

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

**EFEITO DO ESTRESSE PERIOPERATÓRIO NA FUNÇÃO DO EIXO
IMUNOPINEAL DE PACIENTES SUBMETIDAS À
HISTERECTOMIA ABDOMINAL**

Mirella de Oliveira Tatsch Dias

Orientador: Prof. Dr. Wolnei Caumo

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Medicina: Ciências Médicas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas.

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Porto Alegre

2010

FICHA CATALOGRÁFICA

Tatsch Dias, Mirella de Oliveira

Efeito do Estresse Perioperatório na Função do Eixo Imunopineal de Pacientes Submetidas à Histerectomia Abdominal

f., enc.,

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2010.

1) Mecanismo fisiológico da secreção da melatonina e mecanismos reguladores; 2) Mediadores inflamatórios; 3) Glândula pineal e sistema imunológico; 4) Estresse e sistema imune-pineal; 5) Melatonina e dor.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL (UFRGS)

Porto Alegre, 2010

BANCA EXAMINADORA

Suzana Muller, Enfermeira, PhD.
Centro de Pesquisa Clínica do HCPA

Márcia Silveira Graudenz M.D., PhD.
Profa. da UFRGS
Departamento de Patologia

João Sabino Cunha Filho, MD. PhD.
Prof. da UFRGS
Departamento de Ginecologia

“Sê exaltado, ó Deus, sobre os céus; seja a tua glória sobre toda a terra”.

(Salmo 57: 5)

**Dedico esta dissertação
ao meu marido, que me apoiou em todos
os momentos, e a querida Manuela, que
Deus me presenteou, fruto desta relação.**

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Wolnei Caumo, orientador, pelos ensinamentos transmitidos, pela paciência, pela compreensão e, acima de tudo, pelo incentivo. Neste período pude perceber seu exemplo de humanidade. Só tenho a agradecer e a pedir que Deus o abençoe de uma maneira muito especial. Obrigada pela orientação e por poder ter sido sua aluna.

À Prof. Dr^a Regina P. Markus e a todo Grupo de Cronobiologia da USP, pelo apoio e colaboração neste trabalho.

À minha colega e amiga Liliane Vidor, por estar ao meu lado, sempre me apoiando, me dando força e me auxiliando em minhas dificuldades. Sua disponibilidade é incrível! Meu muito obrigada!

Aos demais colegas do Grupo de Cronofarmacologia, Dor e Neuromodulação, em especial Rosa Maria Levandovsk, pela parceria e colaboração.

Aos pacientes da pesquisa, pela colaboração e empenho em permitir todos os passos necessários para que este estudo fosse realizado por completo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre, por oportunizarem meu crescimento científico.

A FAPESP pelo apoio financeiro na realização deste projeto.

E, por último, mas com uma importância suprema, a Deus, pois sei que através Dele todos os mencionados acima foram colocados por Ele em meu caminho, fazendo com que eu chegasse até aqui. Deus, fica meu agradecimento eterno e meu pedido de que todos eles sejam contemplados com tua graça. Muito Obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	8
LISTA DE TABELAS	8
LISTA DE FIGURAS.....	9
RESUMO	12
ABSTRACT	14
1 INTRODUÇÃO.....	16
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	20
2.1 Estratégias para localizar e selecionar as informações.....	20
2.2 Mecanismos fisiológicos da secreção da melatonina.....	22
2.3 Mecanismos reguladores da secreção da melatonina.....	23
2.4 Mediadores inflamatórios e produção de melatonina pela glândula pineal.....	30
2.5 Estresse e regulação do eixo imunopineal.....	32
2.6 Melatonina e dor.....	36
3 JUSTIFICATIVA.....	38
4 MARCO TEÓRICO.....	41
5 OBJETIVOS.....	44
5.1 Objetivo Geral.....	45
5.2 Objetivos Específicos.....	45
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46
7 ARTIGO EM INGLÊS: Pineal melatonin surge, surgical stress and postoperative pain in patients undergoing abdominal hysterectomy submetido ao periódico <i>Pineal Research</i>.....	53
8 CONCLUSÕES.....	89
9 PERSPECTIVAS FUTURAS.....	91
10 ANEXOS	93

LISTA DE ABREVIATURAS

AA-NAT	Enzima aril-alquil-N-acetiltransferase
cAMP	Adenosina monofosfato cíclica
ATP	Adenosina trifosfato cíclica
BCG	Bacille Calmette-Guérin
NAS	N-acetilserotonina
HIOMT	Hidroindol-O-metiltransferase
HPA	Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal
NSQ	Núcleos supraquiasmáticos
PVN	Núcleo paraventricular
PKA	Proteína quinase A
LPS	Lipopolissacarídeos
NLS	Nuclear localization signal
iNOS	Óxido nítrico induzida
IL	Interleucina
IFN-γ	Interferon- γ
TNF	Fator de necrose tumoral
NF-κB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
P-CREB	Adenosina trifosfato cíclica fosforilada
CRH	Hormônio Corticotrópico
OVLT	Vasculosum organum da lâmina terminal
GC	Glicocorticóides
MEL	Melatonina
NA	Noradrenalina
5HT	5-Hidroxitriptofano

