhl H, et al. The role of Vitamin E and carotenoids in preventing oxidation of low density lipoproteins. *Ann NY Acad Sci* 1989;570:254–67.
- [31] Babiy AV, Gebicki JM, Sullivan DR. Vitamin E content and low density lipoprotein oxidizability induced by free radicals. *Atherosclerosis* 1990;81:175–82.
- [32] Chan TY, Tang PL. Effect of melatonin on the maintenance of cholesterol homeostasis in the rat. *Endocr Res* 1995;21:681–96.
- [33] Muller-Wieland D, Behnke B, Koopmann K, Krone W. Melatonin inhibits LDL receptor activity and cholesterol synthesis in freshly isolated human mononuclear leukocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;203:416–21.
- [34] Stasica P, Ulanski P, Rosiak JM. Melatonin as a hydroxyl radical scavenger. *J Pineal Res* 1998;25:65–6.
- [35] Cuzzocrea S, Zingarelli B, Gilad E, et al. Protective effect of melatonin in carrageenan-induced models of local inflammation: relationship to its inhibitory effect on nitric oxide production and its peroxynitrite scavenging activity. *J Pineal Res* 1997;23:106–16.
- [36] Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, Jurgens G. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic Biol Med* 1992;13:341–90.
- [37] Holvoet P, Collen D. Oxidized lipoproteins in atherosclerosis and thrombosis. *FASEB J* 1994;8:1279–84.
- [38] Bonnefont-Rousselot D, Cheve G, Gozto A, et al. Melatonin related compounds inhibit lipid peroxidation during copper or free radical-induced LDL oxidation. *J Pineal Res* 2002;33:109–17.
- [39] Reiter RJ, Tan DX, Manchester LC, El-Sawi MR. Melatonin reduces oxidant damage and promotes mitochondrial respiration: implications for aging. *Ann NY Acad Sci* 2002;959:238–50.
- [40] Acuña-Castroviejo D, Martin M, Macias M, et al. Melatonin, mitochondria and cellular bioenergetics. *J Pineal Res* 2001;30:65–74.
- [41] Leon J, Acuña-Castroviejo D, Sainz RM, et al. Melatonin and mitochondrial function. *Life Sci* 2004;75:765–90.

Relation of Nocturnal Melatonin Levels to C-Reactive Protein Concentration in Patients With ST-Segment Elevation Myocardial Infarction

Alberto Dominguez-Rodriguez, MD, PhD^{a,*}, Martín Garcia-Gonzalez, MD^a, Pedro Abreu-Gonzalez, PhD^b, Julio Ferrer, MD^a, and Juan Carlos Kaski, MD, DM, DSc^c

C-reactive protein, a marker of inflammation, is increasingly measured to stratify risk for coronary artery disease and guide clinical management. Likewise, a relation has been suggested between decreased nocturnal melatonin levels and coronary artery disease. However, little is known about the association between melatonin and C-reactive protein in patients with ischemic heart disease. © 2006 Elsevier Inc. All rights reserved. (Am J Cardiol 2006;97:10–12)

The aim of the present study was to characterize the diurnal variation of serum C-reactive protein (CRP) in patients who develop ST-segment elevation myocardial infarction (STEMI) in response to a melatonin light/dark pattern and to assess whether melatonin, a circadian rhythm regulator, modulates nocturnal inflammatory changes in patients who have STEMI.

• • •

We studied 70 consecutive patients with STEMI who were admitted to the coronary care unit of our institution. The clinical diagnosis of STEMI was made according to criteria of the European Society of Cardiology/American College of Cardiology.¹ Patients who had infections or autoimmune diseases and malignancies were not included in this study. Similarly, the use of illicit drugs, immunosuppressants, sedatives, antiepileptic drugs, tricyclic antidepressants, and any medications that influence melatonin metabolism was considered an exclusion criterion. Subjects with diabetes mellitus, psychiatric conditions, sleeping disorders, or who were receiving radiotherapy were not included. Shift workers and subjects who had jet-lag syndrome were also excluded. We also recruited 70 age- and gender-matched healthy normal subjects during the same period as the patients who had myocardial infarction. Subjects were not taking any regular medications and had no clinical evidence of vascular, metabolic, neoplastic, or inflammatory disease by a careful history, physical examination, and routine laboratory tests. All subjects gave written informed consent before study entry, and the study was approved by the local research ethics committee.

Each subject was studied under strictly controlled light/dark conditions. The coronary care unit of Hospital Universitario de Canarias (Tenerife, Spain) has 12 independent

bedrooms. Each room is isolated from external light and noise. The ambient conditions imitate the normal light/dark cycle. The light period in the coronary unit was 14 hours ($1,745 \pm 33$ lux) and the dark period was 10 hours (1.33 ± 0.3 lux); lights were turned on at 7:00 A.M. Light intensity was measured on subjects' faces. Blood samples for measurement of CRP and melatonin were collected at 9:00 A.M. (light period) and 2:00 A.M. (dark period). Nocturnal blood sampling was carried out by a trained nurse, with the help of a minute torch with a dim red light (intensity <30 lux) to avoid directing any light to patients' faces while they slept. Serum samples were aliquoted into several tubes and stored at -80°C until analysis. Melatonin levels in serum samples were measured with an enzyme-linked immunosorbent assay kit after the samples had been extracted with chloroform (DRG Instruments GmbH, Marburg, Germany). In this enzyme-linked immunosorbent assay, the lowest detection limit of melatonin was 3.0 pg/ml. Coefficients of variation were 7.53% and 11.3% for intra- and interassay variabilities, respectively. Concentrations of serum CRP were measured by an ultrasensitive enzyme-linked immunosorbent assay kit (DRG Instruments GmbH). In this enzyme-linked immunosorbent assay, the lowest detection limit of CRP was 0.010 mg/L. Coefficients of variation were 5.12% and 11.6% for intra- and interassay variabilities, respectively.

