EUGÊNIA MARIA ASSUNÇÃO SALUSTIANO

**Perfil sérico de melatonina, citocinas e cortisol
em gestantes com pré-eclâmpsia**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutora em Ciências

Programa de Obstetrícia e Ginecologia
Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Ruano

São Paulo

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Salustiano, Eugênia Maria Assunção

Perfil sérico de melatonina, citocinas e cortisol em gestantes com pré-eclâmpsia /
Eugênia Maria Assunção Salustiano. -- São Paulo, 2014.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Obstetrícia e Ginecologia.

Orientador: Rodrigo Ruano.

Descritores: 1.Pré-eclâmpsia 2.Gravidez 3.Glândula pineal 4.Melatonina
5.Neuroimunomodulação 6.Citocinas 7.Cortisol

USP/FM/DBD-202/14

Dedicatória

*À minha família;
meu alicerce e mais profundo amor.*

Agradecimentos

Aos meus pais, Teresinha e Sergio, responsáveis pela pessoa que me tornei. Pela sabedoria, cuidados, carinho, por todos os sacrifícios, pela minha formação, ensinamentos e tudo que me proporcionaram; sempre acreditando e apoiando minhas escolhas. Vocês são meu exemplo! Ao meu irmão, Francisco, por me trazer tantas alegrias, por todo incentivo, carinho e, por me dar meu maior presente; nossa pequena Larissa. À minha cunhada, pelo apoio e paciência. Agradeço também ao meu primo, Jean, que é na verdade como um irmão mais velho.

Aos amigos, a família que pude escolher !!!! Aos amigos de Campinas, Vanessa e Silvio, que mesmo distantes sempre se fizeram presentes em todos os momentos. Aos amigos de faculdade; em especial Larissa Santos, Karen Mós, Cintia Fock. Àqueles que me acompanharam em cada etapa; Kika, Sofia, Carol Travassos, Edna, mana Tati, a profa. Renata Kobayashi, Maiara, Lucas, Ahmed, Hélène, Hossam, Pitu, Elizangela, Fabinho, Tadashi e em especial ao amigo Luir Ruaro.

Ao Dr. Marco Aurélio K. Galletta pela ajuda na triagem das gestantes. E a todo departamento de enfermagem, principalmente à enfermeira Teresinha e as auxiliares Evangelina e Cida Domingues.

À Adriana Regina Festa pela amizade e toda ajuda. Ao pessoal do setor administrativo e de informática; Fátima, Soraia, Lucinda, Willian, Alan, Raquel, Miriam e Célia.

À Divisão de Laboratório Central e ao Departamento de Bioquímica do ICHC, meu muito obrigada pela parceria fundamental.

Agradecimento mais que especial aos amigos do laboratório de Cronofarmacologia, Marco Lapa, Daiane, Erika, Marina, San, Luis, Leila, Gabriela K, Eduardo Tamura, Eliana e profa. Zulma Ferreira. Às grandes e eternas amigas, “gatas do lab”; Adriessa, Flávia e Claudinha. Muito obrigada pela amizade, alegria, carinho e por estarem sempre presentes em cada etapa, principalmente durante a minha aventura canadense. Vocês são presentes de Deus na minha vida!

Aos técnicos Débora Moura, Eduardo Braga Fernandes e Sandra Muxel pela ajuda fundamental.

À professora Cathy Vaillancourt e seu grupo pela acolhida gentil durante o estágio no Canadá.

Ao amigo e professor Pedro Fernandes, o Pedroca, obrigada pelas conversas, brincadeiras, incentivo, por ouvir os desabafos, ser sempre tão disponível, paciente e, principalmente, por me auxiliar em todas as etapas deste trabalho. Não há palavras suficientes para lhe agradecer!

À professora Regina Pekelmann Markus, pela acolhida, confiança, por todas as discussões e críticas sempre produtivas, por compartilhar suas experiências e conhecimentos; enfim, por me ensinar sempre.

Ao amigo e orientador Rodrigo Ruano, por acreditar em mim, por toda confiança, apoio incondicional, disponibilidade, paciência, incentivo, conversas, desabafos, discussões e críticas fundamentais ao longo da confecção desta tese. Tenho certeza que durante estes anos, mesmo com

todas as dificuldades enfrentadas, pude amadurecer não só como aluna de pós, mas também como pessoa e pesquisadora. Muito obrigada por tudo!

Agradecimento especial a todas as gestantes que, gentilmente, aceitaram participar da pesquisa e doar o material tornando este sonho possível.

Agradeço, por fim, o fundamental apoio científico e financeiro do CNPq (130443/2010-7) e da FAPESP (2010/03846-0, 2010/09571-2, 2012/07762-0 e 2013/17432-0).

Epígrafe

*“Quero um dia poder dizer às pessoas que nada foi em vão...
Que o amor existe, que vale à pena se doar às amizades e às pessoas,
Que a vida é bela sim, e que eu sempre dei o melhor de mim
e que valeu à pena”*

Mário Quintana

Normalização adotada

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação, *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro Cunha, Maria Julia de A.L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valeria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas de títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

Lista de abreviaturas e siglas

Lista de símbolos

Lista de figuras

Lista de tabelas

Resumo

Summary

1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVOS	8
2.1	Objetivo geral.....	9
2.2	Objetivos específicos.....	9
3	REVISÃO DA LITERATURA.....	11
3.1	Pré-eclâmpsia.....	12
3.1.1	Conceitos	12
3.1.2	Pré-eclâmpsia como uma resposta imune inata	16
3.2	Cortisol	17
3.3	Glândula Pineal	20
3.3.1	Síntese de melatonina	20
3.3.2	Efeitos da melatonina.....	25
3.3.3	Eixo Imune Pineal	27
3.3.4	Melatonina e gestação	30
3.3.5	Melatonina e Pré-eclâmpsia.....	32
4	MÉTODOS.....	35
4.1	Pacientes	36
4.2	CrITÉRIOS inclusão	37
4.3	CrITÉRIOS exclusão	37
4.4	Método.....	38
4.4.1	Coleta de amostras de sangue	38
4.4.2	Coleta de amostras de urina	38
4.5	Dosagens	39
4.5.1	Dosagem de citocinas no soro por imunoenensaio Multiplex	39
4.5.2	Dosagem de cortisol no soro	40
4.5.3	Dosagem de melatonina no soro	40
4.5.4	Dosagem de 6-sulfatoximelatonina na urina	41
4.5.5	Dosagem de creatinina na urina	42
4.6	Análise estatística.....	42

5. RESULTADOS	44
5.1 Dosagem de citocinas (TNF, IL-8, IL-6, IL-1 β , IL-4, IFN γ , VEGF, IL-10, IL-12p40 e IL-17)	47
5.2 Dosagem de cortisol	51
5.3 Dosagem de melatonina	52
5.4 Correlação entre melatonina e TNF	54
5.5 Correlação entre melatonina e IL-8	56
5.6 Correlação entre TNF e IL-8	58
5.7 Correlação entre melatonina e cortisol	60
5.8 Dosagem de 6-sulfatoximelatonina	62
6 DISCUSSÃO	63
6.1 Efeito sobre citocinas	65
6.2 Efeito da melatonina e do eixo imune-pineal na Pré-eclâmpsia	69
7 CONCLUSÕES	76
8 REFERÊNCIAS	78
9 ANEXOS	96

Listas

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT	serotonina
5-HTP	5-hidroxitriptofano
6-SMT	6-sulfatoximelatonina
AA-NAT	arilalquilamina N-acetiltransferase
AC	adenilil ciclase
AMK	N1- acetil-5-metoxiquinuramina
AMP	monofosfato de adenosina
AMPc	monofosfato de adenosina cíclico
ANOVA	análise de variância
ASMT	<i>Acetilserotonina O-metiltransferase</i>
ATP	adenosina trifosfato
COX	ciclooxigenase
COX₂	ciclooxigenase induzida
CREB	proteína de ligação ao elemento responsivo a AMPc
DLC	Divisão de Laboratório Central
DHEG	doença hipertensiva específica da gestação
DNA	ácido desoxirribonucléico
ECA	enzima conversora de angiotensina
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
epm	erro padrão da média

FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
GABA	ácido gama-aminobutírico
HAS	hipertensão arterial sistêmica
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HELPP	<i>Hemolysis, Elevated Liver enzymes, Low Platelets</i>
HIOMT	hidroxindol-O-metiltransferase
IL	interleucina
iNOS	sintase de óxido nítrico induzível
IFN-γ	interferon gama
LCF-IBUSP	Laboratório de Cronofarmacologia do Instituto de Biociências da USP
LPS	lipopolissacarídeo de bactérias gram-negativas
M1	macrófago de ativação clássica
M2	macrófago de ativação alternativa
MAO	monoaminoxidase
MEL	melatonina
NAS	N-acetilserotonina
NF-κB	fator nuclear kappa B
NK	<i>natural killer</i>
NPY	neuropeptídeo Y
NO	óxido nítrico
NSQ	núcleo supraquiasmático
O₂-	ânion superóxido
PA	pressão arterial
PKA	proteína quinase dependente de AMPc

PE	pré-eclâmpsia
PGs	prostaglandinas
PGI2	prostaciclina
pH	potencial hidrogeniônico
PVN	núcleo paraventricular hipotalâmico
RNA	ácido ribonucleico
ROS	espécies reativas de oxigênio
sFlt-1	<i>soluble fms-like tyrosine kinase 1</i>
SPSS	Statistical Package for Social Science
TCLE	termo de consentimento livre e esclarecido
TGF-β	<i>transforming growth factor β</i>
TLRs	<i>toll like receptors</i>
Th1 e Th2	linfócito T helper 1 e 2, respectivamente
TNF	fator de necrose tumoral
TPH-1	triptofano hidroxilase
TXA2	tromboxano
USP	Universidade de São Paulo
VEGF	fator de crescimento endotelial vascular

LISTA DE SÍMBOLOS

dL	decilitro
g	grama
mEq	miliequivalente
mg	miligrama
mmHg	milímetros de Mercúrio
mmol	milimol
mL	mililitro
ng	nanograma
nM, μM e mM	nanomolar, micromolar e milimolar, respectivamente
pg	picogramas
rpm	rotação por minuto
μg	micrograma
μM	micromol

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Teorias etiopatogênicas na Pré-eclâmpsia	14
Figura 2 -	Via de síntese de melatonina	24
Figura 3 -	Proposta do Eixo imune pineal e Pré-eclâmpsia	30
Figura 4 -	Produção da citocina (dia/noite) pró-inflamatória TNF nos grupos Pré-eclâmpsia e Controle	47
Figura 5 -	Produção da citocina (dia/noite) pró-inflamatória IL-8 nos grupos Pré-eclâmpsia e Controle	48
Figura 6 -	Produção da citocina IL-4 (dia/noite) nos grupos Pré-eclâmpsia e Controle	49
Figura 7 -	Produção das citocinas IFN- γ (dia/noite) nos grupos Pré-eclâmpsia e Controle	50
Figura 8 -	Efeito do cortisol nos diferentes grupos e períodos (dia e noite)	51
Figura 9 -	Influência do quadro clínico na variação diária de melatonina em ambos os grupos de pacientes	53
Figura 10 -	Correlação entre os níveis de Melatonina e TNF em pacientes controle e com pré-eclâmpsia (PE) nos respectivos períodos (dia/noite)	55
Figura 11 -	Correlação entre os níveis de Melatonina e IL-8 em pacientes controle e com pré-eclâmpsia (PE) nos respectivos períodos (dia/noite)	57
Figura 12 -	Correlação entre os níveis de TNF e IL-8 em pacientes controle e com pré-eclâmpsia (PE) nos respectivos períodos (dia/noite)	59

Figura 13 -	Correlação entre os níveis de Melatonina e Cortisol em pacientes controle e com pré-eclâmpsia (PE) nos respectivos períodos (dia/noite).....	61
Figura 14 -	Excreção de 6-SMT em ambos os grupos de acordo com os diferentes blocos de horários (bloco 1: 12-18h, bloco 2: 18-24h, bloco 3: 24-06h, bloco 4: 06-12h).....	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Características clínicas dos grupos estudados	46
-------------------	---	-----------

Resumo

Resumo

Salustiano EMA. *Perfil sérico de melatonina, citocinas e cortisol em gestantes com pré-eclâmpsia* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014. 97p.

A pré-eclâmpsia (PE) é a maior causa de mortalidade e morbidade materna e perinatal. Sua etiologia permanece desconhecida, o que torna impossível a realização de prevenção primária dessa doença. O entendimento do perfil de substâncias que estão alteradas na PE é de relevância para poder atuar preventivamente. Considerando que vários hormônios envolvidos na resposta imunológica participam da fisiopatologia da PE e que, como demonstrado recentemente, a melatonina tem papel relevante na fisiopatologia da inflamação aguda, nossa hipótese seria que este hormônio poderia também atuar fisiopatologia da PE. **OBJETIVOS:** avaliar o perfil de citocinas e hormônios no soro de pacientes com PE para estabelecer se o eixo imune-pineal estaria ativado nesta doença. **MÉTODOS:** Realizamos estudo prospectivo caso-controle, no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, no período de Outubro de 2010 a Outubro de 2013. O grupo experimental foi formado por pacientes com PE pura no momento do diagnóstico (sem medicação anti-hipertensiva inicial por 24h). Gestantes saudáveis e normotensas, pareadas por idade materna, idade gestacional e paridade, foram selecionadas como controles. Citocinas (TNF, IL-8, IL-6, IL-1 β , IL-4, IFN- γ , VEGF, IL-10, IL-12p40, IL-17 e IL-2), cortisol, níveis séricos de melatonina pela manhã (08h-11h) e à noite (23h-01h), assim como os níveis de 6-sulfatoximelatonina (6-SMT) nos diferentes períodos do dia (b1:12h-18h, b2:18h-24h, b3:24h-06h, b4:06-12h) foram avaliados por MULTIPLEX e ELISA. A diferença entre os grupos foi avaliada por Two-way ANOVA seguido de pós teste de Bonferroni. Foi considerada significativamente diferente quando a probabilidade da hipótese nula foi rejeitada ($p < 0,05$). A correlação entre parâmetros foi avaliada por regressão linear simples e teste de Pearson. **RESULTADOS:** De um total de 31 pacientes inicialmente avaliadas, 14 gestantes com PE e 12 controles foram incluídas. As características das pacientes (idade materna, paridade e idade gestacional) foram semelhantes em ambos os grupos ($p > 0,05$). A concentração plasmática de TNF e IL-8 foi significativamente maior em pacientes com PE do que em controles, e não foi detectada a presença de IL-6, IL-1 β , VEGF, IL-10, IL-17, IL-12p40 em ambos os grupos. A concentração de IL-4 foi similar em ambos os grupos. Níveis séricos de IFN γ tenderam a ser maiores em pacientes com PE. A análise dos dados mostrou uma correlação significativamente positiva entre as concentrações plasmáticas de melatonina e TNF; melatonina e IL-8; e TNF e IL-8 no grupo PE durante período diurno. Os níveis diurnos de cortisol foram mais altos em ambos os grupos quando comparados com os noturnos; entretanto pacientes com PE apresentam níveis significativamente reduzidos de cortisol pela manhã quando comparados com o grupo controle. Níveis séricos de melatonina na pré-eclâmpsia quando comparados com controles foram maiores pela manhã, mas não à noite. O grupo controle apresentou um

padrão esperado do ritmo dia/noite de melatonina, enquanto a pré-eclâmpsia não apresentou diferença significativa entre dia e noite. O ritmo circadiano de 6-SMT foi constatado em ambos os grupos, porém o valor excretado durante o dia foi maior no grupo PE que no controle. CONCLUSÃO: Nossos resultados sugerem que a PE altera negativamente o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, induzindo um aumento no TNF, que sinaliza uma resposta inflamatória aguda. Além disso, acredita-se que os altos níveis de IL-8 e TNF possam configurar um sistema de retroalimentação que contribui para o desenvolvimento do quadro e ativação do eixo-imune pineal. Portanto, este efeito pode estar associado com o aumento da melatonina diurna na PE, induzida por TNF em células imunocompetentes ativadas. Diante disso, nossos dados sugerem que o aumento tanto de melatonina como de 6-SMT nas pacientes com PE possa ser de origem extra-pineal.

Descritores: pré-eclâmpsia, melatonina, citocinas, cortisol, processo inflamatório, glândula pineal, eixo imune-pineal, hipertensão arterial.

Summary

Summary

Salustiano EMA. *Serum profile of melatonin, cytokines and cortisol in pregnant women with preeclampsia* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2014. 97p.