Tabelas do artigo em inglês

Table 1. Characteristics of sample, clinical variables measured during intraoperative and postoperative periods (n=12)

Table 2. GEE model adjusted on nocturnal melatonin secretion (4 days)

LISTA DE FIGURAS

Figuras da Revisão da Literatura

Figura 1.	Estratégia de busca de referências bibliográficas	21
Figura 2.	Esquema de ativação do fator de transcrição NFκB. Observa-se que diferentes vias de sinalização de membrana levam à translocação nuclear deste fator. Não está contemplada nesta figura a via não canônica, que tem ativação constitucional.	29
Figura 3.	Esquema representando a ação do estresse psicossocial e imunológico sobre o eixo imune-pineal. Observe que o estresse imunológico faz com células liberem IL-1 e que esta por sua vez atuará em diversos sistemas modulando a resposta do eixo.	35
Figura 4.	Modelo conceitual das relações entre a síntese de melatonina e a modulação por mediadores inflamatórios, construída a partir da base teórica que sustenta este estudo.	43

Figuras do Artigo em Inglês

- Figure 1.** Sequence of assessments and procedures during the study period.
- Figure 2.** Concentration of melatonin in the serum of patients from one week before to two days after surgery. Data are presented as mean \pm SEM (n= 12).
- Figura 3.** Daytime and nighttime serum concentration of TNF from pre-operative to post-operative days. Data are shown as mean \pm S.E.M. (n=12).The blood was obtained at 10h00 and 22h00 in all days, except for the day of surgery, when the blood was obtained only at night.
- Figura 4.** Daytime and nighttime serum concentration of cortisol in the pre-operative and post-operative days. Data are shown as mean \pm S.E.M. (n= 12).The blood was obtained at 10h00 and 22h00 in all days, except for the day of surgery, when the blood was obtained only at night.
- Figura 5.** Profile of nocturnal plasma melatonin concentration (pg/mL) from one week before the surgery to the 2nd days after surgery according to the level of TNF (high $>$ Q75=5.2 or low $<$ 5.2 pg/mL). Data are present as mean \pm SEM (n=12).

Figura 6. Profile of nocturnal plasma melatonin concentration (pg/mL) from one week before the surgery to the 2nd days after surgery according to the diurnal serum cortisol (high > Q50=22.4 or low Q50 < 22.4 ng/mL). Data are present as mean \pm SEM (n=12).

Figura 7. The immune-pineal axis – nocturnal melatonin surge is suppressed at the night of the surgery due to high levels of melatonin or cortisol.

RESUMO

Introdução: a resposta neuro-endócrina metabólica perioperatória está associada ao estresse, fadiga, ansiedade e dor. No entanto, poucos estudos têm investigado a interação entre os sistemas neuro-imuno-endócrino com o estresse pré-operatório e a recuperação pós-cirúrgica. Um aspecto relevante nesta questão é o envolvimento do sistema neuro-imuno-endócrino na relação entre estresse e dor pós-operatória.

Objetivo: o presente estudo avaliou os níveis diurnos e noturnos da melatonina, do TNF e do cortisol em mulheres submetidas a histerectomia nos períodos pré e pós-operatórios com intuito de avaliar a regulação da síntese de melatonina pela glândula pineal por meio das vias da inflamação e neuroendócrina.

Métodos e resultados: avaliou-se 12 pacientes submetidas a histerectomia abdominal. As amostras de sangue foram coletadas às 10h00 e 22h00, uma semana antes da hospitalização, no dia prévio à cirurgia, 1^o e o 2^o dias de pós-operatório e às 22h00 do dia da cirurgia. Na noite da cirurgia não houve níveis mensuráveis de melatonina noturna. Foram utilizados questionários para avaliar os níveis de estresse e dor e a relação da intensidade destes sintomas clínicos e o perfil bioquímico. Usando um modelo de Equação de Estimativa Generalizada [*Generalized Estimating Equations (GEE)*], evidenciou-se que os níveis séricos aumentados do TNF e do cortisol, bem como o estado de ansiedade elevado suprime a secreção da melatonina noturna. Para analisar a relação entre a secreção da melatonina ao longo do tempo e sua relação com cada um dos seguintes fatores: TNF, cortisol sérico matinal e estado de ansiedade, em primeiro lugar, estes fatores foram

categorizados tendo como referencial os quartis. De acordo com cada ponto de corte as médias e os desvios padrões da melatonina noturna foram: TNF (alto > $Q_{75}=5.2$ vs. baixo $Q_{75} < 5.2$ ng/mL) $57,35 \pm 40,85$ vs $24,17 \pm 11,79$ (P= 0.04); cortisol sérico matinal (alto > $Q_{50}=22.4$ vs. baixo $Q_{50} < 22.4$ ng/mL) $33,29 \pm 6,29$ vs $14,41 \pm 2,19$ (P= 0.03) e ansiedade estado (alta > $Q_{50}=24$ vs. baixa $Q_{50} < 24$ pontos no escore) $43,66 \pm 8,55$ vs $31 \pm 6,46$ (P= 0.03), respectivamente. Além disso, maiores níveis de dor pós-operatória na escala analógica visual (VAS), bem como maior ansiedade-traço se relacionaram com menores níveis de melatonina noturna perioperatória.