All quantitative variables are expressed as mean \pm SD and categorical variables as percentages. Normality was tested with the Kolmogorov-Smirnov test. The unpaired *t* test was used to compare continuous variables between patients with STEMI and control subjects. Categorical data were analyzed with the chi-square test. A *p* value <0.05 was considered statistically significant. SPSS 10.0 (SPSS, Inc., Chicago, Illinois) was used for all calculations.

Subjects' baseline characteristics are listed in Table 1. Established risk factors for coronary artery disease were similar in the 2 groups. There were no differences in age, gender, or serum levels of total cholesterol and triglycerides between patients who had STEMI and control subjects. No patient with STEMI had peripheral artery vascular disease or aortic aneurysm. Mean serum light/dark levels of CRP in relation to those of melatonin are shown in Figure 1. As

The ^aDepartment of Cardiology (Coronary Care Unit), Hospital Universitario de Canarias, and the ^bDepartment of Physiology, University of La Laguna, School of Medicine, Tenerife, Spain; and the ^cDepartment of Cardiological Sciences, St. George's Hospital Medical School, London, United Kingdom. Manuscript received March 3, 2005; revised manuscript received and accepted July 18, 2005.

* Corresponding author: Tel: 34-922-679-030; fax: 34-922-362-716.

E-mail address: adrvdg@hotmail.com (A. Dominguez-Rodriguez).

Table 1
Baseline characteristics of patients with ST-segment elevation myocardial infarction and control subjects

Variables	Patients With STEMI (n = 70)	Control (n = 70)	p Value
Men/women	40/30	37/33	0.76
Age (yrs)	64 ± 9	63 ± 10	0.36
Hypertension	33 (48%)	25 (36%)	0.29
Smoker	19 (27%)	14 (20%)	0.23
Dyslipidemia	35 (50%)	26 (38%)	0.08
Total cholesterol mmol/L	5.2 ± 0.8	5.1 ± 0.9	0.27
mg/dl	204 ± 32	198 ± 38	
Triglycerides mmol/L	1.8 ± 0.2	1.7 ± 0.2	0.23
mg/dl	157 ± 25	152 ± 23	

expected, mean nocturnal concentrations of melatonin (Figure 1) in control subjects were significantly higher than those found during the day (58.1 ± 7.9 vs 19.5 ± 2.5 pg/ml, $p < 0.001$). In patients with STEMI, melatonin concentrations maintained a diurnal variation but the difference between nocturnal and diurnal levels was smaller than those in controls (35.9 ± 4.1 vs 17.2 ± 4.2 pg/ml, $p < 0.02$). Mean nocturnal melatonin concentration was lower in patients with STEMI than in controls (35.9 ± 4.1 vs 58.1 ± 7.9 pg/ml, $p < 0.02$). In contrast to melatonin, serum CRP concentrations (Figure 1) showed no diurnal variations in control subjects. CRP concentration was significantly higher in the patients who had STEMI than in control subjects (light: 5.5 ± 0.7 vs 0.4 ± 0.1 mg/L, $p < 0.001$; dark: 3.7 ± 0.6 vs 0.4 ± 0.1 mg/L, $p < 0.001$). In the STEMI group, CRP serum concentration at 9:00 A.M. (light period) was significantly higher than that in the dark phase (5.5 ± 0.7 vs 3.7 ± 0.6 mg/L, $p < 0.03$).

• • •

We found that circadian changes of melatonin may be responsible, at least in part, for light/dark variations of endogenous CRP production in patients who have STEMI. Melatonin (N-acetyl-5-methoxytryptamine), a key regulator of circadian rhythm homeostasis in humans, is the principal hormone that is produced by the pineal gland.² The immune system and inflammatory responses are affected by circulating melatonin levels.³ We recently found that acute myocardial infarction is associated with a decrease in nocturnal production of melatonin, and it has been speculated that this is a consequence of melatonin superoxide radical scavenger activity.⁴

The present findings are similar to those of previous reports and suggest that nocturnal secretion of melatonin is much lower in patients who have coronary artery disease than in healthy patients.⁵ In healthy subjects, it has been demonstrated that some circulating acute-phase reactant proteins, but not CRP, are influenced by different light intensities during the daytime.⁶ Our results with respect to serum CRP in control subjects are similar to those of Meier-Ewert et al⁷ in relation to an absence of diurnal variation.

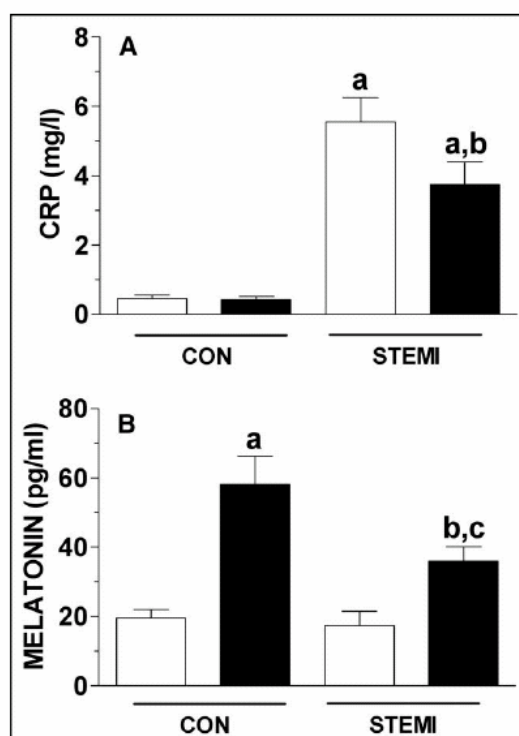


Figure 1. Light (white bars)/dark (black bars) pattern of (A) CRP (general analysis of variance $p < 0.0001$; $^a p < 0.001$ vs control light and dark; $^b p < 0.03$ vs STEMI light) and (B) melatonin (general analysis of variance $p < 0.0001$; $^a p < 0.001$ vs control light; $^b p < 0.02$ vs STEMI light; $^c p < 0.02$ vs control dark) in sera of control subjects (CON) and patients with STEMI. Values are means \pm SD ($n = 70$).