Preeclampsia (PE) is a major cause of maternal and perinatal mortality and morbidity. Since its etiology remains unknown, it is impossible to have a primary prevention of the disease. The understanding of the substance profiles that are altered in PE is important to prevent the disease. Considering that many hormones involved in immune response are involved in the physiopathology of PE and that melatonin has a relevant role in the acute inflammatory process, our hypothesis is that this hormone would also be involved in the physiopathology of PE. **OBJECTIVES:** To analyze the serum profile of cytokines and hormones in pregnant women with PE in order to evaluate if the immune-pineal axis is activated in this disease. **METHODS:** A prospective case-control study was conducted at the Clinical Hospital USP between October 2010 and October 2013. Only patients with pure PE at the moment of diagnosis (without anti-hypertensive medication for the initial 24h after diagnosis) were included. Normotensive healthy pregnant women that were matched by maternal age, gestational age and parity were included as controls. Cytokines (IL-6, IL-1 β , IL-8, TNF and IFN γ), cortisol and serum melatonin levels in the morning (08h-11h) and at night (23h-01h), as well as 6-sulfatoxymelatonin (6-SMT) levels in different periods of the day (b1:12h-18h, b2:18h-24h, b3:24h-06h, b4:06-12h) were measured by MULTIPLEX and ELISA. Differences between groups were analyzed using two-way ANOVA followed by Bonferroni's test. Statistical difference was considered when the null hypothesis was rejected ($p < 0.05$). Correlations between parameters were analyzed using linear regression and Pearson test. **RESULTS:** From a total of 31 patients initially evaluated, 14 patients with PE and 12 controls were included. Demographics such as maternal age, parity, gestational age at the dosages, body-mass index were similar in both groups ($p > 0.05$). TNF and IL-8 levels were higher in the preeclampsia group than controls, while IL-6, IL-1 β , VEGF, IL-10, IL-17 and IL-12p40 were not detected in both groups. IL-4 levels were similar in both groups. There was a tendency of higher levels of IFN γ , in patients with PE when compared to controls. Our analysis revealed a positive correlation between melatonin and TNF, melatonin and IL-8, TNF and IL-8 in PE group. Daytime cortisol levels were higher in both groups when compared to nighttime; however, patients with preeclampsia had reduced morning levels of cortisol when compared to the control group. Melatonin serum level was higher at daytime, but not at nighttime, in patients with PE when compared to controls. Controls had the expected day/nighttime rhythm of the melatonin levels, while patients with PE did not have it. In contrast, 6-SMT rhythm was observed in both groups, but with higher daytime levels in patients with PE when compared to controls. **CONCLUSION:** Our results suggest that PE alters negatively the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, but induces an increase in TNF, which signalizes an acute inflammatory response. Furthermore, it is believed that

high levels of IL-8 and TNF can configure a feedback system that contributes to the development of the disease and immune pineal axis activation. Therefore, this effect may be associated with increased daytime melatonin levels in PE, induced by TNF in immunocompetent cells. Thus, our data suggest that the increased melatonin and 6-SMT in patients with PE may be originated from an extra-pineal axis.

Keywords: preeclampsia, melatonin, cytokines, cortisol, inflammatory process, pineal gland, immune pineal-axis, arterial hypertension

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

Pré-eclâmpsia (PE) consiste no desenvolvimento de hipertensão (pressão arterial $\geq 140/90$ mmHg), associada à proteinúria significativa (≥ 300 mg/ 24h) e/ou edema generalizado (de mãos e face) após 20 semanas de gestação (Kahale; Zugaib, 1995; Zugaib, 2012). Sua frequência varia muito na literatura, sendo descrita de 2 a 5% na população de gestantes em geral (López-Jaramillo *et al.*, 2001; Gilbert *et al.*, 2008; Hutchinson *et al.*, 2009). Trata-se de uma das principais causas de mortalidade e morbidade maternas e perinatais (Mutter; Karumanchi, 2008; Hutchinson *et al.*, 2009). E, além disso, esta doença contribui também para aumentar a morbidade neonatal devido ao maior risco de prematuridade, sofrimento fetal, restrição do crescimento fetal e até mesmo óbito intrauterino (Steegers *et al.*, 2010).

Clinicamente, além dos níveis pressóricos, proteinúria e edema; a PE também se caracteriza pela invasão trofoblástica inadequada, vasoconstrição e aumento da resistência vascular periférica. A PE pode ainda evoluir para eclâmpsia (convulsão) e síndrome HELLP (do inglês: *Hemolysis, Elevated Liver enzymes, Low Platelets*). É uma doença que incide frequentemente em mulheres nulíparas (primigestas) (Mutter; Karumanchi, 2008; Hutchinson *et al.*, 2009).

Sua etiologia permanece desconhecida, o que torna impossível realizar a prevenção primária da doença. Porém, existem várias teorias etiopatogênicas propostas, baseadas em fatores genéticos, imunológicos, inflamatórios nutricionais; além da invasão trofoblástica intersticial anormal (Kalluri *et al.*, 2010; Harris, 2010). Esses fatores levariam a uma disfunção trofoblástica, com sinais e sintomas clássicos de PE e a liberação de mediadores inflamatórios que poderiam interferir no bom andamento da gestação (Redman *et al.*, 1999; Borzychowski *et al.*, 2006). Assim, apesar de não se saber exatamente qual o mecanismo desencadeante da PE, alterações imunológicas inatas e adaptativas parecem participar da etiopatogenia da doença (Saito; Sakai, 2003). Portanto, a PE estaria associada ao desequilíbrio na regulação imunológica.

Sabe-se que linfócitos T regulatórios (Th) apresentam subpopulações funcionais associadas a diferentes perfis da resposta imunológicas. Células do tipo Th1 ativam resposta com perfil mais inflamatório, enquanto que respostas do tipo Th2 modulam a atividade de mastócitos, linfócitos B e eosinófilos, caracterizando um perfil de resposta mediada por anticorpos (Redman *et al.*, 2010; Hsu; Nanan, 2014). As citocinas produzidas por estas populações induzem inibição mútua umas sobre as outras (Pinheiro *et al.*, 2013). Na PE acredita-se que haja um deslocamento no balanço Th1/Th2 para um estado predominantemente Th1, com alta produção das citocinas características dessa via, como IL-2, IFN- γ e TNF (Saito; Sakai, 2003; Saito *et al.*, 2007). Estas citocinas ativam células T citotóxicas e células NK (*natural killers*), o que contribui para o desenvolvimento do quadro clínico

(Saito; Sakai, 2003). Entretanto, estudo recente publicado por Medeiros *et al.* (2014) sugere que gestantes com PE apresentam ativação de monócitos, produção de citocinas pró-inflamatórias e polarização da resposta tipo M1. Esse estudo sugere outro tipo de resposta imunológica possa estar envolvida na etiopatogenia da PE, o que demonstra a necessidade de estudar com mais detalhes a resposta imunológica nessa doença. Nesse caso, os monócitos ativados se diferenciam em macrófagos, muito importantes no reconhecimento e eliminação de patógenos. Os macrófagos podem ser ativados por meio de IFN- γ , LPS ou por outras citocinas como TNF através da via clássica (M1) com liberação de interleucinas como IL-12 e IL-23, alta produção de NO e espécies reativas de oxigênio. Mas, também através da via alternativa (M2) relacionada ao remodelamento e reparo tissular, resistência a parasitas e regulação da imunidade (Mills *et al.*, 2000; Mantovani *et al.*, 2004).

Considerando assim que a PE poderia ter um fator causal imune e que diferentes hormônios estão envolvidos na regulação e resposta imune, o estudo da participação do sistema neuroendócrino é altamente relevante para um maior entendimento do quadro. Neste sentido, acredita-se que a melatonina e o cortisol, possam desempenhar importante papel na fisiopatologia da PE (Salustiano *et al.*, 2013). O papel do cortisol vem sendo estudado com frequência na PE, contudo, a real ação da melatonina nesse processo ainda necessita ser investigada.

A melatonina é secretada durante a noite pela glândula pineal e atua no controle do sistema oscilatório endógeno de mamíferos. Este hormônio

participa da regulação de diversos eixos neuroendócrinos, associados com reprodução e sono-vigília (Reiter *et al.*, 1981; 2014), além disso, tem sido descrito seu papel antioxidante e imunomodulador (Reiter *et al.*, 2000; Skwarlo-Sonta *et al.*, 2003). Como imunomodulador, a melatonina parece exercer papel regulador no processo imunológico por meio do controle da secreção de citocinas (Carrillo-Vico *et al.*, 2004, 2005; Pontes *et al.*, 2006; Pontes *et al.*, 2007; Markus *et al.*, 2007). Por exemplo, a IL-2 apresenta clara relação com este hormônio, a qual é produzida principalmente pela ativação de linfócitos T CD4+ em resposta à estimulação de um antígeno (Pontes *et al.*, 2007). Lissoni *et al.* (1998), através da coleta de sangue venoso de voluntárias híidas para verificar a relação dos ritmos entre melatonina e algumas citocinas, verificaram que a interleucina-2 (IL-2) tem seus níveis elevados durante a noite, atribuindo este achado ao aumento concomitante da melatonina. Além disso, durante o repouso, a concentração de cortisol está diminuída. Considerando que o cortisol promove a supressão da produção de IL-2, compreende-se porque os níveis de IL-2 sejam maiores durante a noite.

A concentração de melatonina no colostro e no leite reflete a concentração sanguínea, mas, células imunocompetentes presentes no colostro passam a produzir melatonina após um estímulo de injúria, por exemplo, durante uma infecção com *Escherichia coli* (Pontes *et al.*, 2007; Pires-Lapa *et al.*, 2013). Durante respostas de defesa ocorre alteração na produção central de melatonina (pineal) para uma produção local por células imunocompetentes. Mediadores inflamatórios modulam a função da glândula

levando à supressão (citocinas pró-inflamatórias) (Markus *et al.*, 2007; 2013) ou aumento (glicocorticóides) (Ferreira; Markus, 2011) da síntese noturna de melatonina. A melatonina em concentrações compatíveis às encontradas no plasma durante a noite, inibe o rolamento e adesão de leucócitos ao endotélio vascular (Lotufo *et al.*, 2001; 2006; Tamura *et al.*, 2009). Consequentemente, a supressão da produção deste hormônio pela pineal, mediada por moléculas que sinalizam ou promovem a montagem da resposta inflamatória, facilitaria a migração de leucócitos para os tecidos afetados. Nestes locais monócitos e macrófagos passariam a produzir melatonina (Pontes *et al.*, 2006; Muxel *et al.*, 2012, Pires-Lapa *et al.*, 2013); o que contribuiria para o funcionamento adequado da resposta inflamatória. O aumento de glicocorticóides circulantes após a fase de recuperação contribuiria para a restauração do ritmo de produção de melatonina. A essa comunicação bidirecional entre o sistema imune e a glândula pineal damos o nome de eixo imune-pineal (Markus *et al.*, 2007).

A relação da melatonina durante o processo gestacional e/ou de parto ainda é pouco conhecida (Nakamura *et al.*, 2001). O ritmo de produção da melatonina pode ser verificado através da análise da urina, por meio dos níveis metabólito da melatonina, 6-sulfatoximelatonina (6-SMT). Kennaway *et al.* (1996) observaram esse ritmo da melatonina não se altera *per se* pela idade gestacional, mas sim quando ocorrem complicações obstétricas como restrição de crescimento fetal e/ou PE.

Outro fator que poderia contribuir para a etiopatogenia da PE é o estresse (Takiuti *et al.*, 2002; 2003); e, nesse sentido, o cortisol teria papel

fundamental na regulação dessa resposta imune podendo se correlacionar com o surgimento da PE (Ma *et al.*, 2002).

A hipótese do presente trabalho é que o quadro inflamatório da PE está relacionado a uma alteração na produção de melatonina segundo o conceito do eixo imune-pineal. Para avaliar esta questão, determinamos os níveis séricos (dia e noite) de melatonina, cortisol e de citocinas em gestantes controle ou com PE. Além disso, comparamos a excreção diária do metabolito da melatonina 6-SMT na urina destas gestantes.

2 Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Identificar o perfil sérico de citocinas e dos hormônios cortisol e melatonina em gestantes normais e com PE, a fim de avaliar o estado de ativação do eixo imune-pineal nesta doença.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar comparativamente as concentrações plasmáticas das seguintes substâncias (PE *versus* controle), em dois períodos (dia *versus* noite):

- TNF (fator de necrose tumoral), IL-8 (interleucina 8), IL-6 (interleucina 6), IL-1 β (interleucina 1 β), IFN- γ (interferon-gama), IL-17 (interleucina 17), VEGF (fator de crescimento endotelial vascular), IL-10 (interleucina 10), IL-12p40 (interleucina 12p40), IL-4 (interleucina 4) e IL-2 (interleucina 2),
- Cortisol
- Melatonina

Avaliar em 4 períodos (bloco 1: 12-18h, bloco 2: 18-24h, bloco 3: 24h-06h, bloco 4: 06-12h), o metabólito urinário de melatonina; 6-sMT (6-sulfatoximelatonina).

Estrategicamente foi realizada a análise de dados considerando a comparação entre os grupos experimentais e também a correlação entre a concentração de citocinas e cortisol *versus* a concentração de melatonina.

3 Revisão da Literatura

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 PRÉ-ECLÂMPسيا

3.1.1 Conceitos

O estudo da doença hipertensiva específica da gravidez sempre fascinou muitos pesquisadores. Desde 2000 a.C., há na literatura médica egípcia referências a crises convulsivas em mulheres grávidas. Mas, somente no século XX foi feito o reconhecimento de hipertensão, edema e proteinúria associados às convulsões da eclâmpsia (Kahhale; Zugaib, 1995).

A PE atinge de 2 a 5% de todas as gestações e é uma das principais causas de morbidade e mortalidade maternas e perinatais (Hutchinson *et al.*, 2009). Além disso, essa doença contribui para aumentar a morbidade neonatal devido ao maior risco de prematuridade, sofrimento fetal, restrição de crescimento e até mesmo óbito intra-uterino (Helewa *et al.*, 1997; Sibai *et al.*, 1998; Granger *et al.*, 2001; Roberts *et al.*, 2003; Steegers *et al.*, 2010). A PE também pode levar a complicações na gestação que aumentam o risco de hipertensão crônica futura (Wolf *et al.*, 2004).

A definição de PE utilizada na Clínica Obstétrica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo considera o desenvolvimento de hipertensão (pressão arterial $\geq 140/90$ mmHg) com proteinúria significativa (≥ 300 mg/24h) e/ou edema de mãos e face. Ocorre principalmente em primigestas, após a 20ª semana de gestação ou anteriormente a esse

período na moléstia trofoblástica. Pode ser dividida em forma leve, descrita anteriormente, e grave (PA $\geq$ 160/110 mmHg avaliada em duas medidas consecutivas com intervalo de 1-2h e paciente em repouso, proteinúria de 24h $\geq$ 500 mg e edema generalizado, dentre outros sinais) (Kahhale; Zugaib, 1995; Zugaib, 2012). Em casos graves, a PE pode evoluir para eclâmpsia e/ou síndrome HELLP (Xia; Kellens, 2009).

A etiologia da PE permanece desconhecida, porém numerosas teorias buscam explicar sua causa(s) (Helewa *et al.*, 1997; Granger *et al.*, 2001). Há várias teorias etiopatogênicas propostas, baseadas em fatores genéticos, imunológicos, inflamatórios e nutricionais (Harris, 2010); além da invasão trofoblástica intersticial anormal (Hutchinson *et al.*, 2009; Harris, 2010). Vale notar que na gestação ocorrem modificações devido à interação entre o feto (com carga paterna) e os tecidos maternos. E é a partir da tolerância imunológica entre estes tecidos que a gravidez se desenvolve ou não com alterações anatômicas, funcionais e bioquímicas. Entretanto, na PE muitas das alterações fisiológicas constituem falhas nos mecanismos normais de compensação (Roberts *et al.*, 2003).

As principais hipóteses para o surgimento do quadro envolvem alterações imunes e útero-placentárias no início da gravidez (Hsu; Nanan, 2014). A placenta é essencial para a troca de nutrientes, oxigênio e metabólitos entre mãe e feto. Portanto, vascularização e angiogênese adequadas são essenciais para o bom desenvolvimento fetal (Steeegers *et al.*, 2010) (Figura 1).

Figura 1 - Teorias etiopatogênicas na Pré-eclâmpsia. A figura delineia a teoria que a pré-eclâmpsia é um distúrbio dividido em dois estágios. A etiologia da doença permanece desconhecida, porém há várias teorias etiopatogênicas propostas baseadas em fatores inflamatórios, genéticos, estresse oxidativo, dentre outros. O estágio 1 (pré-clínico) seria causado pela atuação desses fatores e problemas na diferenciação/invasão trofoblástica que levariam à placentação anormal, hipóxia, inflamação e estresse oxidativo. O estágio 2 (síndrome clínica) seria caracterizado pela liberação de fatores placentários e citocinas pró-inflamatórias na circulação materna, levando a uma resposta inflamatória sistêmica exacerbada e disfunção endotelial. Consequentemente, isso poderia alterar o equilíbrio da gestação levando à presença de proteinúria e hipertensão, sinais e sintomas clássicos de PE após 20 semanas de gestação (Borzychowski *et al.*, 2006).