Conclusão: os resultados deste trabalho reforçam a hipótese de que a glândula pineal desempenha um papel expressivo na reação ao estresse cirúrgico. A elevação dos níveis de TNF na fase pró-inflamatória, e do cortisol suprimem a produção da melatonina pela pineal, desligando o braço hormonal, o que permite a montagem da resposta de defesa. Considerando tais evidências, a reação que ocorre entre o TNF, o cortisol e a glândula pineal é essencial para permitir uma recuperação completa e eficiente no período pós-operatório.

Palavras-chave: melatonina, dor, ansiedade, TNF, cortisol, cirurgia.

ABSTRACT

Background: Neuro-endocrine metabolic response in the perioperative period is associated with distress, fatigue, anxiety, and acute postoperative pain. However, few researches have investigated the interaction between the neuroendocrine-immune system, preoperative stress, and post-surgical recovery. A relevant aspect in this equation is the involvement of the neuroendocrine-immune interaction in the relationship between preoperative stress and post-surgical pain.

Objective: The present study followed the daytime and nighttime levels of melatonin, TNF and cortisol, in women that had undergone a hysterectomy from the pre-surgical to postsurgical periods out to study the regulation of melatonin synthesis by the pineal gland by airway inflammation and neuroendocrine.

Methods and results: We evaluated 12 women who underwent an abdominal hysterectomy. Blood was collected, at 10h00 and 22h00, one week and one day before surgery; at the first and second days after surgery and at 22h00 on the day of surgery. On the night of surgery there was no melatonin surge. In addition questionnaires for evaluating stress and pain levels showed a correlation between personal information and biochemical profiles. *Generalized Estimating Equations (GEE)* revealed that high TNF and serum cortisol, as well high state-anxiety decrease the nocturnal melatonin surge. To analyze the relationship between the melatonin surge on time and its relationship with each one of the following factors, firstly, they were classified according to cutoff points using quartiles. The mean and standard deviation of nocturnal melatonin was TNF (high > $Q_{75}=5.2$ vs. low $Q_{75} < 5.2$

ng/mL) 57.35 ± 40.85 vs 24.17 ± 11.79 , ($P=0.04$); morning serum cortisol (high > $Q_{50}=22.4$ vs. low $Q_{50} < 22.4$ ng/mL) 33.29 ± 6.69 vs. 14.41 ± 2.19 , ($P=0.03$) and state-anxiety (high > $Q_{50}=24$ vs. low $Q_{50} < 24$ points], 43.66 ± 8.55 vs. 31 ± 6.46 , ($P=0.03$); respectively. Also, the increase of postoperative pain on visual analogue scale (VAS), as well as higher trait-anxiety was linked with lower nocturnal melatonin surge in perioperative period.

Conclusion: the results support the hypothesis that the pineal gland plays a role in the progressive reaction to surgical stress. In the proinflammatory phase, TNF shutdown melatonin production and allows for the mounting of the defense response. Also, it is observed that the cortisol is a determinant in the regulation of nocturnal melatonin surge, together with the release of high amounts of TNF in the circulation, at the start of a defense response, suppressing the melatonin surge. Taking into account these evidences, it is possible to suppose that this orchestrated reaction between TNF, cortisol, and the pineal gland should be essential in allowing for a full and efficient postoperative recovery.

Key words: melatonin, pain, anxiety, TNF, cortisol, surgery.

1 INTRODUÇÃO

A glândula pineal participa do sistema de temporização endógeno, cujo efeito é mediado pela melatonina. A produção deste neuro-hormônio decorre da estimulação de adrenoceptores β_1 pelo sistema simpático. Portanto, a concentração de melatonina plasmática reflete diretamente a produção desta indolamina pela glândula pineal (Markus *et al.*, 2003; Simonneaux & Ribelayga, 2003). A síntese da melatonina acontece a partir da acetilação da serotonina pela ação da enzima aril-alquil-N-acetiltransferase (AA-NAT), originando o precursor N-acetilserotonina (NAS) que é metilado para 5-metoxi-N-acetilriptamina ou melatonina. A enzima responsável por esta última etapa é a hidroxindol-O-metiltransferase (HIOMT).

Embora o estímulo noradrenérgico seja um passo essencial da síntese, foi verificado que a lesão crônica induzida por injeção de BCG em pata de camundongos apresentava variação no ciclo das 24 horas, regulada pelo pico noturno de melatonina (Lopes *et al.*, 1997). Estes achados abriram uma linha de investigação sobre a interação do sistema imune e o processo de secreção da melatonina, cujo efeito inibe a síntese deste neuro-hormônio. Além do efeito regulador da noradrenalina, estudos subsequentes demonstram que a administração *in situ* de concentrações de corticosterona compatíveis com as encontradas na circulação, quando da ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) (Nadeau 2002, 2003), promoveu aumento significativo da produção de melatonina pela pineal. Este efeito só foi observado na fase de escuro (Fernandes *et al.*, 2007) e confirmou que a corticosterona potencializa a resposta induzida por noradrenalina, mas não é capaz de promover uma resposta *per se*.