However, our data with respect to patients who had STEMI are the first in relation to CRP and melatonin. Plasma CRP is produced by hepatocytes, predominantly under transcriptional control by the cytokine interleukin-6. De novo hepatic synthesis starts very rapidly in response to the appropriate stimulus (i.e., myocardial ischemia), with serum concentrations increasing to >5 mg/L by about 6 hours.⁸ Recently, we demonstrated that circadian secretion of melatonin may be responsible for light/dark variations in the production of interleukin-6 in patients with acute myocardial infarction.⁹ On these bases, we hypothesize that the association between melatonin and CRP found in this study may be that lower nocturnal melatonin levels modulate interleukin-6 levels.

The main limitation of this study was not including repetitive diurnal and nocturnal samplings of CRP and melatonin in healthy subjects and patients. Nevertheless, our results suggest that the light/dark variations in CRP endogenous production in patients who have STEMI might be associated, at least in part, with circadian secretion of melatonin.

1. Van de Werf F, Ardissino D, Betriu A, Cokkinos DV, Falk E, Fox KA, Julian D, Lengyel M, Neumann FJ, Ruzyllo W, et al. Task Force on the Management of Acute Myocardial Infarction of the European Society of Cardiology. Management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation. The Task Force on the Management of Acute Myocardial Infarction of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J* 2003;24:28–66.
2. Reiter RJ. Pineal melatonin. Cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocr Rev* 1991;12:151–180.
3. Reiter RJ, Calvo JC, Karbounik M, Qi W, Tan DX. Melatonin and its relation to the immune system and inflammation. *Ann NY Acad Sci* 2000;917:376–386.
4. Dominguez-Rodriguez A, Abreu-Gonzalez P, Garcia MJ, Sánchez J, Marrero F, de Armas-Trujillo D. Decreased nocturnal melatonin levels during acute myocardial infarction. *J Pineal Res* 2002;33:248–252.
5. Reiter RJ, Tan DX. Melatonin: a novel protective agent against oxidative injury of the ischemic/reperfused heart. *Cardiovasc Res* 2003;58:10–19.
6. Kanikowska D, Hirata Y, Hyun K, Tokura H. Acute phase proteins, body temperature and urinary melatonin under the influence of bright and dim light intensities during the daytime. *J Physiol Anthropol* 2001;20:333–338.
7. Meier-Ewert HK, Ridker PM, Rifai N, Price N, Dinges DF, Mullington JM. Absence of diurnal variation of C-reactive protein concentrations in healthy human subjects. *Clin Chem* 2001;47:426–430.
8. Pepys MB, Hirschfield GM. C-reactive protein: a critical update. *J Clin Invest* 2003;111:1805–1812.
9. Dominguez-Rodriguez A, Abreu-Gonzalez P, Garcia M, Ferrer J, de la Rosa A, Vargas M, Reiter RJ. Light/dark patterns of interleukin-6 in relation to the pineal hormone melatonin in patients with acute myocardial infarction. *Cytokine* 2004;26:89–93.

Role of endogenous interleukin-10 production and lipid peroxidation in patients with acute myocardial infarction treated with primary percutaneous transluminal coronary angioplasty interleukin-10 and primary angioplasty

Alberto Dominguez-Rodriguez^{a,*}, Pedro Abreu-Gonzalez^b, Alejandro de la Rosa^a,
Manuel Vargas^a, Julio Ferrer^a, Martín Garcia^a

^a Department of Cardiology (Coronary Care Unit), Hospital Universitario de Canarias, Ofra s/n La Cuesta, La Laguna E-38320 Tenerife, Spain

^b Department of Physiology, University of La Laguna, School of Medicine, Spain

Received 18 September 2003; accepted 24 December 2003
Available online 1 April 2004

Abstract

Background: Currently available evidence suggests a potentially protective role for interleukin (IL)-10 in atherosclerosis. Reactive oxygen species, such as superoxide anion, hydrogen peroxide, peroxynitrite, and hydroxyl radical, seem to play a pivotal role in the pathogenesis of ischemia-reperfusion injury. The aim of this study was to assess whether a rise in lipid peroxidation (LPx), as malondialdehyde (MDA) and 4-hydroxyalkenal (4-HNE), during acute myocardial infarction (AMI) is associated with serum concentrations of IL-10. **Methods:** A total of 50 patients diagnosed with AMI and 50 control subjects were studied. Primary angioplasty was performed in the 50 patients with an indication for reperfusion. Serum IL-10 and LPx (MDA + 4-HNE) concentrations were measured using commercially available enzyme-immunoassays. The venous blood samples were taken 90 ± 35 min after having obtained a TIMI III flow in patients with AMI. In control subjects, blood samples were taken at the time of admission to hospital. **Results:** IL-10 concentrations were higher in patients with AMI compared with control subjects (32.45 ± 2.17 vs. 22.10 ± 2.40 pg/ml; $P=0.03$). Serum LPx concentrations were higher in the AMI group (22.20 ± 3.63 vs. 11.90 ± 1.26 μM; $P=0.01$). IL-10 levels in patients with AMI were significantly correlated with the concentrations of LPx (Pearson's $r=0.49$, $P=0.02$). **Conclusions:** Our results provide evidence that (1) IL-10 is increased in a human model of myocardial ischemia-reperfusion and (2) reperfusion injury and elevated IL-10 levels are related in patients with AMI treated with primary percutaneous transluminal coronary angioplasty.

© 2004 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: Interleukin-10; Myocardial infarction; Angioplasty; Reperfusion; Free radicals

1. Introduction

Several studies have shown that IL-10 is released into plasma during human myocardial ischemia-reperfusion injury and during cardiopulmonary bypass [1–4]. IL-10 is produced by activated lymphocytes, monocytes and mast cells, and has been shown to be a major inhibitor of both proinflammatory cytokine synthesis and macrophage activity [5]. IL-10 expression has been identified within human atherosclerotic plaques, with high levels of expression being

associated with significantly reduced cell death and iNOS expression [6,7]. Therefore, IL-10 plays an important role by limiting the local inflammatory response, protecting against excessive cell death in the plaque and, as a consequence, promoting its stability.