A placentação normal envolve duas etapas; a intersticial e a endoarterial. Esta última, na gravidez normal, se faz em duas etapas. A primeira etapa inclui a aderência de células trofoblásticas à parede das artérias espiraladas apenas no nível da decídua basal. A segunda consiste no avanço destas artérias, até sua porção miometrial. Na segunda metade da gestação, estas células trofoblásticas quase desaparecem e transformam as artérias espiraladas em útero-placentárias. Consequentemente, o leito vascular passa a ser um sistema de baixa pressão, resistência e fluxo elevados (Mutter; Karumanchi, 2008).

Na PE, a invasão trofoblástica ainda ocorre, mas a endoarterial não se desenvolve completamente. Diante disso, não há diminuição da resistência vascular e incremento do fluxo sanguíneo, já que o sistema permanece de alta resistência e com fluxo reduzido. Como não há vasodilatação adequada a dominância das prostaglandinas não se desenvolve e ocorre aumento da ação vasoconstritora do tromboxano (TXA₂) (Kahhale; Zugaib, 1995; Mutter; Karumanchi, 2008).

Essas anormalidades levam à hipoperfusão, estresse oxidativo e consequente hipóxia placentária, com liberação de fatores placentários como sFlt-1 e VEGF; além de alterações no perfil de citocinas, o que gera uma resposta inflamatória exacerbada que contribui para a disfunção endotelial (Borzychowski *et al.*, 2006).

Diante de uma etiologia desconhecida torna-se complicado falar em prevenção. Entretanto, a existência de fatores predisponentes deve ser considerada. E uma boa anamnese e exame clínico permitem distinguir quais pacientes merecem maiores cuidados (Kahale; Zugaib, 1995).

3.1.2 Pré-eclâmpsia como uma resposta imune inata

Mediadores imunológicos estão intimamente envolvidos em muitos aspectos da gestação; da implantação e placentação até o parto. Assim, a imunomodulação específica da gestação é um pré-requisito para seu sucesso e também para proteção do feto contra um ataque de células imunológicas maternas (Saito *et al.*, 2007; Redman; Sargent, 2010). Acredita-se que vários fatores conduzam à PE, e sistema imunológico alterado poderia estar envolvido na etiopatogenia da doença devido ao desequilíbrio entre as citocinas características das respostas Th1/Th2 (Saito *et al.*, 2007; Szarka *et al.*, 2010), gerando resposta inflamatória exacerbada e placentação inadequada (Zugaib, 2012).

O sistema imune é classificado em inato e adaptativo. Quando um microrganismo invade o corpo, o sistema imune inato reconhece-o via receptores de reconhecimento de padrões, dentre eles os do tipo *toll-like* (TLRs) presentes em neutrófilos, macrófagos/monócitos e células NK, ativando-o. Neste processo, são produzidas citocinas inflamatórias como IL-1, IL-6 e TNF que aumentam a atividade de neutrófilos e monócitos. Alguns dias após do início desse processo é estabelecida a imunidade adaptativa que divide-se em celular e humoral. Células Th1, que induzem inflamação, e citocinas tipo 1 como IL-2, TNF e IFN- γ , são importantes na resposta celular. Por outro lado, células Th2, que regulam a inflamação juntamente com células T, e citocinas tipo 2 como IL-4, IL-5, IL-6 e IL-13 são importantes na resposta humoral (Saito *et al.*, 2007).

Em mulheres grávidas normais, neutrófilos de sangue periférico e monócitos apresentam-se ativados; e a própria invasão do trofoblasto é um ativador do sistema imune inato. Entretanto, o sistema imune adaptativo, que inclui células T e B, não expressa marcadores de ativação durante uma gravidez normal. Assim, o sistema imune muda drasticamente na PE com intensa ativação de neutrófilos, monócitos, linfócitos, células CD4+T e CD8+T (Saito *et al.*, 2007). Acredita-se que a resposta Th2 seja importante no sucesso da gestação normal devido à sua função regulatória, porém na PE observa-se uma resposta Th1 exagerada com produção das citocinas características dessa via como o TNF, IL-2 e IFN- γ (Saito *et al.*, 2007; Laresgoiti-Servitje *et al.*, 2010).

A gravidez é uma condição única na qual tem-se a presença do feto e de um órgão específico; a placenta. Portanto, devemos considerar o perfil de citocinas também em células imunocompetentes, além da placenta e decídua. Essas células imunocompetentes parecem estar ativadas na PE e apresentam diferentes funções na interface materno-fetal (Saito *et al.*, 2007).

3.2 CORTISOL

Hormônios corticosteróides regulam muitos dos processos necessários para uma implantação bem sucedida do embrião, bem como para o subsequente crescimento e desenvolvimento do feto e da placenta. No útero, o endométrio, a placenta e o embrião são constantemente expostos ao principal glicocorticóide fisiológico; o cortisol (Michael; Papageorgiou, 2008).

A produção adrenal de cortisol obedece a um ritmo diário, sendo mais elevada pela manhã e mais baixa a noite. Sua secreção está sob controle hipotalâmico através da liberação de hormônio liberador de corticotrofina (CRH). Os neurônios que contém CRH localizam-se nos núcleos paraventriculares do hipotálamo e ao serem estimulados liberam o CRH que se liga a receptores, direcionando a síntese e secreção de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH). Este, por sua vez, aumenta a síntese de hormônios esteróides em todas as zonas do córtex adrenal. O cortisol reage com receptores nas células-alvo e por ser lipossolúvel pode se difundir facilmente através da membrana (Guyton, 2006).

O cortisol é um importante hormônio na resposta ao estresse e, conseqüentemente leva a um aumento da pressão arterial. Sua ação é antagonista à da insulina e análoga à do glucagon. Suas principais funções incluem a estimulação da gliconeogênese, efeitos anti-inflamatórios, supressão da resposta imunológica e a manutenção da reatividade vascular às catecolaminas (aumenta a sensibilidade ao efeito vasoconstritor da noradrenalina). Assim, um aumento nos níveis deste hormônio na circulação e alterações no metabolismo podem levar à resistência à insulina, fortemente associada à hipertensão e disfunção endotelial, características observadas na PE (Vianna *et al.*, 2011).

A gestação é considerada um estado sustentado de hipercortisolismo. Estudos mostram que há um ritmo diurno de cortisol persistente ao longo da gravidez com aumento nos níveis absolutos conforme a gestação avança (Allolio *et al.*, 1990; Ho *et al.*, 2007). Alguns autores acreditam que os níveis

elevados de hormônios de estresse na circulação materna possam ter uma importante função na patogênese da PE através de duas possíveis vias: elevação do nível de estresse oxidativo na circulação materna e prejuízo do fluxo uteroplacentário (Vianna *et al.*, 2011). Já Sikkema *et al.* (2001) avaliaram os níveis de ansiedade materna e não observaram aumento dos níveis de cortisol em gestantes com PE leve. Entretanto, este estudo apresentava limitações, pois apenas PE leve foi avaliada. Mais estudos são necessários para avaliar esses resultados em pacientes com PE severa.

Ho *et al.* (2007) encontraram aumento progressivo do cortisol após a 36ª semana em gestações normais. Sabe-se que a gestação é um estado de hiperatividade sustentada do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA). E esse aumento significativo do cortisol materno seria atribuído à preparação do corpo para as demandas do trabalho de parto e auxiliando na maturação fetal. Entretanto, no mesmo estudo, essas concentrações estavam reduzidas nos casos de PE. Acredita-se que isso ocorra devido à redução do ACTH materno secundário aos mecanismos de feedback negativo ou incapacidade da placenta para induzir a ativação do eixo HPA materno. O achado de níveis reduzidos de cortisol livre e total em transtornos relacionados à gravidez é surpreendente, especialmente na PE; uma vez que estes estados estão associados com a ativação imune que geralmente estimula a atividade do eixo HPA. Este achado pode estar associado à disfunção placentária que poderia levar à ativação compensatória do eixo HPA fetal.

3.3 GLÂNDULA PINEAL

3.3.1 Síntese de melatonina

A pineal é um órgão que foi descrito há mais de 2000 anos. Entretanto, sua identificação como um órgão distinto foi feita entre os séculos III e IV a.C. por Herophilus. A glândula foi assim batizada pelo médico e filósofo Cláudio Galeno devido ao seu formato de pinha (Axelrold, 1974). No século XVII, René Descartes (1596-1650) escreveu tratados sobre como o corpo e alma humana interagiam e se conectavam. Nesse contexto, a pineal seria o elo de ligação entre corpo e alma; a sede da alma racional (Arendt, 1995). Os estudos sobre a glândula pineal tiveram poucos progressos até a segunda metade do século XX. Em 1958, Aaron Lerner, estudando a coloração da pele em anfíbios descobriu uma substância capaz de agregar melanóforos (Lerner *et al.*, 1958). Posteriormente, essa substância foi isolada e caracterizada recebendo o nome de melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) (Hardeland *et al.*, 2006). A partir daí, diversos estudos demonstraram a importância do fotoperíodo na adaptação das espécies, regulando a fisiologia e o comportamento reprodutivo (Hoffman; Reiter, 1965a,b).

Posteriormente, foram investigados outros locais de produção deste hormônio, sua via bioquímica, efeitos pleiotrópicos e o caráter rítmico com que a pineal produz melatonina (Lerner *et al.*, 1960; Quay, 1963, 1964). Estudos pioneiros de fisiologia e comportamento reprodutivo de roedores demonstraram a pineal como reguladora de processos biológicos temporalmente regulados (Simmoneaux; Ribelayga, 2003); além de

caracterizarem um dos primeiros papéis da melatonina: a sincronização dos ritmos endógenos às variações ambientais (Menaker *et al.*, 1997).

A pineal é caracterizada como um transdutor neuroendócrino que converte sinalizações neurais em endócrinas. Em humanos, seu desenvolvimento se inicia a partir do segundo mês de vida embrionária, a partir de uma evaginação do teto do terceiro ventrículo e sua localização permanece a mesma até a vida adulta (Oksche, 1965; Quay, 1970).

Em mamíferos, é caracterizada por diversos tipos celulares; mas as células predominantes são os pinealócitos, responsáveis pela produção de melatonina (Møller; Baeres, 2002). Mas, também podemos encontrar células da glia (astroglia e microglia), macrófagos (Pedersen *et al.*, 1993; Sato *et al.*, 1996) e células neuronais (Møller, 1997), com destaque para os neurônios simpáticos que correspondem à principal inervação da pineal (Kappers, 1960).

A glândula é altamente vascularizada recebendo suprimento sanguíneo através de pequenas ramificações arteriolares (Stanley, 1994). A pineal é um órgão circumventricular, situado fora da barreira hematoencefálica; o que permite uma comunicação direta entre sangue e o líquido (Reiter, 1981, Møller; Baeres, 2002). Sua inervação é complexa com fibras de diferentes origens (Kappers, 1960), mas a principal é composta de fibras pós-ganglionares simpáticas que liberam os mediadores clássicos dessa via; noradrenalina adenosina trifosfato (ATP) (Mortani-Barbosa *et al.*, 2000) e o neuropeptídeo Y (NPY) (Simmoneaux; Ribelayga, 2003). A noradrenalina é o principal indutor na síntese de melatonina e sua liberação

é regulada por uma via proveniente dos núcleos supraquiasmáticos hipotalâmicos (NSQ) que recebem as informações via trato retino-hipotalâmico (Kappers, 1960). Já o ATP e NPY atuam como co-transmissores regulando a estimulação adrenérgica. O ATP interage com receptores P2Y potencializando a síntese de melatonina induzida por noradrenalina (Ferreira *et al.*, 1994; 2003). E o NPY regula estimulação noradrenérgica tanto de maneira pré-sináptica (Olcese, 1991) como diretamente nos pinealócitos (Simonneaux *et al.*, 1994).

O controle da síntese de melatonina é exercido pelo NSQ, sede do relógio biológico central, sincronizado com o ciclo claro/escuro ambiental através de uma comunicação neural direta com a retina (Reppert; Weaver, 2002). A retina recebe a informação luminosa, convertendo-a em sinais neurais que são enviados via trato via trato retino-hipotalâmico aos NSQ (Simonneaux; Ribelayga, 2003). Estes projetam-se para o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) promovendo a liberação de GABA. Assim, durante a fase de claro, este sinal inibitório GABAérgico inibe a produção de melatonina pela pineal (Kalsbeek *et al.*, 2000). Na fase de escuro, uma via glutamatérgica ativa o PVN a partir dos NSQ, promovendo ativação de uma via polineural à coluna intermediolateral da medula espinal (Tectemariam-Mesbah *et al.*, 1999). Fibras simpáticas pré-ganglionares projetam-se para o gânglio cervical superior que emite neurônios que inervam a pineal e liberam noradrenalina, o que leva à produção de melatonina (Wurtman *et al.*, 1967; Mortani-Barbosa, 2000).

A noradrenalina atuam sobre adrenoceptores, principalmente os do tipo β_1 e a ativação destes receptores é fundamental para a síntese de melatonina (Klein *et al.*, 1983). A ativação de receptores β_1 induz à ativação de proteína G estimulatória (Gs) que ativa adenilil ciclase (AC) levando à formação de monofosfato de adenosina cíclico (AMPc). O AMPc ativa a proteína quinase dependente de AMPc (PKA) induzindo a transcrição do gene da enzima arilalquilamina N-acetiltransferase (AA-NAT), passo este fundamental para a biossíntese de melatonina (Baeler *et al.*, 1997). A via também pode ser ativada pela ação da noradrenalina em receptores α -adrenérgicos e de ATP em receptores P2Y, ativando uma via dependente de inositol-trifosfato (IP₃) que gera aumento intracelular de cálcio (Ca²⁺) e da atividade da proteína quinase dependente de Ca²⁺ (PKC). A PKC promove aumento de AMPc potencializando a formação de melatonina (Tzavara *et al.*, 1996; Ferreira *et al.*, 2003).

A via de formação de melatonina inicia-se com a captação do aminoácido essencial triptofano proveniente da circulação. Este precursor será hidroxilado a 5-hidroxitriptofano (5-HTP) pela enzima triptofano hidroxilase (TPH1) e em seguida descarboxilado pela descarboxilase de ácidos aromáticos (AAAD) formando serotonina (5-HT). Posteriormente, a serotonina será acetilada pela enzima AA-NAT a N-acetilserotonina (NAS) metilada e convertida a melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) pela ação da HIOMT ou ASMT (Axelrold; Weissbach, 1960; Voisin *et al.*, 1984; Reiter *et al.*, 2000) (Figura 2).

Figura 2 - Via de síntese de melatonina. Esquema representativo da via de produção de melatonina. A produção se inicia com a captação do aminoácido triptofano, convertido a 5-hidroxitriptofano (5-HTP), posteriormente convertido a serotonina (5-HT). Esta, sob ação da AA-NAT, é acetilada e convertida a N-acetilserotonina (NAS), posteriormente metilada pela HIOMT (ASMT) para formar melatonina liberada na corrente sanguínea. Baseado em Reiter *et al.*, 2000.

A melatonina é uma molécula altamente lipofílica, produzida e imediatamente secretada corrente sanguínea e com uma meia-vida curta de aproximadamente 30 minutos, sendo rapidamente metabolizada no fígado, onde é hidroxilada e conjugada a um sulfato formando 6-sulfatoximelatonina,

excretada na urina (6-SMT) (Simmoneaux; Ribelayga, 2003). A quantidade encontrada no plasma é de aproximadamente 100 pM na fase de escuro (Reiter, 1981).

Há diferenças na regulação da síntese de melatonina entre as diferentes espécies de vertebrados. Em roedores, o caráter rítmico da produção desta indolamina é conferido pela expressão gênica de AA-NAT e relacionado à sinalização noradrenérgica. Já em ungulados e primatas o gene é transcrito e a proteína degradada continuamente ao longo do dia (Schomerus *et al.*, 2000).

3.3.2 Efeitos da melatonina

A melatonina consiste em molécula muito conservada filogeneticamente, sendo encontrada desde algas unicelulares a vertebrados complexos (Nowak; Zawilska, 1998). Desde sua descoberta vem sendo descrita como reguladora do ritmo circadiano, sinalizando a presença e duração da fase de escuro ambiental e sincronizando o relógio biológico; o que faz dela um importante fator na regulação dos mais diversos aspectos fisiológicos (Carrillo-Vico, 2005a; Hardeland *et al.*, 2006). Atua através de receptores de membrana acoplados à proteína G (MT₁ e MT₂) ou por mecanismos independentes de receptores (Markus; Tamura, 2009).

Os receptores MT₁ e MT₂ diferem entre si pela atividade de seus ligantes, mas ambos são responsáveis pelos efeitos cronobióticos deste hormônio nos NQS. Também podem ser expressos em diversos outros

órgãos e tecidos periféricos contribuindo para a ampla gama de ações da melatonina como a ativação do sistema imunológico e controle vasomotor (Dubocovich; Markowska, 2005).