Outro estudo evidenciou que a melatonina inibia parcialmente a rolagem e a adesão de leucócitos na camada endotelial e que estes efeitos eram mediados por diferentes receptores de membrana específicos de melatonina (Lotufo *et al.*, 2001). Um fato intrigante observado foi que o efeito da melatonina ocorria em concentrações compatíveis com a produção noturna, sugerindo, portanto, que a melatonina seria um freio para que leucócitos atravessassem a barreira endotelial promovendo uma agressão a tecidos. Levantou-se então a hipótese de que, no início de uma resposta à lesão, a elevação do cortisol freitaria o processo de síntese, permitindo que o recrutamento de leucócitos para os locais lesados pudesse ser atendido de forma eficiente.

Estudos subsequentes demonstraram que a produção de citocinas e glicocorticoides numa seqüência temporal é, na verdade, um processo bem coordenado envolvendo uma fase pró-inflamatória e uma fase anti-inflamatória (Nadeau *et al.*, 2002, 2003). Neste sentido, uma das primeiras citocinas liberadas é o fator de necrose tumoral (TNF) seguido pela interleucina-1 β (IL-1 β) e, por último, pelo interferon (IFN- γ) (Carrillo-Vico *et al.*, 2005). Estes mediadores controlam a produção de melatonina frente a diferentes estímulos inflamatórios (Ferreira *et al.*, 2005; Fernandes *et al.*, 2006). A inibição desta via de transcrição por corticosterona potencializa, enquanto que a ativação induzida por TNF inibe a produção de melatonina induzida por noradrenalina em glândulas pineais de ratos em cultura. Considerando que esta é uma via central para o desencadeamento e o controle do decurso temporal da resposta inflamatória, temos as primeiras evidências de que esta glândula não seria apenas controlada pela alternância claro-escuro, mas que, em condições adversas, também poderia sofrer o controle de sinalizadores da inflamação. Logo, a produção de melatonina não somente depende da sinalização noradrenérgica como também

da produção de corticosterona pela medula adrenal (Lopes *et al.*,1997). Portanto, frente ao estresse, aspectos do funcionamento psicológico podem desregular a integração sequencial e sincronizada de sinais neurais, endócrinos, parácrinos e autócrinos independentemente do agente iniciador. O resultado deste efeito evita danos aos tecidos e aumenta a rápida recuperação e cicatrização tecidual (Licastro, 2005). Este é um sistema fisiológico que contribui para cessar o início de uma resposta desnecessária (Nelson, 2000), e a ascensão noturna de melatonina, provavelmente também ajudando a evitar uma resposta de defesa desnecessária.

Portanto, quando o organismo é lesado, uma resposta rápida e eficiente é necessária independentemente da hora do dia, entendendo-se então que o organismo necessita suprimir a produção de melatonina pela pineal a fim de permitir a completa defesa (Markus *et al.*, 2007). Concorrem para este processo o efeito de estressores agudos e crônicos, que desregulam o HPA e seu produto final, o cortisol (Ockenfels *et al.*, 1995; Hellhammer *et al.*, 1997), que desinibe a síntese de citocinas pró-inflamatórias (Kunz-Ebrecht *et al.*, 2003). Embora este modelo que integra o efeito de mediadores inflamatórios tenha sido estudado em animais, em modelos de mastite e de pacientes submetidas a cesariana e a parto vaginal, é necessário explorar a função deste eixo imunopineal em situações de estresse, como no período perioperatório. Sobretudo, para compreender como a função deste eixo se relaciona com a ansiedade pré-operatória, com a dor e com o curso da recuperação pós-operatória. Considerando estas evidências sobre o eixo imunopineal, o objetivo do presente estudo foi avaliar a relação entre os níveis de TNF com os níveis plasmáticos de melatonina e, em contrapartida, a relação do cortisol e da ansiedade com a secreção desta indolamina em pacientes submetidas à histerectomia abdominal total por patologia benigna, além do decurso temporal desta relação.

Nossa hipótese é que no período perioperatório: i) a produção de melatonina pineal é suprimida durante a montagem de uma resposta inflamatória; ii) a intensidade da dor pós-operatória está relacionada com a função de nível do eixo imunopineal; iii) menor secreção de melatonina pode refletir maior resposta endócrina ao estresse mensurada pela ansiedade e pelo cortisol.

A presente pesquisa originou um artigo que está elaborado de acordo com as normas da revista *Pineal Research*, à qual o mesmo foi submetido para apreciação e possível publicação. A estrutura da apresentação deste trabalho segue as normas do Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Estratégias para localizar e selecionar as informações

Esta revisão da literatura volta-se para aspectos vinculados ao processo inflamatório, com ênfase no uso da melatonina, logo sua relação com o eixo imunopineal. A apresentação do tema baseou-se nos seguintes tópicos, tendo como alvo de interesse a secreção da melatonina pela glândula pineal: 1) mecanismos fisiológicos e reguladores da secreção da melatonina; 2) mediadores inflamatórios; 3) estresse e regulação do eixo imunopineal; 4) melatonina e dor.