Myocardial ischemia occurs when oxygen delivery to the myocardium is insufficient to satisfy mitochondrial oxidation. During ischemia, there is insufficient oxygen availability but oxygen free radicals are still formed from the residual molecular oxygen [8]. Also, the activities of the mitochondrial electron-transport chain are reduced increasing electron leakage from the respiratory chain, which reacts with residual molecular oxygen and forms, among other free radicals, the superoxide anion. The reperfusion re-energises

* Corresponding author. Tel.: +34-922-679030; fax: +34-922-319368.
E-mail address: adrvdg@hotmail.com (A. Dominguez-Rodriguez).

the mitochondria but electron egress through cytochrome oxidase is reduced due to a lack of adenosine diphosphate, forming oxygen free radicals [9]. Early reperfusion is a prerequisite for reducing infarct size and some potentially adverse effects have clearly been associated with ischemia/reperfusion injury. These include: arrhythmia, myocardial stunning, death of potentially viable cardiomyocytes, progressive vascular damage and acceleration of heart muscle necrosis in healthy injured tissue [10].

Oxygen-derived free radicals play a major part in tissue damage [11]. They attack cell membrane lipids causing LPx and cell membrane damage. An example of this mechanism has been observed in AMI [12]. There is both direct and indirect evidence for a pathogenic role of oxygen-derived free radicals [13]. LPx can be quantified indirectly by measuring MDA+4-HNE, a minor product of peroxidation.

This study was, therefore, designed to investigate a possible relationship between the serum anti-inflammatory cytokine IL-10 in patients with AMI treated with primary percutaneous transluminal coronary angioplasty and serum concentration of MDA+4-HNE, as an indirect index of LPx.

2. Methods

2.1. Subjects

In the present study, the sample consisted of 50 consecutive patients with AMI and 50 healthy subjects who served as controls. The ethics committee of our institution approved the study, and all patients and healthy volunteers selected gave informed consent before being recruited. Exclusion criteria for both groups were as follows: all nonspecific and specific infections, all autoimmune diseases, all collagen tissue diseases, malignant diseases, drug addiction, radiotherapy, acute or chronic renal or liver diseases, immunosuppressive treatment and chemotherapy.

2.2. Patients

The study included 50 patients diagnosed with myocardial infarction in whom primary angioplasty was performed. Primary angioplasty corresponded to angioplasty without prior administration of thrombolysis in patients with Class I criteria for this intervention according to the operational guidelines for AMI of the ACC/AHA [14,15]. The time of onset of symptoms/opening of coronary artery-TIMI III flow was 5.3 ± 1.8 h.

2.3. Control group

The control group was composed of 50 age- and sex-matched healthy volunteers who had been recruited by the physicians at our institution.

2.4. Laboratory analysis

The venous blood samples were taken 96–135 min after having obtained a TIMI III flow in patients with AMI. In control subjects the blood samples were taken at the time of admission to hospital. Serum samples were aliquoted into several tubes and stored at -80 °C until analysis. Serum IL-10 concentrations were measured using a high-sensitivity, quantitative sandwich enzyme immunoassay (DRG Instruments, Germany). Serum LPx, as MDA+4-HNE, was measured spectrophotometrically at an absorbance of 586 nm in accordance with the manufacturer kit instructions (Calbiochem, San Diego, CA, USA). All other biochemistry measurements were carried out by the analytical unit of the biochemistry department of our institution using standard methods.

2.5. Statistical analysis

Data were analyzed by the SPSS software package 10.0.1 for PC (Analytical Software, Chicago, IL, USA). All quantitative variables are expressed as mean \pm S.E.M. and the categorical variables as percentages. Normality was tested using the Kolmogorov–Smirnov test. An unpaired *t* test was used to compare the continuous variables between AMI and controls. Categorical data were analyzed using the χ^2 test. The correlations between serum IL-10 concentrations and MDA+4-HNE were examined with Pearson's correlation. A *p* value < 0.05 was considered to be statistically significant.

3. Results

3.1. Baseline characteristics

Baseline characteristics of patients with AMI and control subjects are presented in Table 1. Established risk

Table 1
Baseline characteristics of AMI patients and control subjects

	AMI (<i>n</i> = 50)	Control subjects (<i>n</i> = 50)	<i>P</i>
Men/women, <i>n</i>	40/10	35/15	0.26
Age (years)	59.7 ± 2.5	53.5 ± 2.7	0.10
Risk factors			
Diabetes, <i>n</i> (%)	29 (58)	19 (42)	0.24
Hypertension, <i>n</i> (%)	6 (12)	9 (20)	0.20
Smoking, <i>n</i> (%)	24 (48)	16 (36)	0.35
Dyslipidemia, <i>n</i> (%)	22 (49)	17 (34)	0.19
Family history, <i>n</i> (%)	16 (32)	15 (33)	0.62
Biochemistry			
Cholesterol (mg/dl)	226.8 ± 4.2	219.0 ± 11.6	0.52
Triglycerides (mg/dl)	199.4 ± 10.2	178.4 ± 22.1	0.46
Glucose (mg/dl)	97.3 ± 1.1	94.3 ± 2.7	0.37
CK-MB (u/L)	322.5 ± 54	21.3 ± 2.0	$< 0.001^*$
Troponine I (ng/ml)	8.33 ± 1.0	0.01 ± 0.003	$< 0.001^*$

Data are mean \pm S.E.M. unless otherwise indicated. AMI corresponds to acute myocardial infarction.

* Statistically significant ($P < 0.05$).