A melatonina pode ser produzida por diversos outros órgãos e tecidos (Hardeland *et al.*, 2011) e apresenta efeito pleiotrópico podendo atuar como agente endócrino ou parácrino (Markus *et al.*, 2007). Também atua como potente antioxidante, sequestrando radicais livres e potencializando a ação de enzimas antioxidantes (Garcia-Mauriño *et al.*, 1997; Hardeland *et al.*, 2006). Entretanto, uma de suas funções mais estudadas consiste em sua propriedade imunomoduladora. Além de sua função cronobiótica sobre o sistema imune, a administração exógena e a produção extra-pineal modulam esse sistema. E diversos estudos mostraram que células imunocompetentes quando ativadas, podem sintetizar melatonina localmente atuando de forma parácrina e autócrina (Garcia-Mauriño *et al.*, 1997; Skwarlo-Sonta *et al.*, 2003; Pontes *et al.*, 2006; Markus *et al.*, 2007). A produção extra-pineal costuma ocorrer em situações que envolvem quadros inflamatórios (Slominski *et al.*, 2005). Nesse caso, são produzidas grandes quantidades de melatonina (μM - mM), o que contrasta com as concentrações sanguíneas resultante da produção pineal (pM - nM).

Além disso, estudos revelam que em altas concentrações, este hormônio pode estimular produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-2, IL-6 e IFN- γ em células mononucleares do sangue de humanos (Garcia-Mauriño *et al.*, 1997), aumentar a proliferação de linfócitos T, a apresentação de antígenos e atividade fagocitária destes (Pontes *et al.*, 2006), aumentar a

atividade de células linfoides, baço e medula óssea e a regulação da síntese de óxido nítrico por células endoteliais (Tamura *et al.*, 2009). Entretanto, em concentrações compatíveis com as do plasma a melatonina parece exercer efeito antiinflamatório, interferindo na migração celular ao inibir o rolamento e adesão de células imunocompetentes (Lotufo *et al.*, 2001).

Assim, seu efeito sobre o sistema imune é dependente do local de produção e quantidade produzida, e não pode ser caracterizado apenas como pró ou anti-inflamatório.

3.3.3 Eixo Imune-Pineal

A percepção da interação entre os sistema imune e a pineal data da década de 70 (Vaughan; Reiter, 1971, Skawlo-Sonta *et al.*, 2003). Os estudos iniciais baseavam-se em diversos parâmetros imunológicos, analisando principalmente os órgãos linfóides (Csaba; Barath, 1975). Porém, ao longo das últimas décadas, diversos pesquisadores têm estudado o papel da melatonina nas funções de defesa (Nelson; Demas, 1997; Maestroni, 1998; Srinivasan *et al.*, 2008).

Estudo realizado utilizando modelo de inflamação crônica através da injeção de Bacilo Calmette-Guérin (BCG) em patas de ratos, observou que a melatonina produzida pela pineal impunha um ritmo na lesão. O edema da pata era maior durante o dia que à noite. Nessa situação, a retirada da pineal aboliu o ritmo do edema, posteriormente restaurado com administração noturna de melatonina (Lopes *et al.*, 1997). No mesmo estudo foi realizada adrenalectomia a fim de verificar o efeito do glicocorticóide

endógeno. Nesse caso, observou-se que a falta de glicocorticóide levava à perda do ritmo de lesão, restaurado com administração exógena de melatonina. Além disso, a excreção do metabólito de melatonina também seria perdida; o que confirma uma interação entre adrenal e pineal (Lopes *et al.*, 2001). Posteriormente, confirmou-se que a corticosterona seria capaz de modular positivamente a síntese de melatonina *in vivo* (Ferreira *et al.*, 2005) e *in vitro* (Fernandes *et al.*, 2009).

Mediadores imunológicos exercem efeitos sobre a pineal e, diversos estudos mostraram que citocinas e outros sinalizadores inflamatórios podem afetar a função da glândula (Fernandes *et al.*, 2006, 2009; da Silveira Cruz-Machado *et al.*, 2010). Assim, pesquisadores investigaram a responsividade da pineal a substâncias pró-inflamatórias, como o TNF. Pois, no início da resposta imune inata os níveis desta citocina são altos e levam à inibição da síntese de melatonina pela pineal (Markus *et al.*, 2007). Estudo avaliando mulheres com mastite demonstrou que durante o processo inflamatório há altos níveis de TNF e perda do ritmo diário de melatonina, sendo este restaurado após a resolução do processo inflamatório com queda simultânea nos níveis desta citocina (Pontes *et al.*, 2006).

Assim, substâncias pró e anti-inflamatórias possuem efeitos antagônicos quanto à modulação da via de síntese da pineal.

Portanto, em casos de injúria, células imunocompetentes ativadas passariam a produzir melatonina em altas concentrações no local do processo inflamatório, bloqueando a produção pineal a fim de permitir uma ativação eficaz do sistema imune e resolução do processo inflamatório.

Consequentemente, com a resolução da inflamação, diminuição dos fatores inibitórios e aumento da corticosterona circulante, a produção de melatonina pela pineal seria restaurada (Lotufo *et al.*, 2006; Markus *et al.*, 2007).

Dados sugerem que o fator NF-kB esteja envolvido nas respostas observadas, pois esse fator é expresso na pineal e apresenta um ritmo diário com acúmulo no final da fase de claro (Cecon *et al.*, 2010). Sabe-se que a ativação da via NF-kB por fatores como TNF e LPS bloqueia (Fernandes *et al.*, 2006; da Silveira Cruz-Machado *et al.*, 2010), enquanto que a inibição por corticosterona potencia a síntese de melatonina em pineais em cultura (Ferreira *et al.*, 2005).

Isso sugere uma comunicação bidirecional entre a glândula pineal e o sistema imunológico que levou ao desenvolvimento do conceito de eixo imune-pineal. Segundo a proposta do eixo imune-pineal, a melatonina é sintetizada ritmicamente pela pineal. Porém, em situações de injúria, a glândula interrompe sua produção para permitir a montagem de uma resposta inflamatória eficiente. Neste mesmo conceito, células imunocompetentes ativadas passariam a produzir melatonina em grandes quantidades no local da inflamação e esta atuaria de maneira parácrina, exercendo efeito antioxidante e anti-inflamatório. E após a resolução da lesão, o aumento dos níveis de glicocorticóides circulantes levaria ao retorno da síntese de melatonina pela pineal (Markus *et al.*, 2007) (Figura 3).

Figura 3 - Proposta do Eixo imune-pineal e Pré-eclâmpsia. Neste diagrama estão delineados três momentos – condição de hígidez, fase pró-inflamatória e fase de recuperação de uma resposta imune inata. Em sujeitos hígidos o NSQ controla produção de melatonina em concentrações que reduzem a migração de leucócitos para os tecidos. Entretanto, a ativação de uma resposta inflamatória leva à inibição da produção de melatonina pela glândula pineal, o que colabora para a migração de células polimorfo e mononucleares para o local da lesão e eficiente montagem da resposta inflamatória. Este processo caminha para a resolução quando as células ativadas passam a produzir mediadores que reduzem a resposta inflamatória. Dentre estes mediadores está a melatonina. Por outro lado, no organismo como um todo, níveis aumentados de glicocorticóides e de IFN- γ favorecem a produção de melatonina na pineal. Acreditamos que o quadro de pré-eclâmpsia se enquadre tanto na fase de inflamação quanto na fase de resolução, já acredita-se que o problema se inicia na fase de implantação e o diagnóstico é feito após 20 semanas de gestação. Adaptado de Markus e Ferreira, 2011.
Mol. Ad.: Moléculas de adesão

3.3.4 Melatonina e gestação

Mesmo antes da descoberta de melatonina na glândula pineal, o órgão já era relacionado à reprodução (Lerner *et al.*, 1958; Reiter *et al.*, 2014). A década de 60 foi acompanhada por uma série de estudos que

avaliaram a pineal como um transdutor neuroendócrino e provaram sua ligação com o eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (Hoffman; Reiter, 1965; Reiter *et al.*, 2014). Sabe-se que a melatonina apresenta importante função na manutenção da gestação e no parto (Chen *et al.*, 2013). Esta indolamina é muito eficaz no combate ao estresse oxidativo, pois tem a capacidade de cruzar a barreira hematoencefálica, bem como a barreira placentária; protegendo a placenta e o feto (Schenker *et al.*, 1998; Okatani *et al.*, 1999).

No sistema reprodutor, a produção de melatonina é relatada no ovário, no ócito *per se*, nas células que circundam o oócito e na placenta (Reiter *et al.*, 2014). O trofoblasto viloso não é apenas uma fonte de melatonina, mas também contém receptores transmembrana MT₁ e MT₂ (Lanoix *et al.*, 2008; 2012).

Durante a gravidez normal, a melatonina atua como antioxidante e tem papel essencial na manutenção da gestação. Sandyk *et al.* (1992) encontraram associação entre melatonina e abortos espontâneos sugerindo que a melatonina diminui as contrações uterinas devido à diminuição dos níveis de prostaglandinas.

Os níveis séricos de melatonina na gestação foram relatados em estudos com ovelhas e ratos. E esses níveis apresentam, na circulação materna, um ritmo diurno que constitui um importante sinal para o feto do ciclo claro/escuro. Mas as variações séricas e sua função em humanos ainda não são bem compreendidas (Nakamura *et al.*, 2001).

Porém, em gestações normais estas variações diárias de melatonina mostram uma tendência crescente para o final da gravidez, entretanto esse

aumento não é significativo. Já o nível noturno é maior que o diurno ao longo da gestação e aumenta gradualmente após 24 semanas de gestação, exibindo níveis maiores após a 32ª semana e queda a níveis não-gravídicos no 2º dia de puerpério em gestações normais (Nakamura *et al.*, 2001).

Kivela (1991) observou uma correlação positiva entre os níveis de melatonina / semana de gestação com aumento da concentração deste hormônio durante o terceiro trimestre comparado com o primeiro e segundo trimestre e com pacientes controle não grávidas (Kivela, 1991).

3.3.5 Melatonina e pré-eclâmpsia

A placentação anormal está implicada na patogênese da pré-eclâmpsia e aborto. A PE constitui um elevado estado de estresse oxidativo com geração de grande quantidade de radicais livres e queda nos níveis de antioxidantes. Assim, o aumento do estresse oxidativo placentário está implicado na etiopatogênese da PE (Reiter *et al.*, 2014; Hung; Burton, 2006). Esta tem sido proposta como um distúrbio em dois estágios: primeiro a placenta produz um fator citotóxico e depois a resposta materna a esse fator placentário leva à formação de espécies reativas de oxigênio (Tamura *et al.*, 2008).

Nakamura *et al.* (2001) observaram que pacientes com PE grave apresentam níveis séricos noturnos de melatonina significativamente mais baixos que em indivíduos com PE leve ou gestantes normais após 32 semanas. Os níveis de melatonina no soro materno apresentam um ritmo diário e um aumento até o final da gestação. E uma aparente diminuição

desses níveis na PE grave sugere envolvimento da melatonina na patogênese desta doença.

Entretanto, outro estudo mostra que os níveis de melatonina são significativamente maiores em gestações com PE quando comparadas com gestantes normotensas. O ritmo de melatonina seria perdido devido à perda do ritmo de pressão arterial já que a melatonina também apresenta correlação com o mecanismo de regulação cardiovascular. Porém, após a gestação, enquanto mulheres normotensas recuperariam ambos os ritmos; aquelas com PE recuperariam apenas o ritmo de pressão arterial e não o de melatonina. Assim, seu ritmo estaria ausente durante e após a gestação (Tranquilli *et al.*, 2004).

Isto sugere uma prioridade temporal ou causal da concentração circadiana de melatonina na determinação da pressão arterial. O que contrasta com a teoria da independência da pressão arterial a partir de relógios endógenos e reforça o papel da melatonina na regulação da pressão durante gravidez. A persistência de um ritmo alterado durante a gravidez sugere que mulheres com mudanças na concentração circadiana deste hormônio apresentem maior risco para alterações do ritmo da pressão arterial ou para PE (Tranquilli *et al.*, 2004).

Recente *trial* australiano pretende avaliar, se a administração oral de melatonina pode trazer benefícios clínicos e bioquímicos em gestantes com pré-eclâmpsia. O estudo também pretende avaliar o efeito do tratamento oral com melatonina sobre os resultados clínicos de gestantes com pré-eclâmpsia, bem como o efeito dessa melatonina sobre o estresse oxidativo

na circulação placentária e fetal materna. Pois, os autores acreditam que a melatonina, devido à sua função de potente oxidante, pode tornar-se um tratamento padrão nas gestações complicadas pela doença (Hobson *et al.*, 2014).

4 Métodos

4 MÉTODOS

Trata-se de um estudo prospectivo caso-controle

Foram constituídos 2 grupos de pacientes:

- a. Grupo controle: gestantes saudáveis com mais de 20 semanas de gestação.
- b. Grupo estudo: gestantes com diagnóstico confirmado de pré-eclâmpsia (considerando pressão arterial $\geq 140/90$ mmHg e proteinúria $> 300\text{mg}/24\text{h}$ a partir da 20ª semana e/ou edema de mãos e face).

4.1 PACIENTES

Foram analisadas amostras sanguíneas e urinárias provenientes de gestantes saudáveis (grupo CONTROLE) e gestantes com conceituação clara e precisa de PE sem hipertensão crônica (grupo PE). As amostras foram obtidas no momento do diagnóstico de PE e em gestantes normais (controles) com a mesma idade gestacional. As gestações foram selecionadas na Clínica Obstétrica do Hospital das Clínicas, da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo no período de Outubro de 2010 a Outubro de 2013.

4.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

- gestação única,
- diagnóstico de PE (surgimento de hipertensão arterial + edema de mãos e/ou face + proteinúria significativa) e sem uso de β -bloqueadores (antes de sua introdução),
- termo de consentimento livre e esclarecido assinado pela paciente.

4.3 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

- doenças maternas como hipertensão arterial crônica, cardiopatias, pneumopatias, anemias, ausência de história de tabagismo e/ou etilismo (grupo controle),
- sofrimento fetal,
- mecônio intraparto,
- uso de β -bloqueadores,
- parto prematuro,
- amniorrexe prematura,
- anomalias fetais congênitas.

Todas as pacientes foram esclarecidas acerca do projeto de pesquisa e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido, com aprovação da Comissão de Ética para análise de projetos de pesquisa (CAPPEsq) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, protocolo nº 0254/10 de 29 de julho de 2010 (anexo 1).

4.4 MÉTODO

4.4.1 Coleta das amostras de sangue

As gestantes diagnosticadas com pré-eclâmpsia foram internadas e as amostras colhidas no período da manhã (07h00 às 11h00) e a noite (23h00 à 01h00), subsequentes ao diagnóstico. O grupo controle foi constituído por gestantes com idade gestacional pareada. Nesse grupo, as coletas foram feitas nas residências das pacientes, nos horários acima mencionados. A coleta foi realizada em condições assépticas mediante uma única punção usando tubos de 5 mL contendo gel separador. Em cada punção eram colhidos 40 mL de sangue. Imediatamente após a coleta, as amostras foram centrifugadas no Laboratório Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP (2000 rpm, 10 min, 4°C) e aliquotadas (1 mL).

O soro foi obtido e as amostras foram armazenadas a -80°C no Laboratório de Cronofarmacologia do Instituto de Biociências da USP (LCF-IBUSP). O transporte de amostras entre as duas instituições foi realizado em gelo seco.

4.4.2 Coleta de amostras de urina

Em todas as pacientes foram colhidas amostras da urina de 24h. Toda urina foi acondicionada em frascos individuais e estéreis com os horários de micção anotados nos respectivos frascos; posteriormente armazenados em geladeira. O volume urinário de cada frasco foi mensurado

e foram feitas alíquotas proporcionais para os seguintes intervalos: 12h00 – 18h00, 18h00 – 24h00, 24h00 – 06h00 e 06h00 – 12h00.

As amostras de urina foram utilizadas para dosagem de 6-sulfatoximelatonina (LCF- IBUSP) e de creatinina (Laboratório Central – HCFMUSP).

4.5 DOSAGENS

4.5.1 Dosagem de citocinas no soro por imunoensaio *Multiplex*

A dosagem do conteúdo de TNF, IL-8, IL-6, IL-1 β , IFN- γ , IL-4, IL-10, IL-12p40 e IL-17, VEGF foi realizada por imunoensaio com microesferas do tipo Multiplex (MILLIPLEX® MAP Human Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel Kit, Millipore Corporation, Billerica, MA, USA), de acordo com as instruções do fabricante. Cada conjunto de microesferas, utilizadas na detecção das respectivas citocinas, é marcado com uma coloração específica obtida pela combinação de dois fluoróforos. As microesferas são revestidas por anticorpos monoclonais específicos que se associam às citocinas alvo presentes nas amostras. Após a incubação das amostras com as microesferas, adiciona-se uma mistura de anticorpos biotinilados que se ligam a citocinas humanas. Os anticorpos biotinilados são então detectados pelo conjugado ficoeritrina-estreptavidina. O ensaio é analisado com o sistema Luminex MAGPIX® (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) de detecção de fluorescência que emprega dois lasers: o primeiro feixe excita as microesferas, classificando-as pela coloração; o segundo feixe quantifica a fluorescência emitida pelas moléculas de ficoeritrina associadas a cada

microesfera. A concentração de citocinas nas amostras é estimada a partir de curvas padrão construídas com o auxílio do software xPONENT 4.1 (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA).