Foram selecionados estudos experimentais e clínicos cujo termo *pineal axis* ou *melatonin* e/ou *inflammation* ou *inflammatory mediators* e/ou *cortisol* localizados nas seguintes bases de dados: MEDLINE (de 1960 a 2010) (MeSH, site PubMed), LILACS (de 1982 a 2010). Foram utilizados também o banco de teses da CAPES, livros-texto e monografias para identificar materiais relevantes. As palavras-chave foram *pineal axis*; *melatonin*; *TNF and melatonin*; *anxiety and melatonin*; *stress and melatonin*; *pain and melatonin*, em diversas combinações, apresentadas na figura 1.

Consideraram-se, no processo de revisão da literatura, os níveis de TNF e cortisol como fatores, e os níveis de melatonina, como desfecho.

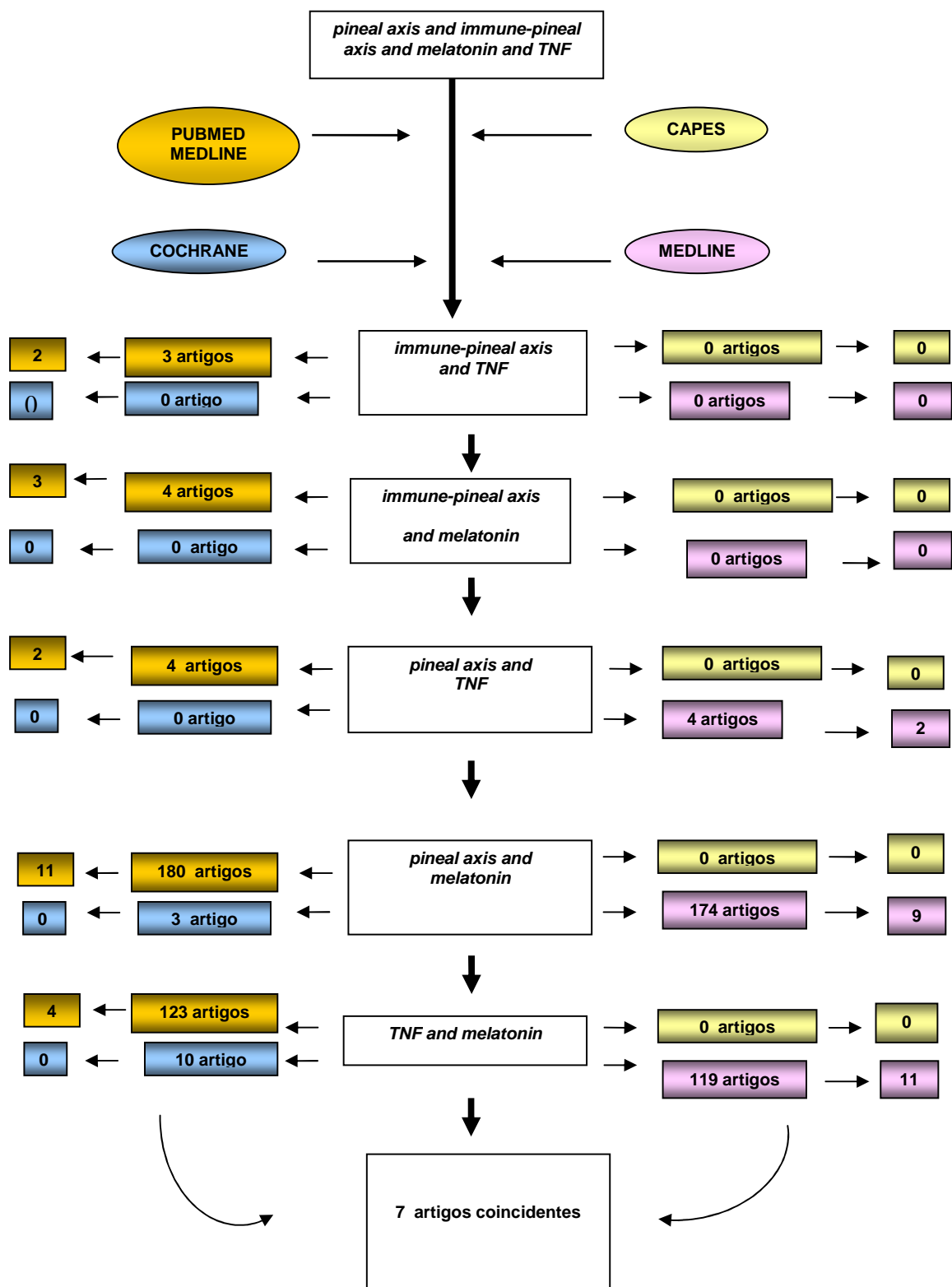


Figura 1 - Estratégia de busca de referências bibliográficas

2.2 Mecanismo fisiológico da secreção da melatonina

A glândula pineal é composta de pinealócitos e astrócitos, sendo que os primeiros são fundamentalmente neurônios altamente diferenciados dispostos em agregados e cordões circundados por uma vasta rede de capilares fenestrados e axônios não mielinizados (Jouvet *et al.*, 1994) noradrenérgicos e serotoninérgicos (Sugden, 1994) originários dos gânglios cervicais superiores (Ross *et al.*, 1993).