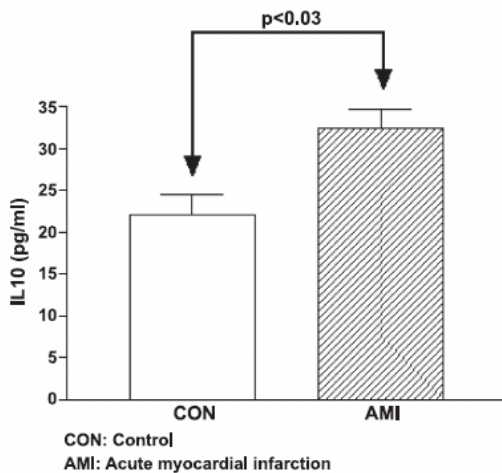


Fig. 1. Serum levels of IL-10 in patients with AMI treated with primary angioplasty respect to control (CON) group. The bars represent the mean ± S.E.M.

factors for coronary artery disease were similar in the two groups. Neither of these had a history of myocardial infarction or previous coronary interventions (coronary artery bypass graft or percutaneous transluminal coronary angioplasty). The type of AMI was anterior infarction in 22 patients, inferior infarction in 19 and posterior infarction in 9. All patients of the AMI group had a final flow TIMI III. Total cholesterol level, triglycerides and glucose did not differ significantly between the two groups. As expected, levels of creatine kinase MB and troponin I were significantly higher in AMI patients than in control subjects.

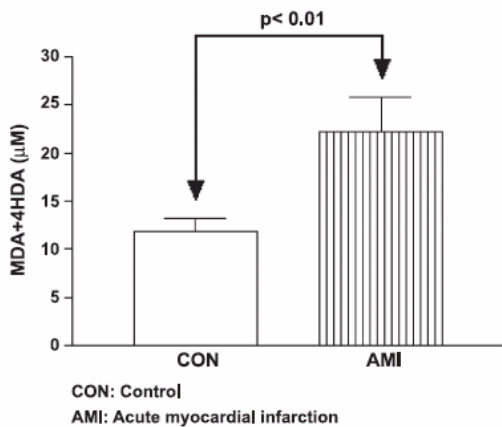


Fig. 2. Serum levels of LPx (MDA+4-HNE) in patients with AMI treated with primary angioplasty respect to control (CON) group. The bars represent the mean ± S.E.M.

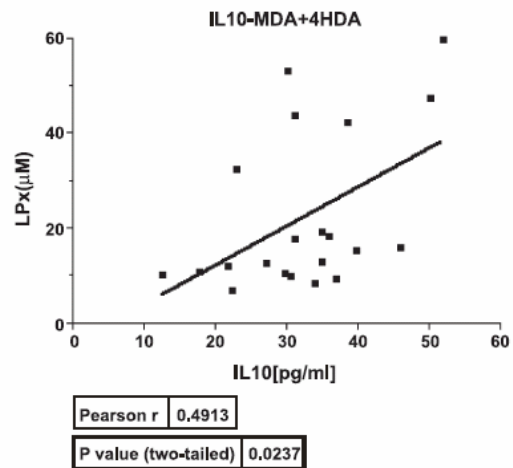


Fig. 3. Scatter plot of serum IL-10 and LPx (MDA+4-HNE) concentration in myocardial ischemia/reperfusion. Correlation analysis is for the combined group which yielded $r=0.49$ and $p<0.02$.

3.2. Endogenous relationship of IL-10 and MDA+4-HNE in myocardial ischemia/reperfusion

Serum IL-10 concentrations were significantly higher in the AMI group compared with control subjects (32.45 ± 2.17 vs. 22.10 ± 2.40 pg/ml, $p=0.03$; see Fig. 1). Serum MDA+4-HNE concentrations were significantly higher in the AMI group (22.20 ± 3.63 vs. 11.90 ± 1.26 µM, $p=0.01$; see Fig. 2). The IL-10 levels were positively correlated with the serum concentrations of MDA+4-HNE (Pearson's $r=0.49$, $p=0.02$; see Fig. 3).

4. Discussion

In the present study, we showed the endogenous production of IL-10 and MDA+4-HNE after myocardial ischemia/reperfusion in humans. The relationship between IL-10 and the process of reperfusion injury has been studied previously in several animal models [16–18]. IL-10 is an anti-inflammatory cytokine, secreted by lymphocytes of the Th2 subtype and also in large amounts by macrophages. It inhibits many cellular processes that could play an important role in plaque progression, rupture, or thrombosis [19].

The production of IL-10 has been shown in multiple studies of myocardial ischemia-reperfusion and pulmonary bypass in humans [1–4]. In one of these settings in humans, Shibata et al. [1] reported that the plasma IL-1 receptor antagonist and IL-10 levels were closely correlated with the severity of hemodynamics in AMI and with the clinical status of patients with severe AMI. Our study showed a significant increase in IL-10 after myocardial ischemia-

reperfusion in patients with AMI treated with primary percutaneous transluminal coronary angioplasty. Yang et al. [20] observed in an experimental model of ischemia-reperfusion in mice deficient in IL-10 that these had an exaggerated inflammatory response in the reperfused tissues compared to wild mice. This was revealed as an increase in neutrophil infiltration in the reperfused tissues and an increased production of tumor necrosis factor- α , intercellular adhesion molecule-1 and nitric oxide degradation, ultimately leading to an increase in the size of the AMI and myocardial necrosis as well as the mortality rate in immunosuppressed mice. These findings provide evidence that the endogenous production of IL-10 has protective effects against myocardial infarction and reperfusion damage. In addition, IL-10 may have other important anti-inflammatory functions, including inhibition of cell adhesion molecules, monocyte chemoattractant MCP-1, tissue factor, fibrinogen, metalloproteinase-9, T-lymphocyte granulocyte-macrophage colony stimulation factor, inducible nitric oxide synthase, and smooth muscle proliferation [21].

In this study, the distribution of proatherogenic and proinflammatory risk factors (hypercholesterolemia, diabetes, hypertension, and smoking) was similar in patients with AMI and in healthy control subjects, making it improbable that a difference in the prevalence of these factors accounts for the differential expression of IL-10.