Nesse kit os limites de detecção para as citocinas dosadas são: TNF: 0.7 pg/mL, IL-8: 0.4 pg/ml, IL-6: 0,9 pg/mL, IL-1 β : 0.8 pg/ml, IL-4: 4,5 pg/ml, IFN- γ : 0,8pg/mL; VEGF: 26,3 pg/ml; IL-10: 8,6 pg/ml, IL-12p40: 7,4 pg/ml; e IL-17: 0,7 pg/ml.

4.5.2 Dosagem de cortisol no soro

A dosagem de cortisol sérico foi realizada pela Divisão de Laboratório Central do HCFMUSP (DLC-HCFMUSP), através de Químioimunoensaio DPC Immulite. O cortisol é dosado no soro, em diagnósticos *in vitro* com analisador IMMULITE (Siemens, Berlim, Alemanha). O DPC Immulite é um imunoensaio competitivo de fase sólida, de enzimas químico-luminosas e que usa anticorpos policlonais de coelho anti-cortisol. Sua sensibilidade analítica é de 0,2 μ g/dL.

4.5.3 Dosagem de melatonina do soro

As dosagens foram realizadas pelo método de ELISA (do inglês: *Enzyme-linked immunosorbent assay*) utilizando-se *kit* comercial (IBL, Hamburgo, Alemanha). Esse ensaio baseia-se na competição entre a melatonina das amostras e melatonina biotinilada pelo anticorpo específico presente na placa. A quantidade de melatonina biotinilada ligada ao

anticorpo é determinada pela adição de um anticorpo anti-biotina, acoplado a uma enzima, a fosfatase alcalina, cuja atividade forma um produto colorimétrico, detectado por espectrofotômetro a 405 nm (SpectraMax 250, Molecular Devices, CA, EUA). A quantidade de melatonina biotinilada presente é inversamente proporcional à quantidade de melatonina presente nas amostras. A quantificação das amostras é realizada por interpolação dos valores em uma curva-padrão. O limite de detecção do *kit* é de 3,0 pg/mL.

4.5.4 Dosagem 6-sulfatoximelatonina na urina

As dosagens foram realizadas pelo método de ELISA (do inglês, *Enzyme-linked immunosorbent assay*) utilizando-se *kit* comercial (IBL, Hamburgo, Alemanha). Este ensaio baseia-se na competição. Uma quantidade indeterminada de antígeno presente na amostra e uma quantidade fixa de antígeno marcado com enzima competem pelos sítios de ligação dos anticorpos que revestem os poços da placa. Após a incubação, os poços são lavados para interromper a reação de competição. Após a reação de substrato, a quantidade de 6-sulfatoximelatonina presente é inversamente proporcional à quantidade de antígeno presente nas amostras. Essa atividade forma um produto colorimétrico, detectado por espectrofotômetro a 450 nm (SpectraMax 250, Molecular Devices, CA, EUA). A quantificação das amostras é realizada por interpolação dos valores em uma curva-padrão. O limite de detecção do *kit* é de 1,0 pg/mL.

4.5.6 Dosagem de creatinina na urina

A dosagem de creatinina foi realizada através da reação de *Jaffé* pela Divisão de Laboratório Central do HCFMUSP. Nesse método a creatinina reage com ácido pícrico, formando um complexo de cor amarelo-avermelhado em meio alcalino. Nesse pH ocorre a máxima formação do complexo creatinina-picrato e, também com outros elementos plasmáticos. Com adição do reagente ácido o pH é diminuído e a cor devida à creatinina é desfeita, permanecendo a cor devida aos cromogênios. Por diferença entre as leituras obtidas no pH ácido obtemos as dosagens de creatinina. O complexo formado absorve fortemente em 520 nm. A variação da velocidade de formação de picrato, sem acidificação do produto formado, é obtida através de duas leituras espectrofotométricas nos primeiros minutos. As leituras assim obtidas são livres da reação do picrato com os cromogênios, permitindo a determinação de creatinina. A dosagem de creatinina é realizada, principalmente, para permitir a normalização dos valores após a dosagem de 6-sulfatoximelatonina conforme recomendação do fabricante do kit de 6-SMT.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O cálculo do tamanho amostral foi baseado em dados da literatura que mostravam que um nível sérico médio de melatonina em gestantes normais de 18 pg/mL e em pacientes com pré-eclâmpsia grave de 85 pg/mL (Nakamura *et al.*, 2001). Considerando um erro alfa de 0,05 e um poder

estatístico de 80%, estimou-se serem necessárias cerca 15 pacientes em cada grupo (*Statistica, StatSoft, Versão 9, EUA*).

A análise dos dados demográficos foi feita utilizando o teste não paramétrico de Mann-Whitney U. Para comparação dos níveis séricos e urinários de citocinas e hormônios entre dois grupos (pré-eclâmpsia e controle) nos diferentes períodos (dia e noite) utilizamos o two-way ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni. E para as correlações utilizamos regressão linear simples e teste de correlação de Pearson (*Graph PadPrism, versão 6*). Considerou-se diferença estatisticamente significativa quando $p < 0,05$.

5 Resultados

5 RESULTADOS

De um total de 31 pacientes inicialmente avaliadas, 14 pacientes com PE e 12 controles (CO) foram incluídas. As características das pacientes (idade materna, paridade e idade gestacional) estão apresentadas na Tabela 1 e foram consideradas semelhantes em ambos os grupos ($p > 0,05$). A idade materna média das pacientes no grupo PE foi de 25,5 anos e no grupo CO de 27,5 anos ($p=0,48$). Todas as pacientes apresentavam pressão arterial, proteinúria e edema de acordo com o critério de classificação estabelecido pela Clínica Obstétrica do HC-HMUSP. A maioria das pacientes, em ambos os grupos, era primigesta (13/14 no grupo PE e 10/12 no grupo CO ($p=0,24$)). A média da idade gestacional no momento do diagnóstico (coleta) foi 35 semanas no grupo PE e 37 semanas no grupo CO ($p=0,28$).

Os níveis de pressão arterial sistólica e diastólica foram significativamente mais elevados nas pacientes com PE (momento do diagnóstico e antes de tratamento) que em gestantes do grupo controle (Tabela 1).

Tabela 1 – Características clínicas dos grupos estudados

Parâmetros	Controle (n=12)	Pré-eclâmpsia (n=14)	P
Idade materna (anos)	27,5 (18-32)	25,5 (16-39)	0,486
IG (semanas)	37,3 (30-39)	34,9 (26-39)	0,28
Paridade	primigesta	primigesta	0,24
Proteinúria (mg/24h)	não detectável	328,78 ± 184,32	
PAS (mmHg)	110,0 (90,0-140,0)	150,0 (130,0-180,0)	<0,001
PAD (mmHg)	70,0 (60,0-95,0)	99,0 (80,0-126,0)	<0,001

IG: Idade Gestacional; PAS: Pressão Arterial Sistólica; PAD: Pressão Arterial Diastólica. A idade está expressa em mediana (mínimo e máximo). Os dados foram analisados utilizando-se Teste de Mann-Whitney U. Significância estatística: $p < 0,05$.

Fonte: HCFMUSP

Período: Outubro/10 a Outubro/13

Das gestantes no grupo PE, 10 pacientes apresentavam diagnóstico de PE leve, sendo que 3 iniciaram uso de Metildopa na dose de 250 mg/d a 500 mg/d após coleta de todos os testes desse estudo. Quatro pacientes apresentaram diagnóstico de PE grave necessitando internação e medicação hipotensora Metildopa na dose 1,5 g/d.

Quanto ao tipo de parto, no grupo PE 5 pacientes evoluíram para parto vaginal normal e 9 foram submetidas à operação cesariana. No grupo CO, 8 gestantes evoluíram ao parto vaginal normal e 4 à operação cesariana. Não houve intercorrências obstétricas durante o trabalho de parto.

5.1 DOSAGEM DE CITOCINAS (TNF, IL-8, IL-6, IL-1 β , IL-4, IFN- γ , VEGF, IL-10, IL-12p40, e IL-17)

Não foi detectada a presença das citocinas IL-6, IL-1 β , IL-10, IL-12p40, IL-17 nas amostras das gestantes controle ou PE. Com relação ao VEGF, 5 de 14 pacientes com PE apresentaram níveis elevados deste modulador (154,17 pg/mL $\pm$ 69,40). Nenhuma gestante controle apresentou níveis elevados VEGF.

Em relação à dosagem de TNF no soro materno, a análise estatística revelou que o quadro clínico apresentou efeito significativo, pois as pacientes com PE apresentaram concentração de TNF significativamente mais elevada que o grupo controle ($p < 0,05$). Este efeito ocorreu de maneira independente do período do dia em que as amostras foram coletadas. Assim, o aumento da produção de TNF foi similar tanto de dia quanto de noite (Figura 4).

Figura 4 - Produção da citocina (dia/noite) pró-inflamatória TNF nos grupos Pré-eclâmpsia e Controle. Os dados estão apresentados em média $\pm$ epm; n = 12 pacientes controle e 14 com pré-eclâmpsia. Two-way ANOVA seguido de Teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ vs grupo controle respectivo.

Fonte: HC-FMUSP

Período: Outubro/10 a Outubro/13

Em relação ao IL-8, nossos dados mostraram que o quadro clínico apresentou efeito significativo, ou seja, os níveis de IL-8 estão significativamente aumentados em pacientes com PE em relação ao grupo controle ($p=0,001$) tanto de dia quanto de noite (Figura 5).

Figura 5 - Produção da citocina (dia/noite) pró-inflamatória IL-8 nos grupos Pré-eclâmpsia e Controle. Os dados estão apresentados em média $\pm$ epm; $n = 12$ pacientes controle e 14 com pré-eclâmpsia. Two-way ANOVA seguido de Teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ vs grupo controle respectivo.

Fonte: HC-FMUSP

Período: Outubro/10 a Outubro/13

Observamos que na dosagem de IL-4 os valores são similares em ambos os grupos tanto de dia quanto de noite, com discreto aumento no período do dia no grupo pré-eclâmpsia, mas sem apresentar diferença significativa (Figura 6).

Figura 6 - Produção da IL-4 (dia/noite) nos grupos Pré-eclâmpsia e Controle. Os dados estão apresentados em média $\pm$ epm; n = 12 pacientes controle e 14 com pré-eclâmpsia. Two-way ANOVA seguido de Teste de Bonferroni.
Fonte: HC-FMUSP
Período: Outubro/10 a Outubro/13

Observamos que tanto a presença de PE quanto o período do dia não apresentaram efeitos significativos sobre os níveis de IFN- γ , entretanto houve tendência de aumento em pacientes com PE quando comparadas com o grupo controle, mas com padrão dia-noite constante (Figura 7).

Figura 7 - Produção das citocina IFN- γ (dia/noite) nos grupos Pré-eclâmpsia e Controle. Os dados estão apresentados em média $\pm$ epm; n = 12 pacientes controle e 14 com pré-eclâmpsia. Two-way ANOVA seguido de Teste de Bonferroni.

Fonte: HC-FMUSP

Período: Outubro/10 a Outubro/13

5.2 DOSAGEM DE CORTISOL

Quanto à dosagem de cortisol, observamos que os níveis deste hormônio durante o dia foram mais altos em ambos os grupos quando comparados com os níveis noturnos ($p < 0,0001$). Pacientes com PE apresentam níveis reduzidos de cortisol em ambos os períodos quando comparados aos respectivos grupos controle (Figura 8).

Figura 8 - Efeito do cortisol nos diferentes grupos e períodos (dia e noite). Dados apresentados em média $\pm$ epm de um n de 12 pacientes controle e 14 com pré-eclâmpsia. Two-way ANOVA seguido de Teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ vs grupos controle respectivo.

Fonte: HC-FMUSP

Período: Outubro/10 a Outubro/13

5.3 DOSAGEM DE MELATONINA

Em relação aos níveis de melatonina observamos que as pacientes controle mantiveram o ritmo dia/noite normal (Figura 9A), porém este padrão não foi observado nas pacientes com PE, devido a uma grande variabilidade entre as gestantes (Figura 9A). Contudo, de modo geral, é possível observar uma tendência de aumento na melatonina circulante nas pacientes com PE (Figura 9B).

Figura 9 - Influência do quadro clínico na variação diária de melatonina em ambos os grupos de pacientes. (A) concentração de melatonina no soro de mães saudáveis (controle) e mães com pré-eclâmpsia nos períodos (dia/noite); dia (símbolo aberto) e noite (símbolo fechado). Cada linha que une dia e noite representa a variação diária de cada gestante. **(B)** Níveis séricos de melatonina nos grupos Controle e Pré-eclâmpsia e nos diferentes períodos (dia/noite). Os dados estão apresentados em média $\pm$ epm de um $n=12$ pacientes controle e 14 com pré-eclâmpsia. Two-way ANOVA seguido de Teste de Bonferroni.

Fonte: HC-FMUSP

Período: Outubro/10 a Outubro/13

5.4 CORRELAÇÃO ENTRE MELATONINA E TNF

Ao analisarmos a possibilidade de correlação entre as concentrações séricas de melatonina e TNF, observamos que existe uma tendência de correlação positiva nas pacientes com PE ($r = 0,35$, $p = 0,09$). Contudo, ao segregarmos as amostras dos pacientes com PE coletadas durante o dia e durante a noite, observamos correlação positiva significativa entre o TNF e a melatonina ($r = 0,65$; $p = 0,02$) durante o dia. Nas amostras coletadas durante a noite as correlações entre os dois parâmetros foram nulas em ambos os grupos, controle e PE (Figura 10).

Figura 10 - Correlação entre os níveis de Melatonina e TNF em pacientes controle e com pré-eclâmpsia (PE) nos respectivos períodos (dia/noite). A,C e E: controles. B, D e F: pacientes PE. C e D: controles e pacientes PE durante o dia. E e F: controles e pacientes PE durante a noite. Os dados foram analisados utilizando-se o coeficiente de correlação de Pearson. * $p < 0,05$ ($p = 0,02$).

5.5 CORRELAÇÃO ENTRE MELATONINA E IL-8

Ao analisarmos as correlações entre os níveis de melatonina e da citocina IL-8, observamos uma correlação muito similar àquela observada com TNF. Constatamos tendência de correlação positiva nos pacientes com PE ($r = 0,32$, $p = 0,12$) (Figura 11A). Contudo, ao segregarmos as amostras dos pacientes com PE coletadas durante o dia e durante a noite, observamos correlação positiva significativa entre o IL-8 e a melatonina ($r = 0,72$; $p = 0,01$) durante o dia (Figura 11D). Nas amostras coletadas durante a noite as correlações entre os dois parâmetros foram nulas em ambos os grupos, controle e PE (Figura 11).

Figura 11 - Correlação entre os níveis de Melatonina e IL-8 em pacientes controle e com pré-eclâmpsia (PE) nos respectivos períodos (dia/noite). A,C e E: controles. B, D e F: pacientes PE. C e D: controles e pacientes PE durante o dia. E e F: controles e pacientes PE durante a noite. Os dados foram analisados utilizando-se o coeficiente de correlação de Pearson. * $p < 0,05$ ($p = 0,01$)

5.6 CORRELAÇÃO ENTRE TNF E IL-8

Ao analisarmos a possibilidade de correlação entre TNF e IL-8 podemos observar correlação positiva e significativa entre o grupo PE ($r = 0,44$, $p = 0,03$) (Figura 12A). Porém, ao analisarmos os grupos separadamente também observamos correlação positiva entre os níveis de TNF e IL-8 nas pacientes com PE no período do dia ($r = 0,62$; $p = 0,03$) (Figura 12D).

Figura 12 - Correlação entre os níveis de IL-8 e TNF em pacientes controle e com pré-eclâmpsia (PE) nos respectivos períodos (dia/noite). A,C e E: controles. B, D e F: pacientes PE. C e D: controles e pacientes PE durante o dia. E e F: controles e pacientes PE durante a noite. Os dados foram analisados utilizando-se o coeficiente de correlação de Pearson. * $p < 0,05$ ($p = 0,03$)

5.7 CORRELAÇÃO ENTRE MELATONINA E CORTISOL

Ao analisarmos a correlação entre melatonina e cortisol observamos correlação positiva entre ambos os hormônios nas pacientes controle dia ($r = 0,64$, $p = 0,06$) (Figura 13C). Não observamos correlação significativa entre os níveis de cortisol e TNF e nem entre cortisol e IL-8.