A pineal é parte integrante do sistema de temporização endógeno. Os núcleos supraquiasmáticos (NSQ) do hipotálamo funcionam como osciladores centrais. A retina recebe informação fótica e, através do trato retino-hipotalâmico, sincroniza o NSQ, o oscilador central à alternância claro-escuro ambiental. Os NSQs, através de uma via polissináptica, enviam para o núcleo paraventricular (PVN) do hipotálamo que projeta a eferência simpática até a coluna intermediolateral da medula, de onde são emitidas fibras simpáticas que inervam a pineal (Simonneaux & Ribelayga, 2003). A via neural retino-hipotalâmica é responsável pela sincronização do relógio biológico ao ciclo claro-escuro ambiental, e a via polissináptica, que liga o relógio à pineal, é responsável pela produção de melatonina na fase de escuro.

A inervação da pineal é feita pela via simpática, a partir dos gânglios cervicais superiores, e o desencadeamento da via de transdução cAMP- proteína quinase A (PKA) é decorrente da estimulação de adrenoceptores β_1 . A concentração de melatonina plasmática reflete diretamente a produção de melatonina pela glândula pineal (Markus *et al.*, 2003; Simonneaux & Ribelayga, 2003). Os neurônios simpáticos também liberam ATP e neuropeptídeo Y (Mortani *et al.*, 2000; Simonneaux & Ribelayga, 2003) que atuam como cotransmissores da noradrenalina. Além disto, o aumento de cálcio intracelular

desencadeado pela ativação de receptores purinérgicos P2Y₁ (Ferreira *et al.*, 1994), pode potencializar a produção noturna de melatonina, que é desencadeada pela ativação de adrenoceptores β_1 .

A melatonina é sintetizada a partir da acetilação da serotonina pela ação da AA-NAT, originando o precursor NAS que posteriormente é metilado para 5-metoxi-N-acetiltryptamina ou melatonina. A enzima responsável por esta última etapa é a HIOMT, mais envolvida com as variações de longo prazo do fotoperíodo do que com as variações diárias de iluminação ambiental (Simonneaux & Ribelayga, 2003).

2.3 Mecanismos reguladores da secreção da melatonina

O gene AA-NAT, localizado no cromossomo 11, posição E1.3–2.3 em camundongos, no cromossomo 10q32.3 em ratos (Yoshimura *et al.*, 1997), e no cromossomo 17q25 em humanos (Coon *et al.*, 1996), está organizado em três íntrons e quatro éxons e codifica apenas um transcrito com tamanho entre 1.0 e 1.7 kb. A expressão de AA-NAT é regulada não só pelo promotor mas também pelas regiões intrônicas que contêm os elementos-chave para garantir o padrão temporal de ativação do mesmo (Baler *et al.*, 1999). O controle da transcrição de AA-NAT se dá por um promotor partido ao meio, composto pelas sequências do primeiro íntron e das bases anteriores ao ponto de início da transcrição. A regulação positiva nos tecidos que se comportam como osciladores mestres, é mediada por fatores de transcrição, formados por peptídios sintetizados a partir dos genes do relógio, enquanto nos servo-osciladores a ativação é feita através de fator de transcrição resultante da ativação de adrenoceptores β_1 (P-CREB).

O aumento noturno de melatonina no rato requer a transcrição de mRNA e neossíntese de proteína (Roseboom *et al.*, 1996; Gastel *et al.*, 1998). A proteína é muito

instável ($t_{1/2}$ entre 3 a 5 min.), sendo o encerramento da transcrição do gene concomitante com o fim da atividade enzimática. No final da noite, ou logo após um “flash” de luz, a atividade da AA-NAT decai em poucos minutos. Em humanos e em ungulados o controle da ritmicidade diária da produção de melatonina pela pineal é realizado sobre a atividade da enzima, visto que a expressão do gene não varia ao longo das 24 horas (Simonneaux & Ribelayga, 2003).

Além da regulação fótica, evidências de estudos experimentais e de estudos clínicos têm sugerido que mediadores da inflamação e do estresse podem alterar a atividade desta enzima-chave na síntese de melatonina. Estudos realizados em laboratório visando avaliar o efeito da melatonina em processos inflamatórios ou em mecanismos celulares desencadeados de forma estereotipada por esses processos, sugerem fortemente que, no início da resposta inflamatória, a produção noturna de melatonina pela glândula pineal é silenciada. Por outro lado, esta indolamina passa a ser produzida localmente, com o objetivo de combater o agente injuriante (Fernandes *et al.*, 2006).

Os estudos sobre a participação da glândula pineal em respostas inflamatórias tiveram início na década de 1990, quando se verificou que a lesão crônica induzida por injeção de BCG em pata de camundongos apresentava uma variação diária regulada pelo pico noturno de melatonina (Lopes *et al.*, 1997). Nestas condições, a produção noturna de melatonina dependia não somente da sinalização noradrenérgica, mas também da produção de corticosterona pela medula adrenal (Lopes *et al.*, 2001). Este achado suscitou a hipótese de que pineais de roedores estavam aptas a responder a glicocorticoides e que, durante o processo inflamatório, a produção de melatonina seria dependente não somente da sinalização simpática, mas também dos níveis circulantes de glicocorticoides que teriam uma ação facilitadora. Estudos evidenciaram que a produção de melatonina por glândulas