During AMI, local tissue becomes hypoxic and LPx is likely to be high during its reperfusion [8]. LPx has been defined as the oxidative deterioration of polyunsaturated lipid [22]. It occurs constantly at a low level in most cellular biological systems. Oxygen-derived free radicals can react with lipids, if not blocked by sufficient antioxidant molecules, to form lipid peroxides which do extensive damage [23]. Since the major constituents of biological membranes are lipids, their peroxidation can lead to cell damage and death. In humans, raised MDA concentrations have been reported in peripheral venous blood in patients with successful myocardial reperfusion after thrombolytic therapy for AMI compared to subjects in whom reperfusion did not occur [24–26]. Additionally, high concentrations of MDA have also been found in the coronary sinus blood of patients undergoing percutaneous transluminal angioplasty [27]. We have also found that serum MDA + 4-HNE concentrations are significantly higher in patients with AMI. Possibly, free-radical production is secondary to cellular damage that occurs during ischemia/reperfusion in patients with AMI. Lipid peroxides are also known to be present in atherosclerotic plaque tissue [28] and we cannot exclude the possibility that the rise in serum MDA + 4-HNE concentration is due to mechanical disruption of plaque-thrombus during balloon inflation. In addition, MDA is a potentially harmful substance that may damage extracellular components, which may themselves be cytotoxic to the endothelial cells [29,30].

The present study shows for the first time a significant association between the serum LPx products and IL-10 in patients with AMI treated with primary percutaneous trans-

luminal coronary angioplasty. Reperfusion of postischemic tissues is accompanied by the generation of large amounts of oxygen radicals formed by different mechanisms that can overcome cellular defenses and produce a hystic lesion [31]. A possible explanation for this association could be that since the oxygen free radicals generated in large amounts by the reestablishment of the flow produce an oxidative hystic lesion that amplifies the local inflammatory action, IL-10 can help to modulate the inflammatory response. However, the present study did not identify the mechanism of IL-10 production and LPx or the cells responsible for it. These mechanisms are still not well understood, and further studies are required to elucidate them.

A number of studies suggest the potential use of IL-10 in experimental therapy for different forms of reperfusion injury [32,33]. Under systemic or local inflammatory conditions, a number of approaches have recently been identified that can boost endogenous IL-10 levels while simultaneously down-regulating the production of proinflammatory cytokines and chemokines [34].

In conclusion, the present study demonstrates (1) increased IL-10 in a human model of myocardial ischemia/reperfusion and (2) an association between reperfusion injury and elevated IL-10 levels in patients with AMI treated with primary percutaneous transluminal coronary angioplasty. Our findings highlight an intriguing relationship between ischemia-reperfusion injury after primary angioplasty and IL-10 levels that merits further investigation.

Acknowledgements

The authors wish to express their gratitude to: Professor Dr. J.C. Kaski, for his valuable advise and critical discussion of this manuscript; the nursing staff of Hospital Universitario de Canarias, for the blood extractions and the care of patients. PFYZER, for the financial support for IL-10 and LPx kits to serum samples analysis.

References

- [1] Shibata M, Endo S, Inada K, et al. Elevated plasma levels of interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-10 in patients with acute myocardial infarction. *J Interferon Cytokine Res* 1997;17:145–50.
- [2] Seghaye M, Duchateau J, Bruniaux J, et al. Interleukin-10 release related to cardiopulmonary bypass in infants undergoing cardiac operations. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1996;111:545–53.
- [3] Sugita T, Watarida S, Katsuyama K, et al. Interleukin-10 concentration in children undergoing cardiopulmonary Bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1996;112:1127–8.
- [4] Wan S, Marchant A, DeSmet JM, et al. Human cytokine responses to cardiac transplantation and coronary artery bypass grafting. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1996;111:469–77.
- [5] Moore KW, O'Garra A, de Waal Malefyt R, et al. Interleukin-10. *Annu Rev Immunol* 1993;11:165–90.
- [6] Uyemura K, Demer LL, Castle SC, et al. Cross-regulatory roles of interleukin (IL)-12 and IL-10 in atherosclerosis. *J Clin Invest* 1996; 97:2130–8.