Figura 13 - Correlação entre os níveis de Melatonina e Cortisol em pacientes controle e com pré-eclâmpsia (PE) nos respectivos períodos (dia/noite). A,C e E: controles. B, D e F: pacientes PE. C e D: controles e pacientes PE durante o dia. E e F: controles e pacientes PE durante a noite. Os dados foram analisados utilizando-se regressão linear simples o coeficiente de correlação de Pearson.

5.8 DOSAGEM DE 6-SULFATOXIMELATONINA

Por fim, quanto à dosagem de 6-sulfatoximelatonina na urina materna, observamos que houve aumento do metabólito nas gestantes com pré-eclâmpsia em relação ao grupo controle ($p < 0,001$) e nos diferentes períodos ($p = 0,001$), sendo este aumento significativo nos períodos entre 12-18h (bloco 1), entre 18-24h (bloco 2) e entre 24-06h (bloco 3) (Figura 14).

Figura 14 - Excreção de 6-SMT em ambos os grupos de acordo com os diferentes blocos de horários (bloco 1: 12-18h, bloco 2: 18-24h, bloco 3: 24-06h, bloco 4: 06-12h). Os dados estão apresentados em média $\pm$ epm de um $n = 12$ pacientes controle e 14 com pré-eclâmpsia. Os valores de 6-sMT foram normalizados utilizando valores de creatinina na urina (mg/dL). Two-way ANOVA seguido de Teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ vs grupo controle respectivo

Fonte: HC-FMUSP

Período: Outubro/10 a Outubro/13

6 Discussão

6 DISCUSSÃO

A pré-eclâmpsia apresenta etiologia desconhecida, porém há várias teorias etiopatogênicas propostas na literatura. Estudos recentes mostraram que a doença está associada com placentação anormal, disfunção endotelial e resposta inflamatória excessiva (Sakai; Saito, 2003). Alguns autores sugerem que a hipóxia placentária amplifica a liberação de mediadores inflamatórios na circulação materna, levando ao dano endotelial e desenvolvimento do quadro (Redman *et al.*, 1999). Embora não haja uma inflamação sistêmica na gestação, citocinas são encontradas no plasma materno. Sabe-se que o início da gestação normal é caracterizada por resposta inflamatória local (placentária) levando a um aumento de citocinas pró-inflamatórias na circulação materna. Assim, um crescente número de evidências afirma que na pré-eclâmpsia há uma resposta inflamatória sistêmica materna exagerada (Vitoratos *et al.*, 2010) que ativa a imunidade inata e adaptativa e pode ter importante papel na patogênese da doença (Szarka *et al.*, 2010; Molvarec *et al.*, 2011).

No presente trabalho avaliamos a concentração sérica de uma série de citocinas pró e anti-inflamatórias. Não detectamos a presença das citocinas IL-6, IL-1 β , IL-10, IL-12p40, IL-17 nas amostras das gestantes controle ou PE. Além disso, não houve alteração na produção de IL-4 entre os grupos experimentais e 5 gestantes com PE apresentaram valores

mensuráveis de VEGF. Além disso, foi constatada uma tendência de aumento na citocina IFN- γ e aumento significativo na produção de TNF e IL-8 (CXCL8) nas pacientes com PE (tanto de dia quanto de noite) condizentes com dados anteriores descritos na literatura (Szarka *et al.*, 2010; Vitoratos *et al.*, 2010; Kronborg *et al.*, 2011; Peraçoli *et al.*, 2011).

6.1 EFEITO SOBRE CITOCINAS

O modelo de regulação do sistema imunológico na gestação saudável baseia-se em uma mudança da resposta imune materna Th1 em direção à resposta Th2. Na pré-eclâmpsia acredita-se que há uma predominância de resposta Th1 e, neste contexto, IFN- γ é um efetivo ativador de macrófagos que direciona este padrão de resposta (Akdis *et al.*, 2011). Assim, na PE, como a resposta Th1 não é suprimida, a produção de IFN- γ continua normalmente (Laresgoiti-Servitje *et al.*, 2010). Estudo de Saito e colaboradores (1999) observou aumento dos níveis de IL-2, IFN- γ e TNF por células sanguíneas mononucleares periféricas em pacientes com pré-eclâmpsia (Saito *et al.*, 1999). Contudo, outro estudo não encontrou valores significativos de IFN- γ ao comparar mulheres com PE, cuja idade gestacional variou entre 29-40 semanas, com gestantes normais com idade gestacional entre 29-37 semanas (Jonsson *et al.*, 2006). Estudo longitudinal avaliando IFN- γ não observou valores significativos nas diferentes idades gestacionais avaliadas (Kronborg *et al.*, 2011). Entretanto, estudos com três grupos de pacientes (mulheres saudáveis, gestantes normais e com PE) observaram valores significativos desta citocina associando-a a uma

resposta inflamatória excessiva que estaria presente na PE (Szarka *et al.*, 2010; Molvarec *et al.*, 2011). Além disso, sabe-se que perfis Th1 e Th2 podem estar associados a perfis de ativação de macrófagos M1 e M2. Nesse contexto, podemos citar novamente estudo de Medeiros *et al.* (2014) que observou que gestantes com PE apresentam perfil de ativação de monócitos com produção de grandes quantidades de citocinas pró-inflamatórias e predominância de resposta clássica de ativação de macrófagos (M1). Sabe-se que esses macrófagos podem ser ativados por diversas substâncias, dentre elas IFN- γ e TNF, avaliadas em nosso estudo, que induzem a atividade de outras células imunocompetentes como linfócitos T e B (Boyman *et al.*, 2007).

Nossos dados mostram que há tendência de aumento de IFN- γ em pacientes com pré-eclâmpsia quando comparadas com o grupo controle. Como esta diferença não foi significativa devido à grande variabilidade dentro do grupo PE, o papel do IFN- γ permanece em aberto. O IFN- γ é uma citocina direcionadora de respostas Th1 sendo sua produção inibida por moduladores Th2, portanto é possível que o próprio balanço entre estas respostas esteja envolvido com esta variabilidade.

Em relação ao TNF, nossos dados confirmam o previamente observado na literatura, mostrando que as gestantes que apresentam o quadro clínico de PE possuem significativo aumento na produção de TNF em comparação ao grupo controle. Estudo comparativo entre gestantes normais e com PE mostrou que os níveis de TNF antes do parto estão alterados. Após o parto, estes níveis foram significativamente mais altos em

mulheres com PE quando comparadas com gestantes normotensas (Vitoratos *et al.*, 2010). Além disso, Kronborg *et al.* (2011), avaliando os níveis de diversas citocinas em estudo longitudinal, encontraram aumento de TNF entre 26 e 29 semanas em gestantes com PE, com diminuição entre 30 e 35 semanas. Molvarec *et al.* (2011) dosaram TNF em mulheres normais, gestantes e com PE, com idade gestacional entre 36 e 39 semanas, e também encontraram diferença significativa entre os grupos, com valores de TNF semelhantes aos obtidos em nosso estudo. Peraçoli *et al.* (2006) realizaram estudo com mulheres não-grávidas normotensas, e grávidas normotensas, com hipertensão gestacional e PE, com idade gestacional entre 24-41 semanas, e observaram altos níveis de TNF e ácido úrico nas gestantes com PE quando comparadas com as que tinham apenas hipertensão gestacional.

A IL-8 é uma citocina produzida por uma enorme variedade de células (monócitos, linfócitos, células do endotélio ou epitélio, fibroblastos) em resposta a diferentes estímulos como LPS e a outras citocinas (TNF, IL1 α e β). É um importante mediador da resposta imune inata que tem duas funções principais: induz a quimiotaxia das células alvo, principalmente neutrófilos, mas também outros granulócitos levando-os a migrar para o local da infecção. A regulação da transcrição de IL-8 parece depender do estímulo, do tipo de receptor e de célula. Em monócitos humanos e células epiteliais brônquicas, TNF e LPS ativam MAP quinases JNK, ERK e p38. JNK por sua vez ativa a transcrição do fator NF- κ B, que induz IL-8 e a atividade do promotor que transcreve essa citocina (Akdis *et al.*, 2011).

Nossos dados mostram que há aumento dos níveis desta citocina em gestantes com pré-eclâmpsia, tanto de dia quanto de noite; em concordância com diversos outros estudos que avaliaram gestantes com diversos graus de severidade da doença (Kauma *et al.*, 2002; Szarka *et al.*, 2010; Molvarec *et al.*, 2011; Pinheiro *et al.*, 2013). Tais estudos também observaram uma produção aumentada desta citocina por células mononucleares do sangue periférico em casos de PE (Leik *et al.*, 2004; Shah *et al.*, 2007) o que poderia atrair mais neutrófilos. Essas células poderiam aderir ao endotélio, infiltrando-se na camada íntima, gerando inflamação e liberação de espécies reativas de oxigênio, mieloperoxidases, metaloproteinase 8 e tromboxano (Bachawaty *et al.*, 2010). Assim, é possível que esta citocina tenha relação com a severidade da doença.

Existem na literatura vários trabalhos com relação aos níveis de VEGF durante a PE. Muitos autores sugerem que a disfunção endotelial presente na PE, seja decorrente de um desequilíbrio entre fatores angiogênicos de crescimento como VEGF e PlGF (Carty *et al.*, 2008). O VEGF é uma proteína que estimula angiogênese e vasculogênese, responsável pela proliferação e implantação trofoblástica adequada. Sabe-se que sua concentração sérica pode ser alta em situações de hipóxia permitindo melhor fornecimento de oxigênio aos tecidos, porém em grandes quantidades também pode contribuir para o desenvolvimento da doença (Kalluli *et al.*, 2010; Côrrea *et al.*, 2012; Saito; Nakashima, 2013). Em uma gestação normal, a expressão de VEGF materno encontra-se reduzida; porém os níveis placentários também se mostraram reduzidos em gestantes

com PE (Cooper *et al.*, 1996). Outros estudos encontraram níveis mais altos de VEGF em pacientes com PE (Noorbakhsh *et al.*, 2013). Em nosso trabalho confirmamos parcialmente estes resultados visto que nenhuma grávida normotensa e 5 pacientes com PE apresentaram níveis elevados de VEGF.

Acredita-se que a PE esteja associada a elevados níveis de citocinas pró-inflamatórias, ativação de leucócitos e estresse oxidativo (de Oliveira *et al.*, 2010). Deste modo, nossos dados confirmam que as pacientes com PE apresentam um perfil inflamatório mais acentuado do que as gestantes controle.

6.2 EFEITO DA MELATONINA E DO EIXO IMUNE-PINEAL NA PRÉ-ECLÂPSIA

Assim, levando em conta o processo inflamatório e o contexto do eixo imune-pineal, sabe-se que moduladores inflamatórios podem modular positivamente a produção de melatonina tanto pela pineal como por células imunocompetentes.

Com relação à melatonina na PE, os dados apresentados na literatura são poucos e aparentemente contraditórios. Nossos resultados mostram aumento da produção de melatonina em gestantes com PE durante o dia, avaliada tanto na dosagem do hormônio no soro quanto de seu metabólito, a 6-sulfatoximelatonina, excretado na urina das pacientes. Em concordância com nosso estudo, Tranquilli *et al.* (2004) observaram que níveis de melatonina são significativamente maiores em gestações com PE quando

comparadas com gestantes normotensas. Todas as gestantes teriam perda de ritmo de melatonina e perda do ritmo de pressão arterial. Vale comentar que a melatonina também apresenta correlação com o mecanismo de regulação cardiovascular (Tranquilli *et al.*, 2004). Nesse contexto, podemos citar o trabalho de Tamura *et al.* (2009) que mostrou o efeito da melatonina como moduladora vascular, inibindo a produção de NO de células endoteliais e, deste modo, modulando positivamente a contratilidade da aorta. Sabe-se que o NO apresenta função vasodilatadora, participando do controle vascular e dos processos de defesa do organismo. Deste modo, um efeito vascular da melatonina aumentando a contratilidade do vaso pode estar associado com o aumento da pressão arterial associada à PE. Contudo, após o parto, enquanto mulheres normotensas recuperariam ambos os ritmos, aquelas com PE recuperariam apenas o ritmo de pressão arterial e não o de melatonina. Assim, seu ritmo estaria ausente durante e após a gestação (Tranquilli *et al.*, 2004).

Já Nakamura *et al.* (2001) observaram, por exemplo, que pacientes com PE grave apresentam níveis séricos noturnos de melatonina significativamente mais baixos que em indivíduos com PE leve ou gestantes normais após 32 semanas. Os níveis de melatonina no soro materno apresentam um ritmo diário e aumentariam até o final da gestação. Assim, uma aparente diminuição desses níveis na PE grave sugere envolvimento da melatonina na patogênese da doença.

Por fim, Kivela (1991) observou correlação positiva entre os níveis de melatonina e a semana de gestação com aumento da concentração desse

hormônio durante o terceiro trimestre comparado com o primeiro e segundo, e com pacientes não grávidas. Nossos resultados corroboram as pesquisas anteriores que mostram uma diminuição na produção de melatonina em gestantes com PE, pois constatamos aumento deste hormônio durante o dia tanto na dosagem no soro quanto na de seu metabólito, a 6-sulfatoximelatonina, excretado na urina das pacientes.

A medida de 6-SMT é amplamente utilizada como uma medida não invasiva da secreção de melatonina e está altamente correlacionada com a melatonina plasmática (Markus *et al.*, 2010). Além disso, a análise das dosagens de 6-SMT na urina mostra que ambos os grupos apresentam ritmo, entretanto o valor excretado durante o dia foi maior no grupo PE que no CO, o que está de acordo com os dados obtidos na dosagem plasmática de melatonina.

Deste modo, com relação à produção de melatonina, mostramos que o aumento na produção deste hormônio é mais evidente durante o dia do que durante a noite. Em estudos realizados com pineais em cultura (Fernandes *et al.*, 2006) e avaliando mães que apresentaram mastite após o parto, foi observada uma diminuição na produção de melatonina pela pineal e uma correlação inversa entre a produção deste hormônio e os níveis de TNF medidos no colostro (Pontes *et al.*, 2006). Por outro lado, dados recentes mostram que o TNF pode induzir a produção de melatonina por células imunocompetentes (Muxel *et al.*, 2012; Pires-Lapa *et al.*, 2013). Nossos dados mostram uma correlação positiva entre o aumento de produção de melatonina e de TNF no grupo pré-eclâmpsia durante o dia,

mas não durante a noite. Tomando estes dados em conjunto, podemos sugerir que o aumento de TNF circulante esteja exercendo sua ação imunomodulatória sobre os dois braços do sistema melatonérgico.

Podemos hipotetizar que o TNF esteja aumentando a produção de melatonina por células imunocompetentes, o que estaria levando a uma maior concentração sérica deste hormônio durante o dia nas pacientes com PE. Durante a noite, quando naturalmente ocorre o aumento da concentração circulante deste hormônio devido ao aumento da produção circadiana de melatonina pela pineal, este efeito ficaria atenuado. Isto porque, é possível que ocorra uma compensação entre um aumento da produção de melatonina pelas células imunocompetentes e uma diminuição da produção de melatonina pela pineal, ambos efeitos mediados pela ação do TNF. Como no grupo controle não haveria o efeito inibitório do TNF sobre a glândula pineal, a produção de melatonina aumenta normalmente durante a noite de modo que não é mais possível observar a diferença com relação ao grupo PE.

No contexto da resposta inflamatória, a rápida ativação da via NF- κ B é essencial para uma resposta imune eficiente (Sun *et al.*, 1993). Vale ressaltar que sua ativação por fatores pró-inflamatórios como TNF e LPS bloqueia (Fernandes *et al.*, 2006; da Silveira Cruz-Machado *et al.*, 2010), enquanto a inibição dessa via por corticosterona potencia a síntese de melatonina induzida por noradrenalina em glândulas pineais de rato em cultura (Ferreira *et al.*, 2005). Entretanto, dados recentes demonstraram que ativação da via NF- κ B em células imunocompetentes induz um efeito

contrário ao que foi visto em glândulas pineais. Observou-se que fatores responsáveis pela ativação da via NF- κ B, como LPS e Zimosan induzem a síntese de melatonina por estas células. Desde modo, ao considerarmos a ativação da via NF- κ B por TNF, e levando em consideração que a ativação dessa via é fundamental para a síntese de melatonina por células imunocompetentes (Muxel *et al.*, 2012; Pires-Lapa *et al.*, 2013), podemos sugerir a hipótese de que a o TNF circulante detectado poderia levar à ativação dessas células e, conseqüentemente, à produção de melatonina observada na fase de claro (Pontes *et al.*, 2006) quando a produção pineal está inibida pela luz.

Assim, observamos que existe uma correlação positiva significativa entre os níveis de TNF e melatonina e entre os níveis de melatonina e IL-8, nas pacientes do grupo pré-eclâmpsia dia. Além disso, ao correlacionarmos estas duas citocinas observamos correlação positiva significativa nas pacientes do grupo PE, e ao segregarmos os períodos o mesmo se verifica nas pacientes PE dia. Estes dados abrem duas possibilidades: que a IL-8 esteja afetando diretamente a produção de melatonina ou que TNF esteja afetando tanto a produção de melatonina quanto a de IL-8.