pineais em culturas estimuladas por noradrenalina é modulada por corticosterona; baixas concentrações potencializam e altas concentrações não alteram ou inibem a produção de melatonina induzida por noradrenalina (Ferreira *et al.*, 2005). Os efeitos da corticosterona são inibidos por bloqueio de seus receptores com mifepristone. Além disto, dados de estudos subsequentes demonstram que a administração *in situ* de concentrações de corticosterona compatíveis com as encontradas na circulação, quando da ativação do HPA (Nadeau 2002, 2003), promove aumento significativo da produção de melatonina pela pineal. Este efeito só é observado na fase de escuro (Fernandes *et al.*, 2007), o que vem a confirmar que corticosterona potencializa a resposta induzida por noradrenalina, mas não é capaz de promover uma resposta *per se*. Desta forma, ficou evidente que a pineal de ratos responde à corticosterona e que, em condições especiais, provavelmente de estimulação crônica, a corticosterona potencializa a produção de melatonina induzida por noradrenalina, ou seja, por ativação simpática.

Além da regulação fótica e hormonal, observou-se que a melatonina inibe parcialmente a rolagem e a adesão de leucócitos na camada endotelial e que este efeito é mediado por diferentes receptores de membrana específicos da melatonina (Lotufo *et al.*, 2001). Este efeito foi observado em concentrações compatíveis com a produção noturna de melatonina, o que sugere que ela seria um freio para que leucócitos atravessassem a barreira endotelial promovendo uma agressão a tecidos. A consequência direta deste posicionamento é que, no início de uma resposta à lesão, esse freio deveria ser retirado, permitindo que o recrutamento de leucócitos para os locais lesados pudesse ser atendido de forma eficiente.

Tal questionamento deveria pressupor que a pineal tivesse capacidade de responder a agentes infecciosos e a citocinas pró-inflamatórias circulantes. A relação entre melatonina

e lipolissacarídios (LPS), por exemplo, vem sendo avaliada na literatura. Em ratos, o LPS (dose não letal), administrado pela via endovenosa, tem acesso à glândula pineal, se acumulando no endotélio, na micróglia e nos pinealócitos, o que resulta em diminuição significativa da produção noturna de melatonina (Jiang-Shieh *et al.*, 2005). Sabe-se que tanto os astrócitos como as micróglia da própria pineal influenciam a síntese de melatonina pelos pinealócitos. Neste sentido, células gliais da pineal atuam modulando as funções endócrinas dos pinealócitos diretamente pela secreção de citocinas específicas ou indiretamente pela mediação de seus efeitos (Tsai *et al.*, 2001). Estudos *in vivo* demonstram que o LPS induz a produção de citocinas e glicocorticoides (Nadeau *et al.*, 2002, 2003) numa sequência temporal que é, na verdade, um processo bem coordenado envolvendo uma fase pró-inflamatória e uma fase anti-inflamatória. Neste sentido, uma das primeiras citocinas liberadas é o TNF, seguido pela IL-1 β e, por último, pelo IFN- γ (Carrillo-Vico *et al.*, 2005).

Na busca dos mecanismos celulares para o controle da produção da melatonina por moduladores inflamatórios, estudos avaliaram a ativação da via de transcrição NF κ B em glândulas pineais de ratos frente a diferentes estímulos inflamatórios (Ferreira *et al.*, 2005; Fernandes *et al.*, 2006). A inibição desta via de transcrição por corticosterona potencializa, enquanto a ativação induzida por TNF inibe a produção de melatonina induzida por noradrenalina em pineais de rato em cultura. Considerando que esta é uma via central para o desencadeamento e o controle do decurso temporal da resposta inflamatória, temos as primeiras evidências de que esta glândula não seria apenas controlada pela alternância claro-escuro, mas que, em condições adversas, também poderia sofrer o controle de sinalizadores da inflamação.

NFκB é um fator de transcrição cuja atividade é regulada pela sua translocação citoplasma-núcleo. Em células não estimuladas, este fator está retido no citoplasma devido ao mascaramento da sequência sinalizadora da localização nuclear (NLS; do inglês: *nuclear localization signal*) por proteínas inibitórias conhecidas como IκB (Karin & Ben-Neriah, 2000). A ativação das células por fatores injuriantes, tais como citocinas pró-inflamatórias, produtos bacterianos e virais, agentes mitogênicos, estresse oxidativo, leva à ativação de proteínas quinases (complexo das IκB quinases, IKK) que resulta na fosforilação da IκB. IκB fosforilada em um resíduo de serina da porção N-terminal é ubiquitinada e degradada, expondo a sequência de peptídeos NLS que é reconhecida pela maquinaria de importação ao núcleo. NFκB é então rapidamente transportado para o núcleo, regulando a expressão de genes dependentes deste fator (O'Neill & Kaltschmidt, 2007). Esta é uma via de sinalização clássica na resposta inflamatória e promove a transcrição de um pacote de genes necessários para a montagem e término deste processo de defesa do organismo. Em outras palavras, na fase inicial são ativados mecanismos capazes de combater a injúria e, em seguida, o processo deve ser desativado para que não haja agressão ao próprio organismo. Entre as proteínas cuja expressão é induzida por NFκB, podem-se mencionar citocinas pró- e anti-inflamatórias, enzimas como a síntese de óxido nítrico induzida (iNOS), ciclooxigenase II e o receptor de bradicinina B1 (Figura 2).