- [7] Mallat Z, Heymes C, Ohan J, et al. Expression of interleukin-10 in advanced human atherosclerotic plaques. Relation to inducible nitric oxide synthase expression and cell death. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:611–6.
- [8] Jennings RB. Myocardial ischaemia observations, definitions and speculation. *J Mol Cell Cardiol* 1970;1:345–9.
- [9] McCord JM. Free radicals and myocardial ischaemia: overview and outlook. *Free Radic Biol Med* 1988;4:9–14.
- [10] Ambrosio G, Chiariello M. Myocardial reperfusion injury: mechanism and management—a review. *Am J Med* 1991;91:86–8.
- [11] Fridovich I. Biological sources of O₂⁻. *Methods Enzymol* 1984;105:59–61.
- [12] Weitz Z, Bimbaum AJ, Sobotka PA, et al. Elevated pentane levels during acute myocardial infarction. *Lancet* 1991;337:933–5.
- [13] Bolli R. Mechanism of myocardial “stunning”. *Circulation* 1990;82:723–38.
- [14] Ryan TJ, Anderson JL, Antman EM, et al. ACC/AHA guidelines for the management of patients with acute myocardial infarction: executive summary. A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee on Management of Acute Myocardial Infarction). *Circulation* 1996;94:2341–50.
- [15] Ryan TJ, Antman EM, Brooks NH, et al. 1999 update: ACC/AHA guidelines for the management of patients with acute myocardial infarction: executive summary and recommendations: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee on Management of Acute Myocardial Infarction). *Circulation* 1999;100:1016–30.
- [16] Goes N, Urmson J, Ramassar V, et al. Ischemic acute tubular necrosis induces an extensive local cytokine response: evidence for induction of interferon-gamma, transforming growth factor-beta 1, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, interleukin-2, and interleukin-10. *Transplantation* 1995;59:565–72.
- [17] Zhai QH, Futrell N, Chen FJ. Gene expression of IL-10 in relationship to TNF-alpha, IL-1beta and IL-2 in the rat brain following middle cerebral artery occlusion. *J Neurol Sci* 1997;152:119–24.
- [18] LeMoine O, Louis H, Stordeur P, et al. Role of reactive oxygen intermediates in interleukin-10 release after cold liver ischemia and reperfusion in mice. *Gastroenterology* 1997;113:1701–6.
- [19] Perez-Fernandez R, Kaski JC. Interleucina-10 y enfermedad coronaria. *Rev Esp Cardiol* 2002;55:738–50.
- [20] Yang Z, Zingarelli B, Szabo C. Crucial role of endogenous interleukin-10 production in myocardial ischaemia/reperfusion injury. *Circulation* 2000;101:1019–26.
- [21] Anguera I, Miranda-Guardiola F, Bosch X, et al. Elevation of serum levels of the anti-inflammatory cytokine interleukin-10 and decreased risk of coronary events in patients with unstable angina. *Am Heart J* 2002;144:811–7.
- [22] Tappel AL, Dillard CJ. In vivo lipid peroxidation: measurement via exhaled pentane and protection by vitamin E. *Fed Proc* 1981;40:174–8.
- [23] Dumelin EE, Tappel AL. Hydrocarbon gases produced during in vitro peroxidation of polyunsaturated fatty acids and decomposition of preformed hydroperoxides. *Lipids* 1977;12:894–900.
- [24] Davies SW, Ranjadayalan K, Wickens DG, et al. Free radicals, reperfusion and thrombolysis. *Eur Heart J* 1989;10:274 [Suppl.].
- [25] Ohlin H, Gustavsson CG, Pantev E, et al. Transient release of lipid peroxidation products as a noninvasive marker of successful reperfusion after thrombolysis for myocardial infarction. *BJH* 1995;73:223–6.
- [26] Davies SW, Ranjadayalan K, Wickens DG, et al. Free radical activity and left ventricular function after thrombolysis for acute infarction. *BJH* 1993;69:114–20.
- [27] Roberts MJD, Young IS, Trouton TG, et al. Transient release of lipid peroxides after coronary artery balloon angioplasty. *Lancet* 1990;336:143–5.
- [28] Ledwozyw A, Michalak J, Stepień A, et al. The relationship between plasma triglycerides, cholesterol, total lipids and lipid peroxidation products during human atherosclerosis. *Clin Chim Acta* 1986;155:275–84.
- [29] Fogelman AM, Shechter I, Seager J, et al. Malondialdehyde alteration of low density lipoproteins leads to cholesterol ester accumulation in human monocyte-macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1980;77:2214–8.
- [30] Evensen SA, Galdal KS, Nilsen E. LDL-induced cytotoxicity and its inhibition by anti-oxidant treatment in cultured human endothelial cells and fibroblasts. *Atherosclerosis* 1983;49:23–30.
- [31] Ambrosio G, Flaherty JT, Duilio C, et al. Oxygen radicals generated at reflow induce peroxidation of membrane lipids in reperfused hearts. *J Clin Invest* 1991;87:2056–66.
- [32] Hayward R, Nossuli TO, Scalia R, et al. Cardioprotective effect of interleukin-10 in murine myocardial ischemia-reperfusion. *Eur J Pharmacol* 1997;334:157–63.
- [33] Engles RE, Huber TS, Zander DS, et al. Exogenous human recombinant interleukin-10 attenuates hindlimb ischemia-reperfusion injury. *J Surg Res* 1997;69:425–8.
- [34] Hask G, Szabó C. Modulation of cytokine and chemokine production by transmitters and co-transmitters of the autonomic nervous system. *Biochem Pharmacol* 1998;56:1079–87.

LETTER TO THE EDITOR

Diurnal variations in serum neopterin levels are associated with the pineal hormone melatonin circadian rhythm in healthy human subjects

To the Editor

Neopterin (2-amino-4-oxo-6[D-eritro-1,2,3, trihydroxipropil]-pteridin), is a metabolite derived from guanosine triphosphate bioperin pathway [1]. Activation of human monocytes/macrophages, on stimulation mainly with interferon-gamma secreted by stimulated T helper type 1 lymphocytes, enhances neopterin synthesis and release [2]. It has been previously reported that both immune cell number and functions may vary in the 24-hr circadian period [3, 4] as well as cytokine secretion and activity are under central neuroendocrine control [5]. The pineal gland, particularly, plays an important role in the neuroendocrine regulation of immunity through the light/dark secretion of its main hormone melatonin (*N*-acetyl-5-methoxytryptamine) whose highest levels occurred shortly after midnight [6]. Data about diurnal variations of neopterin serum levels are scarce. Since pineal activity plays an essential integrator role in the chronomodulation of the biological system, it might be possible that circadian production of melatonin influences the neopterin serum levels. There are no reports concerning the possible relevance of melatonin in relation to the diurnal variations of serum neopterin on healthy human subjects.

Seventy subjects (37 men and 33 women), 57–73 yr of age, were selected from individuals without cardiovascular and cancer disease (by careful history, physical examination and ECG) who visited our outpatient clinic for a routine clinical and laboratory investigation. The investigation conformed with the principles outlined in the Declaration of Helsinki, and it has been approved by the ethics committee of the Hospital Universitario de Canarias (Canary Islands, Spain). Subjects had normal kidney and liver functions and were free of any sleep disorders as determined by history, actigraphy, and baseline polysomnography. All participants were screened for history depression, mania, psychosis, epilepsy, and thyroid disorders; they had no evidence of drug use by urinary toxicology screens; and they had no indication of infection or disease by blood chemistry tests. Medical history and examinations revealed no chronic or debilitating medical conditions.