Dados relacionando melatonina e TNF foram descritos anteriormente (Pontes *et al.*, 2006; 2007). Em relação à IL-8, estudos anteriores mostram que, em modelo de edema pulmonar, os níveis de melatonina diminuem os desta citocina. Acredita-se que devido a seu efeito antioxidante, a melatonina diminui o edema, melhora a oxigenação e o estresse oxidativo por diminuir os níveis de citocinas pró-inflamatórias, dentre elas a IL-8 (Ming

et al., 2013). Outro estudo, avaliando estresse oxidativo em neonatos pós-cirurgia, observou que a administração de melatonina diminuía os níveis de IL-8 nestes casos (Gitto *et al.*, 2004).

Contudo existem dados que correlacionam IL-8 com TNF (Akdis *et al.*, 2011). Assim, ao correlacionarmos estas citocinas podemos inferir que no quadro de PE existe um sistema de retroalimentação entre ambas que leva ao aumento observado nas pacientes com PE. Estudos que avaliem o efeito da IL-8 sobre a produção de melatonina pela pineal e células imunocompetentes precisam ser realizados para a determinação causal entre esta citocina e a produção deste hormônio.

Como mencionado anteriormente, no contexto do eixo imune-pineal, glicocorticóides e IFN- γ podem estimular a produção de melatonina (Ferreira *et al.*, 2005; Fernandes *et al.*, 2009).

Cortisol é o principal glicocorticóide produzido pelas adrenais no homem. Obedece a um ritmo circadiano, sendo mais elevado pela manhã e mais baixo à noite. É um hormônio essencial na resposta ao estresse e, conseqüentemente leva a um aumento da pressão arterial. Na gestação há um estado de hipercortisolismo sustentado por muitos meses e, normalmente, os níveis de cortisol no sangue e urina aumentam progressivamente até o termo (Ho *et al.*, 2007).

No presente trabalho, observamos uma diferença entre os grupos PE e controle nos diferentes períodos com relação ao cortisol, porém sem alteração dos valores e sem perda de ritmo. Como os valores de cortisol nas gestantes com PE são mais baixos que no grupo CO, a hipótese de que seja

o cortisol que está aumentando a produção de melatonina nos casos de PE não se sustenta. Dados da literatura indicam aumento progressivo do cortisol após a 36ª semana em gestações normais. O que, segundo os autores, seria uma preparação do corpo para as demandas do trabalho e maturação fetal. Entretanto, no mesmo estudo, essas concentrações estavam reduzidas nos casos de PE de modo concordante com os nossos resultados. Acredita-se que isso ocorra devido a uma queda nos níveis de ACTH maternos secundária aos mecanismos de *feedback* negativo a nível hipotalâmico ou devido à incapacidade da placenta para conduzir o eixo HPA materno (Ho *et al.*, 2007). De qualquer forma é sabido o efeito antagônico entre os glicocorticóides e a via NF-κB (Lannan *et al.*, 2012), e que este hormônio inibe a produção de TNF. Desta forma, mesmo não tendo sido observada correlação negativa, a diminuição dos níveis de glicocorticóides é condizente com o aumento de TNF circulante.

Portanto, nossos resultados sugerem que a PE altera negativamente o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, induzindo um aumento no TNF, que sinaliza uma resposta inflamatória aguda. Além disso, acredita-se que os altos níveis de IL-8 e TNF possam configurar um sistema de retroalimentação que contribui para o desenvolvimento do quadro e ativação do eixo-imune pineal. Portanto, este efeito pode estar associado com o aumento da melatonina diurna na PE, induzida por TNF nas células imunocompetentes ativadas. Diante disso, nossos dados sugerem que o aumento de melatonina e de 6-sMT nas pacientes com PE possa ser de origem extra-pineal.

7 Conclusões

7 CONCLUSÕES

O presente estudo permitiu concluir que o estado do eixo imune-pineal na PE apresentou as seguintes alterações em relação ao controle:

- Houve aumento significativo dos níveis de TNF e IL-8 nas pacientes com PE em relação ao controle, independentemente do período do dia;
- Níveis similares de IL-4 entre os grupos;
- Tendência de aumento nos níveis de IFN- γ , e VEGF em pacientes com PE;
- Correlação positiva entre as concentrações de melatonina e TNF, melatonina e IL-8 e IL-8 e TNF nas pacientes com PE durante o dia;
- Observou-se que os níveis de cortisol apresentam ritmo, porém gestantes com PE apresentam níveis mais baixos que as pacientes controle;
- A melatonina apresenta níveis elevados nas pacientes com PE durante o dia;
- A 6-SMT apresenta níveis elevados em pacientes com PE, principalmente no período das 12-18h, 18-24h e 24-06h.

8 Referências

8 REFERÊNCIAS

Akdis M, Burgler S, Cramer R, Eiwegger T, Fujita H, Gomez E, et al. Interleukins from 1 to 37, and interferon-gamma: receptors, functions, and roles in diseases. *J Allergy Clin Immunol*. 2011;127:701-27. p e1-e70.

Allolio B, Gunther RW, Benker G, Reinwein D, Winkelmann W, Schulte HM. A multihormonal response to corticotropin-releasing hormone in inferior petrosal sinus blood of patients with Cushing's disease. *J Clin Endocrinol Metab*. 1990;71(5):1195-201.

Arendt J, Deacon S, English J, Hampton S, Morgan L. Melatonin and adjustment to phase shift. *J Sleep Res*. 1995;4(S2):74-9.

Axelrold J. The pineal gland: a neurochemical transducer. *Science*. 1974;184(114):1341-8.

Axelrold J, Weissbach H. Enzymatic O-methylation of N-acetylserotonin to melatonin. *Science*. 1960;131(3409):1312.

Bachawaty T, Washington SL, Walsh SW. Neutrophil expression of cyclooxygenase 2 in preeclampsia. *Reprod Sci*. 2010;17(5):465-70.

Baler R, Covington S, Klein DC. The rat arylalkylamine N-acetyltransferase gene promoter. cAMP activation via a cAMP-responsive element-CCAAT complex. *J Biol Chem*. 1997;272(11):6979-85.

Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard JC. Cellular responses to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol*. 1997;15:749-95.

- Borzychowski AM, Sargent IL, Redman CW. Inflammation and pre-eclampsia. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2006;11(5):309-16.
- Boyman O, Purton JF, Surh CD, Sprent J. Cytokines and T-cell homeostasis. *Curr Opin Immunol.* 2007;19(3):320-6
- Carty DM, Delles C, Dominiczak AF. Novel biomarkers for predicting preeclampsia. *Trends Cardiovasc Med.* 2008;18(5):186-94.
- Carrillo-Vico A, Calvo JR, Abreu P, Lardone PJ, Garcia-Maurino S, Reiter RJ, et al. Evidence of melatonin synthesis by human lymphocytes and its physiological significance: possible role as intracrine, autocrine, and/or paracrine substance. *FASEB J.* 2004;18(3):537-9.
- Carrillo-Vico A, Lardone PJ, Fernandez-Santos JM, Martin-Lacave I, Calvo JR, Karasek M, et al. Human lymphocyte-synthesized melatonin is involved in the regulation of the interleukin-2/interleukin-2 receptor system. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90(2):992-1000.
- Cecon E, Fernandes PA, Pinato L, Ferreira ZS, Markus RP. Daily variation of constitutively activated nuclear factor kappa B (NFkB) in rat pineal gland. *Chronobiol Int.* 2010;27(1):52-67.
- Chen YC, Sheen JM, Tiao MM, Huang LT. Roles of melatonin in fetal programming in compromised pregnancies. *Int J Mol Sci.* 2013;14(3):5380-401.
- Corrêa IP, Ruano R, Takiuti NH, Francisco RP, Bevilacqua E, Zugaib M. Expression of angiogenic factors in placenta of stressed rats. *Reprod Fertil Dev.* 2012; 24(6): 851-8.
- Costa F, Cunha SP. Óxido nítrico e peptídeo atrial natriurético na predição de complicações da gestação. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2008;29(1):41-7.

Cooper JC, Sharkey AM, Charnock-Jones DS, Palmer CR, Smith SK. VEGF mRNA levels in placentae from pregnancies complicated by preeclampsia. *Br J Obstet Gynaecol*. 1996;103(12):1191-6.

Csaba G, Barath P. Morphological changes of thymus and the thyroid gland after postnatal extirpation of pineal body. *Endocrinol Exp*. 1975;9(1):59-67.

da Silveira Cruz-Machado S, Carvalho-Sousa CE, Tamura EK, Pinato L, Cecon E, Fernandes PA, et al. TLR4 and CD14 receptors expressed in rat pineal gland trigger NFkB pathway. *J Pineal Res*. 2010;49(2):183-92.

de Oliveira LG, Karumanchi A, Sass N. Pré-eclâmpsia: estresse oxidativo, inflamação e disfunção endotelial. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2010;32(2):609-16.

Dubocovich ML, Markowska M. Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals. *Endocrine*. 2005;27(2):101-10.

Erzen B, Sabovic M, Sebestjen M, Keber I, Poredos P. Interleukin-6 correlates with endothelial dysfunction in young-post myocardial infarction patients. *Cardiology*. 2007;107:111-6.

Fernandes PA, Cecon E, Markus RP, Ferreira ZS. Effect of TNF-alpha on the melatonin synthetic pathway in the rat pineal gland: basis for a 'feedback' of the immune response on circadian timing. *J Pineal Res*. 2006;41(4):344-50.

Fernandes PA, Bothorel B, Clesse D, Monteiro AW, Calgari C, Raison S, et al. Local corticosterone infusion enhances nocturnal pineal melatonin production in vivo. *J Neuroendocrinol*. 2009;21(2):90-7.

Ferreira ZS, Garcia CR, Spray DC, Markus RP. P2Y(1) receptor activation enhances the rate of rat pinealocyte-induced extracellular acidification via a calcium-dependent mechanism. *Pharmacology*. 2003;69(1):33-7.

Ferreira ZS, Fernandes PA, Duma D, Assreuy J, Avellar MC, Markus RP. Corticosterone modulates noradrenaline-induced melatonin synthesis through inhibition of nuclear factor kappa B. *J Pineal Res.* 2005;38(3):182-8.

Garcia-Maurino S, Gonzalez-Haba MG, Calvo JR, Rafii-El-Idrissi M, Sanchez-Margalet V, Goberna R, et al. Melatonin enhances IL-2, IL-6, and IFN-gamma production by human circulating CD4+ cells: a possible nuclear receptor-mediated mechanism involving T helper type 1 lymphocytes and monocytes. *J Immunol.* 1997;159(2):574-81.

Gilbert JS, Ryan MJ, LaMarca BB, Sedeek M, Murphy SR, Granger JP. Pathophysiology of hypertension during preeclampsia: linking placental ischemia with endothelial dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008; 294(2):H541-50.

Gitto E, Reiter RJ, Impellizzeri P, Pesce S, Basile M, Antonuccio P et al. Melatonin reduces oxidative stress in surgical neonates. *J Pediatr Sur.* 2004; 39(2): 184-9.

Granger JP, Alexander BT, Llinas MT, Bennett WA, Khalil RA. Pathophysiology of hypertension during preeclampsia linking placental ischemia with endothelial dysfunction. *Hypertension.* 2001;38(3 Pt 2):718-22.

Guyton AC, Hall JE. *Tratado de fisiologia médica*. Tradução Barbara de Alencar Martins, et al. Rio de Janeiro: Elsevier; 2006. Cap. 77: os hormônios adrenocorticais. p.950-60. Tradução Patricia Lydie Voeux.

Hardeland R, Pandi-Perumal SR, Cardinali DP. Melatonin. *Int J Biochem Cell Biol.* 2006;38(3):313-6.

Hardeland R, Cardinali DP, Srinivasan V, Spence DW, Brown GM, Pandi-Perumal SR. Melatonin--a pleiotropic, orchestrating regulator molecule. *Prog Neurobiol.* 2011;93(3):350-84.

Harris LK. Review: Trophoblast-vascular cell interactions in early pregnancy: how to remodel a vessel. *Placenta*. 2010;31(Suppl):S93-8.

Helewa ME, Burrows RF, Smith J, Williams K, Brain P, Rabkin SW. Report of the Canadian Hypertension Society Consensus Conference: 1. Definitions, evaluation and classification of hypertensive disorders in pregnancy. *CMAJ*. 1997;157(6):715-25.

Ho JT, Lewis JG, O'Loughlin P, Bagley CJ, Romero R, Dekker GA, et al. Reduced maternal corticosteroid-binding globulin and cortisol levels in pre-eclampsia and gamete recipient pregnancies. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2007;66(6):869-77.

Hobson SR, Lim R, Gardiner EE, Alers NO, Wallace EM. Phase I pilot trial of antenatal maternally administered melatonin to decrease the level of oxidative stress in human pregnancies affected by pre-eclampsia (PAMPR): study protocol. *BMJ Open*. 2013;3(9):e003788

Hoffman RA, Reiter RJ. Influence of compensatory mechanisms and the pineal gland on dark-induced gonadal atrophy in male hamsters. *Nature*. 1965;207(997):658-9.

Hoffman RA, Reiter RJ. Pineal Gland: Influence on Gonads of Male Hamsters. *Science*. 1965;148(3677):1609-11.

Hung Th, Burton G. Hypoxia and reoxygenation: a possible mechanism for placental oxidative stress in pre-eclampsia. *Taiwan J Obstet Gynecol*. 2006;45(3):189-200.

Hutchinson ES, Brownbill P, Jones NW, Abrahams VM, Baker PN, Sibley CP, et al. Utero-placental haemodynamics in the pathogenesis of pre-eclampsia. *Placenta*. 2009;30(7):634-41.

Jonsson Y, Ruber M, Matthiesen L, Berg G, Nieminen K, Sharma S, et al. Cytokine mapping of sera from women with preeclampsia and normal pregnancies. *J Reprod Immunol*. 2006;70(1-2):83-91.

Kahale S, Zugaib M. Síndromes hipertensivas na gravidez. Rio de Janeiro: Atheneu; 1995.

Kalsbeek A, Garidou ML, Palm IF, Van Der Vliet J, Simonneaux V, Pevet P, et al. Melatonin sees the light: blocking GABA-ergic transmission in the paraventricular nucleus induces daytime secretion of melatonin. *Eur J Neurosci*. 2000;12(9):3146-54.

Kappers JA. The development, topographical relations and innervation of the epiphysis cerebri in the albino rat. *Z Zellforsch Mikrosk Anat*. 1960;52:163-215.

Kauma S, Takacs P, Scordalakes C, Walsh S, Green K, Peng T, Increased endothelial monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-8 in preeclampsia. *Obstet Gynecol*. 2002;100(4):706-14.

Kennaway DJ, Goble FC, Stamp GE. Factors influencing the development of melatonin rhythmicity in humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996;81(4):1525-32.

Kivela A. Serum melatonin during human pregnancy. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 1991;124(3):233-7.

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(2):599-603.

Kronborg CS, Gjedsted J, Vittinghus E, Hansen TK, Allen J, Knudsen UB. Longitudinal measurement of cytokines in pre-eclamptic and normotensive pregnancies. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2011;90(7):791-6.

Lanoix D, Lacasse AA, Reiter RJ, Vaillancourt C. Melatonin: The smart killer the human trophoblast as a model. *Mol Cell Endocrinol*. 2012a;348:1-11.

Lanoix D, Beghdadi H, Lafond J, Vaillancourt C. Human placental trophoblasts synthesize melatonin and express its receptors. *J Pineal Res*. 2012b;54(1):417-25.

Laresgoiti-Servitje E, Gomez-Lopez N, Olson DM. An immunological insight into the origins of pre-eclampsia. *Hum Reprod Update*. 2010;16(5):510-24.

Leik CE, Walsh SW. Neutrophils infiltrate resistance-sized vessels of subcutaneous fat in women with preeclampsia. *Hypertension*. 2004;44:72-7.

Lerner AB, Case JD, Takahashi Y. Isolation of melatonin and 5-methoxyindole-3-acetic acid from bovine pineal glands. *J Biol Chem*. 1960;235:1992-7.

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):1-5.

Lopes C, deLyra JL, Markus RP, Mariano M. Circadian rhythm in experimental granulomatous inflammation is modulated by melatonin. *J Pineal Res*. 1997;23(2):72-8.

Lopes C, Mariano M, Markus RP. Interaction between the adrenal and the pineal gland in chronic experimental inflammation induced by BCG in mice. *Inflamm Res*. 2001;50(1):6-11.

Lopez-Jaramillo P, Casas JP, Serrano N. Preeclampsia: from epidemiological observations to molecular mechanisms. *Braz J Med Biol Res.* 2001;34(10):1227-35.

Lotufo CM, Lopes C, Dubocovich ML, Farsky SH, Markus RP. Melatonin and N-acetylserotonin inhibit leukocyte rolling and adhesion to rat microcirculation. *Eur J Pharmacol.* 2001;430(2-3):351-7.

Lotufo CM, Yamashita CE, Farsky SH, Markus RP. Melatonin effect on endothelial cells reduces vascular permeability increase induced by leukotriene B4. *Eur J Pharmacol.* 2006;534(1-3):258-63.

Ma Y, Ryu JS, Dulay A, Segal M, Guller S. Regulation of plasminogen activator inhibitor (PAI)-1 expression in a human trophoblast cell line by glucocorticoid (GC) and transforming growth factor (TGF)-beta. *Placenta.* 2002;23(10):727-34.

Maestroni GJ. The photoperiod transducer melatonin and the immune-hematopoietic system. *J Photochem Photobiol B.* 1998;43(3):186-92.

Markus RP, Ferreira ZS, Fernandes PA, Cecon E. The immune-pineal axis: a shuttle between endocrine and paracrine melatonin sources. *Neuroimmunomodulation.* 2007;14(3-4):126-33.

Markus RP, Silva CL, Franco DG, Barbosa EM, Jr., Ferreira ZS. Is modulation of nicotinic acetylcholine receptors by melatonin relevant for therapy with cholinergic drugs? *Pharmacol Ther.* 2010;126(3):251-62.

Markus RP e Ferreira ZS. The immune pineal axis: the role of pineal and extra-pineal melatonin in modulating inflammation. *Ad Neuroimm Biol.* 2011; 95-104.

Markus RP, Cecon E, Pires-Lapa MA. Immune-Pineal Axis: Nuclear Factor κ B (NF- κ B) Mediates the Shift in the Melatonin Source from Pinealocytes to Immune Competent Cells. *Int J Mol Sci*. 2013; 24; 14(6).

Medeiros LTL, Peraçoli JC, Bannwart-Castro C, Romão M, Well IC *et al*. Monocytes from pregnant women with pre-eclampsia are polarized to a M1 phenotype. *Am J Reprod Immunol*. 2014; 1-9.

Menaker M, Moreira LF, Tosini G. Evolution of circadian organization in vertebrates. *Braz J Med Biol Res*. 1997;30(3):305-13.

Michael AE, Papageorgiou AT. Potential significance of physiological and pharmacological glucocorticoids in early pregnancy. *Hum Reprod Update*. 2008;14(5):497-517.

Ming Z, Zhang-gang X, Jing G, Wei W, Jun-feng H, Du-ming D. Protective effect of melatonin on reexpansion pulmonary edema in rats model. *Chin Med J*. 2013;126 (3): 500-4.

Moller M, Ravault JP, Cozzi B. The chemical neuroanatomy of the mammalian pineal gland: neuropeptides. *Neurochem Int*. 1996;28(1):23-33.

Moller M, Baeres FM. The anatomy and innervation of the mammalian pineal gland. *Cell Tissue Res*. 2002;309(1):139-50.

Mortani Barbosa EJ, Ferreira ZS, Markus RP. Purinergic and noradrenergic cotransmission in the rat pineal gland. *Eur J Pharmacol*. 2000;401(1):59-62.

Molvarec A, Szarka A, Walentin S, Beko G, Karadi I, Prohaszka Z, *et al*. Serum leptin levels in relation to circulating cytokines, chemokines, adhesion molecules and angiogenic factors in normal pregnancy and preeclampsia. *Reprod Biol Endocrinol*. 2011;9:124.

Murphy TL, Cleveland MG, Kulesza P, Magram J, Murphy KM. Regulation of interleukin 12 p40 expression through an NF-kappa B half-site. *Mol Cell Biol*. 1995;15(10):5258-67.

Mutter WP, Karumanchi SA. Molecular mechanisms of preeclampsia. *Microvasc Res*. 2008;75(1):1-8.

Muxel SM, Pires-Lapa MA, Monteiro AW, Cecon E, Tamura EK, Floeter-Winter LM, et al. NF-kappaB drives the synthesis of melatonin in RAW 264.7 macrophages by inducing the transcription of the arylalkylamine-N-acetyltransferase (AA-NAT) gene. *PLoS One*. 2012;7(12):e52010.

Nakamura Y, Tamura H, Kashida S, Takayama H, Yamagata Y, Karube A, et al. Changes of serum melatonin level and its relationship to feto-placental unit during pregnancy. *J Pineal Res*. 2001;30(1):29-33.

Nelson RJ, Demas GE. Seasonal changes in immune function. *Q Rev Biol*. 1996;71(4):511-48.

Noorbakhsh M, Kianpour M, Nematbakhsh M. Serum levels of asymmetric dimethylarginine, vascular endothelial growth factor, and nitric oxide metabolite levels in preeclampsia patients. *Obstet Gynecol*. 2013;2013:104213.

Nowak JZ, Zawilska JB. Melatonin and its physiological and therapeutic properties. *Pharm World Sci*. 1998;20(1):18-27.

Okatani Y, Okamoto K, Hayashi K, Wakatsuki A, Tamura S, Sagara Y. Maternal-fetal transfer of melatonin in pregnant women near term. *J Pineal Res*. 1999;25:129-34.

Oksche A. Survey of the Development and comparative morphology of the pineal organ. *Prog Brain Res*. 1965;10:3-29.

Olcese J. Neuropeptide Y: an endogenous inhibitor of norepinephrine-stimulated melatonin secretion in the rat pineal gland. *J Neurochem.* 1991; 57(3): 943-47.

Orshal JM, Khalil RA. Interleukin-6 impairs endothelium dependent Mo-cGMP-mediated relaxation and enhances contraction systemic vessels of pregnant rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2004;286:R1013-23.

Pedersen EB, Fox LM, Castro AJ, McNulty JA. Immunocytochemical and electron-microscopic characterization of macrophage/microglia cells and expression of class II major histocompatibility complex in the pineal gland of the rat. *Cell Tissue Res.* 1993;272(2):257-65.

Peracoli JC, Rudge MVC, Peraçoli MTS. Tumor necrosis factor-alpha in gestation and puerperium of women with gestational hypertension and pre-eclampsia. *Am J Reprod Immunol.* 2007;57:177-85.

Peracoli MT, Bannwart CF, Cristofalo R, Borges VT, Costa RA, Witkin SS, et al. Increased reactive oxygen species and tumor necrosis factor-alpha production by monocytes are associated with elevated levels of uric acid in pre-eclamptic women. *Am J Reprod Immunol.* 2011;66(6):460-7.

Pires-Lapa MA, Tamura EK, Salustiano EM, Markus RP. Melatonin synthesis in human colostrum mononuclear cells enhances dectin-1-mediated phagocytosis by mononuclear cells. *J Pineal Res.* 2013;55(3):240-6.

Pontes GN, Cardoso EC, Carneiro-Sampaio MM, Markus RP. Injury switches melatonin production source from endocrine (pineal) to paracrine (phagocytes) - melatonin in human colostrum and colostrum phagocytes. *J Pineal Res.* 2006;41(2):136-41.

Pontes GN, Cardoso EC, Carneiro-Sampaio MM, Markus RP. Pineal melatonin and the innate immune response: the TNF- α increase after cesarean section suppresses nocturnal melatonin production. *J Pineal Res*. 2007;43(4):365-71.

Quay WB. Circadian rhythm in rat pineal serotonin and its modifications by estrous cycle and photoperiod. *Gen Comp Endocrinol*. 1963;14:473-9.

Quay WB. Circadian and estrous rhythms in pineal melatonin and 5-hydroxy indole-3-acetic acid. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1964;115:710-3.

Quay WB. Endocrine effects of the mammalian pineal. *Am Zool*. 1970;10(2):237-46.

Reiter RJ. The mammalian pineal gland: structure and function. *Am J Anat*. 1981;162(4):287-313.

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.

Reiter RJ, Tan DX, Korkmaz A, Rosales-Corral SA. Melatonin and stable circadian rhythms optimize maternal, placental and fetal physiology. *Hum Reprod Update*. 2014;20(2):293-307.

Redman CW, Sargent IL. Immunology of pre-eclampsia. *Am J Reprod Immunol*. 2010;63(6):534-43.

Reppert SM, Weaver DR. Coordination of circadian timing in mammals. *Nature*. 2002;418(6901):935-41.

Roberts JM, Pearson GD, Cutler JA, Lindheimer MD. Summary of the NHLBI Working Group on Research on Hypertension During Pregnancy. *Hypertens Pregnancy*. 2003;22(2):109-27.

Saito S, Umekage H, Sakamoto Y, Sakai M, Tanebe K, Sasaki Y, et al. Increased T-helper-1-type immunity and decreased T-helper-2-type immunity in patients with preeclampsia. *Am J Reprod Immunol*. 1999;41(5):297-306.

Saito S, Sakai M. Th1/Th2 balance in preeclampsia. *J Reprod Immunol*. 2003;59(2):161-73.

Salustiano EM, De Pinho JC, Provost K, Ruano R, Zugaib M. Maternal serum hormonal factors in the pathogenesis of preeclampsia. *Obstet Gynecol Surv*. 2013;68(2):141-50.

Sandyk R, Anastasiadis PG, Anninos PA, Tsagas N. The pineal gland and spontaneous abortions: Implications for therapy with melatonin and magnetic field. *Int J Neurosci*. 1992;62:243-50.

Sato T, Kaneko M, Hama A, Kusakari T, Fujieda H. Expression of class II MHC molecules in the rat pineal gland during development and effects of treatment with carbon tetrachloride. *Cell Tissue Res*. 1996;284(1):65-76.

Shah TJ, Walsh SW. Activation of NF-kappaB and expression of COX-2 in association with neutrophil infiltration in systemic vascular tissue of women with preeclampsia. *Am L Obstet Gynecol*. 2007;196:e1-8.

Simonneaux V, Ouichou A, Craft C, Pevet P. Presynaptic and postsynaptic effects of neuropeptide Y in the rat pineal gland. *J Neurochem*. 1994;62(6):2464-71.

Simonneaux V, Ribelayga C. Generation of the melatonin endocrine message in mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters. *Pharmacol Rev.* 2003;55(2):325-95.

Schenker S, Yang Y, Perez A, Acuff RV, Papas AM, Henderson G, Lee MP. Antioxidant transport by the human placenta. *Clin Nutr.* 1998;17:159-67.

Schomerus C, Korf HW, Laedtke E, Weller JL, Klein DC. Selective adrenergic/cyclic AMP-dependent switch-off of proteasomal proteolysis alone switches on neural signal transduction: an example from the pineal gland. *J Neurochem.* 2000;75(5):2123-32.

Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol.* 2004;75(2):163-89.

Sibai BM, Lindheimer M, Hauth J, Caritis S, VanDorsten P, Klebanoff M, et al. Risk factors for preeclampsia, abruptio placentae, and adverse neonatal outcomes among women with chronic hypertension. National Institute of Child Health and Human Development Network of Maternal-Fetal Medicine Units. *N Engl J Med.* 1998;339(10):667-71.

Sikkema JM, Robles de Medina PG, Schaad RR, Mulder EJ, Bruinse HW, Buitelaar JK, et al. Salivary cortisol levels and anxiety are not increased in women destined to develop preeclampsia. *J Psychosom Res.* 2001;50(1):45-9.

Skwarlo-Sonta K, Majewski P, Markowska M, Oblap R, Olszanska B. Bidirectional communication between the pineal gland and the immune system. *Can J Physiol Pharmacol.* 2003;81(4):342-9.

Slominski A, Fischer TW, Zmijewski MA, Wortsman J, Semak I, Zbytek B, et al. On the role of melatonin in skin physiology and pathology. *Endocrine*. 2005;27(2):137-48.

Steegers EA, von Dadelszen P, Duvekot JJ, Pijnenborg R. Pre-eclampsia. *Lancet*. 2010;376(9741):631-44.

Srinivasan V, Spence DW, Trakht I, Pandi-Perumal SR, Cardinali DP, Maestroni GJ. Immunomodulation by melatonin: its significance for seasonally occurring diseases. *Neuroimmunomodulation*. 2008;15(2):93-101.

Sun SC, Ganchi PA, Ballard DW, Greene WC. NF-kappa B controls expression of inhibitor I kappa B alpha: evidence for an inducible autoregulatory pathway. *Science*. 1993;259(5103):1912-5.

Szarka A, Rigo J, Jr., Lazar L, Beko G, Molvarec A. Circulating cytokines, chemokines and adhesion molecules in normal pregnancy and preeclampsia determined by multiplex suspension array. *BMC Immunol*. 2010;11:59.

Takiuti NH, Kahhale S, Zugaib M. Stress in pregnancy: a new Wistar rat model for human preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*. 2002;186(3):544-50.

Takiuti NH, Kahhale S, Zugaib M. Stress-related preeclampsia: an evolutionary maladaptation in exaggerated stress during pregnancy? *Med Hypotheses*. 2003;60(3):328-31.

Tamura H, Nakamura Y, Terron MP, Flores LJ, Manchester LC, Tan DX, et al. Melatonin and pregnancy in the human. *Reprod Toxicol*. 2008;25(3):291-303.

Tamura EK, Cecon E, Monteiro AW, Silva CL, Markus RP. Melatonin inhibits LPS-induced NO production in rat endothelial cells. *J Pineal Res*. 2009;46(3):268-74.

Teclemariam-Mesbah R, Ter Horst GJ, Postema F, Wortel J, Buijs RM. Anatomical demonstration of the suprachiasmatic nucleus-pineal pathway. *J Comp Neurol*. 1999;406(2):171-82.

Tosun M, Celik H, Avci B, Yavuz E, Alper T, Malatyalioglu E. Maternal and umbilical serum levels of interleukin-6, interleukin-8, and tumor necrosis factor-alpha in normal pregnancies and in pregnancies complicated by preeclampsia. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2010;23(8):880-6.

Tranquilli AL, Turi A, Giannubilo SR, Garbati E. Circadian melatonin concentration rhythm is lost in pregnant women with altered blood pressure rhythm. *Gynecol Endocrinol*. 2004;18(3):124-9.

Tzavara ET, Pouille Y, Defer N, Hanoune J. Diurnal variation of the adenylyl cyclase type 1 in the rat pineal gland. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(20):11208-12.

Vaughan MK, Reiter RJ. Transient hypertrophy of the ventral prostate and coagulating glands and accelerated thymic involution following pinealectomy in the mouse. *Tex Rep Biol Med*. 1971;29(4):579-86.

Vianna P, Bauer ME, Dornfeld D, Chies JA. Distress conditions during pregnancy may lead to pre-eclampsia by increasing cortisol levels and altering lymphocyte sensitivity to glucocorticoids. *Med Hypotheses*. 2011;77(2):188-91.

Vitoratos N, Economou E, Iavazzo C, Panoulis K, Creatsas G. Maternal serum levels of TNF-alpha and IL-6 long after delivery in preeclamptic and normotensive pregnant women. *Mediators Inflamm*. 2010;2010:908649.

Wolf M, Shah A, Jimenez-Kimble R, Sauk J, Ecker JL, Thadhani R. Differential risk of hypertensive disorders of pregnancy among Hispanic women. *J Am Soc Nephrol*. 2004;15(5):1330-8.

Wurtman RJ, Axelrod J, Sedvall G, Moore RY. Photic and neural control of the 24-hour norepinephrine rhythm in the rat pineal gland. *J Pharmacol Exp Ther.* 1967;157(3):487-92.

Xia Y, Kellems RE. Is preeclampsia an autoimmune disease? *Clin Immunol.* 2009;133(1):1-12.

Zugaib M. Doença hipertensiva específica da gravidez. In: Zugaib M, editor. *Zugaib obstetrícia*. 2ª ed. Barueri: Ed. Manole; 2012. cap 34, p. 634-662.

Zwahlen R, Walz A, Rot A. *In vitro* and *in vivo* activity and pathophysiology of human interleukin-8 and related peptides. *Int Rev Exp Pathol.* 1993;34(Pt B): 27-42.

9 Anexos

Anexo 1 - APROVAÇÃO PELA COMISSÃO DE ÉTICA PARA ANÁLISE DE PROJETOS DE PESQUISA - CAPPesq

APROVAÇÃO

O Presidente da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em 29.07.10, **APROVOU *ad-referendum*** o Protocolo de Pesquisa nº **0254/10**, intitulado: **"Dosagem de melatonina, citocinas e cortisol em gestantes com pré-eclâmpsia: Perfil sérico e placentário"**, apresentado pelo Departamento de **Obstetrícia e Ginecologia**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Dr. Rodrigo Ruano**

Pesquisador (a) Executante: **Eugenia Maria de Assunção Salustiano**

CAPPesq, 29 de Julho de 2010

PROF. DR. EDUARDO MASSAD
Presidente da Comissão de Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovídio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo - SP Fone: 011 3069 6442 Fax: 011 3069 6492 e-mail: cappesq@hcnet.usp.br
Rita