Subjects were studied in the coronary care unit under strictly controlled light/dark conditions. The light/dark period in the coronary unit was 14 hr (1745 ± 33 lx):10 hr (1.33 ± 0.3 lx); lights on at 07:00 hr. Venous blood samples were obtained through a catheter with a heparin lock implanted in the antecubital vein. Blood samples for

neopterin and melatonin were collected at 09:00 hr (light period) and 02:00 hr (dark period). Nocturnal blood sampling was carried out by a trained nurse, in the dark when the subjects were sleeping, with the help of a minute torch with a dim red light (intensity < 30 lx) avoiding any light directed to the patient's face. Serum samples were aliquoted into several tubes and stored at -80°C until analysis. Melatonin levels in serum samples were measured using an enzyme-immunoassay kit after the samples had been extracted with chloroform (DRG Instruments GmbH, Marburg, Germany). Neopterin levels in serum samples were measured using an enzyme-immunoassay kit (DRG Instruments GmbH, Marburg, Germany). SPSS for Windows was used to perform statistical analyses. Light/dark changes in melatonin and neopterin were analyzed by a general ANOVA (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Mean serum light/dark levels of neopterin in relation to those of melatonin are illustrated in Fig. 1. As we expected, mean nocturnal concentrations of melatonin were

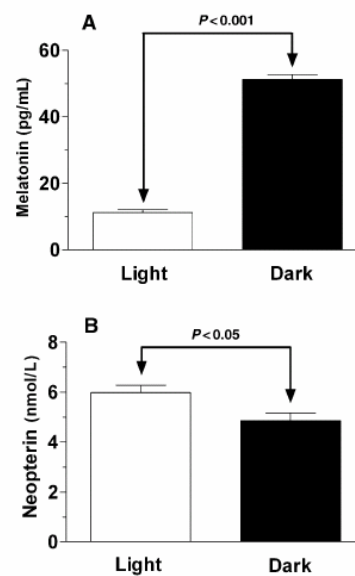


Fig. 1. Light/dark pattern in serum levels of healthy subjects: melatonin (A) and neopterin (B). Blood samples were collected at 09:00 hr (light period) and 14:00 hr (dark period). Bars represent the mean ± S.D. of 75 subjects.

significantly higher than those found during the light period of the day ($P < 0.001$) in healthy subjects (Fig. 1A). On the contrary, the neopterin serum concentrations observed at 09:00 hr were significantly higher than those found during the dark phase ($P < 0.05$) in healthy subjects (Fig. 1B).

We found that circadian changes of melatonin may be responsible, at least in part, for light/dark variations of endogenous neopterin production in healthy human subjects. The immune system and inflammatory responses are affected by the circulating melatonin levels [7–9]. Biopterin is an essential enzymatic cofactor for tryptophan hydroxylase, an enzyme which plays an important role in neurotransmitters synthesis and it is a regulatory point in the melatonin synthesis pathway. It has been suggested a modulatory role of some pteridine compounds on the enzymes of the indole metabolism in the pineal gland [10]. In addition to this, melatonin is an effective downregulator of biopterin synthesis because of its effects on both the direct inhibition of catalytic activity of the guanosine triphosphate cyclohydrolase I and the downregulation of its gene expression [11].

Auzéby et al. [12] have demonstrated a circadian rhythm of urinary neopterin of large amplitude in healthy subjects, with a peak at 06:30 hr. In the present study, a diurnal variation of serum neopterin was detected in healthy subjects under baseline conditions. Likewise, Lévi et al. [3] have reported circadian variations in circulating T-lymphocytes subtypes (all T, T helper lymphocytes and for the T helper/T suppressor-cytotoxic ratio), with a peak at 04:30 hr, with the similar pattern to serum melatonin and neopterin in this study. These data have been supported by other authors that demonstrate how melatonin may modulate the number of T lymphocytes and the macrophage activation [13].

For all, our results suggest that neopterin serum levels may be influenced, at least in part, by the circadian secretion of melatonin in healthy subjects. This study contributes to show the regulatory effects of melatonin on immune responses and supports another physiological link between the neuroendocrine and the immune systems.

Acknowledgments

The authors wish to express their gratitude to Ines Abreu-Afonso for the linguistic aids preparing the manuscript.

*M.J. Garcia-Gonzalez,
A. Dominguez-Rodriguez,
P. Abreu-Gonzalez
e-mail: mjgg181262@hotmail.com*

References

1. AUERBACH G, NAR H. The pathway from GTP to tetrahydrobiopterin: three-dimensional structures of GTP cyclohydrolase I and 6-pyruvoyl tetrahydropterin synthase. *Biol Chem* 1997; **378**:185–192.
2. HUBER C, BATCHELOR JR, FUCHS D et al. Immune response-associated production of neopterin. Release from macrophages primarily under control of interferon-gamma. *J Exp Med* 1984; **160**:310–316.
3. LEVI F, CANON C, TOUITOU Y et al. Circadian rhythms in circulating T lymphocyte subtypes and plasma testosterone, total and free cortisol in five healthy men. *Clin Exp Immunol* 1988; **71**:329–335.
4. ABO T, KAWATE K, ITOH K, KUMAGAI K. Studies on the bioperiodicity of the immune response. Circadian rhythms of human T, B and K cell traffic in the peripheral blood. *J Immunol* 1981; **126**:1360–1366.
5. JANKOVIC BD. Neuroimmunomodulation. From phenomenology to molecular evidence. *Ann N Y Acad Sci* 1994; **741**:1–38.
6. GUERRERO JM, REITER RJ. Melatonin-immune system relationship. *Curr Top Med Chem* 2002; **2**:167–179.
7. MAESTRONI GJ. The immunoneuroendocrine role of melatonin. *J Pineal Res* 1993; **14**:1–10.
8. FJAERLI O, LUND T, OSTERUD B. The effect of melatonin on cellular activation processes in human blood. *J Pineal Res* 1999; **26**:50–55.
9. REITER RJ, CALVO JC, KARBOUNIK M et al. Melatonin and its relation to the immune system and inflammation. *Ann N Y Acad Sci* 2000; **917**:376–386.
10. VAN BENTHEM J, EBELS I, BALEMANS MG et al. The effect of reduced neopterin on the synthesis of several methylated indoles in the pineal gland of adult male golden hamsters kept under standardized conditions. *J Neural Transm* 1985; **62**:137–154.
11. JANG YJ, HONG HN, HWANG O. Down-regulation of GPT cyclohydrolase I and tetrahydrobiopterin by melatonin. *Neuroreport* 2000; **11**:3627–3630.
12. AUZÉBY A, BOGDAN A, KROSI Z et al. Time-dependence of urinary neopterin, a marker of cellular immune activity. *Clin Chem* 1988; **34**:1866–1867.
13. MORREY KM, MCLACHLAN JA, SERKIN CD et al. Activation of human monocytes by the pineal hormone melatonin. *J Immunol* 1994; **153**:2671–2680.