A estimulação de diferentes receptores de membrana leva à ativação de NFκB por vias especiais. O TNF interage com seus receptores ligados à membrana e ativa, por uma via independente da proteína adaptadora MyD-88, a proteína quinase IKK que fosforila a proteína inibitória, responsável por manter o dímero NFκB no citoplasma (Kovalenko & Wallach, 2006). Como pode ser visto na figura 2, outros sinais que induzem a translocação

nuclear do NFκB atuam por vias paralelas e, portanto, há necessidade de se testar cada uma destas vias para podermos definir com clareza a forma como é utilizada na pineal. NFκB, além de ter um papel central na sinalização de respostas inflamatórias e no câncer (Karin & Ben Neria, 2000), pode estar constitutivamente ativado (Ziegler & Ghosh, 2005) e participar de processos fisiológicos, como o desenvolvimento neuronal (Bhakar *et al.*, 2002; Fridmacher *et al.*, 2003). Atividade constitutiva de NFκB já presente em neurônios do córtex e hipocampo é desencadeada por despolarização da membrana, ativação de receptores glutamatérgicos e pela proteína beta amilóide (Massa *et al.*, 2006). Já foi relatada atividade NFκB *in vivo* em doenças neurodegenerativas e em modelos animais para o estudo de convulsão e acidente vascular cerebral (Kaltschmidt & Kaltschmidt, 2000; Mattson & Camandola, 2001) e a ablação seletiva da expressão de genes envolvidos na via de transcrição NFκB no córtex frontal aumenta a neurodegeneração (Fridmacher *et al.*, 2003). Desta forma, estudos *in vitro* e *in vivo* mostram que esta via de sinalização é importante no desenvolvimento e na manutenção do sistema nervoso central.

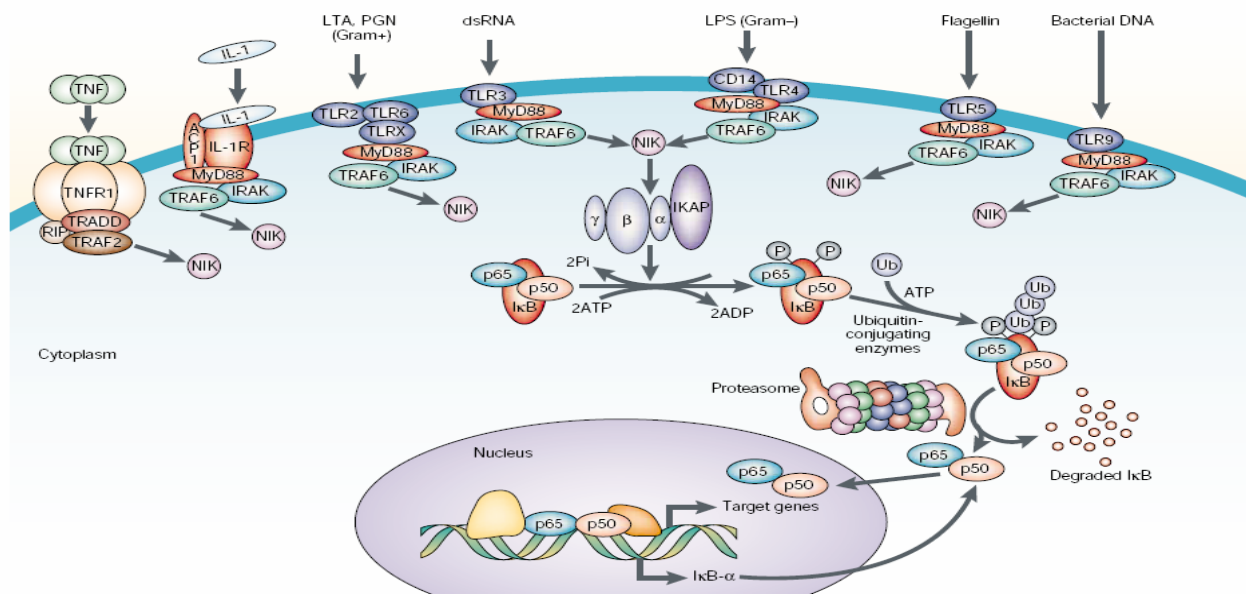


Figura 2 - Esquema de ativação do fator de transcrição NFκB. Observa-se que diferentes vias de sinalização de membrana levam à translocação nuclear deste fator. Não está contemplada nesta figura a via não canônica, que tem ativação constitucional.

O primeiro teste da hipótese de que agentes envolvidos em uma resposta inflamatória seriam capazes de modular a produção de melatonina foi feito com um modelo de inflamação aguda que ocorre em mulheres no início da lactação. A mastite é uma inflamação não infecciosa que inicia quando o lactente começa a sugar leva a uma enorme secreção de TNF no colostro (Filteau, 2003). Recentemente, uma equipe da área de Cronofarmacologia da Universidade de São Paulo, coordenada pela professora Regina Markus verificou que, em mulheres saudáveis, a concentração de TNF no colostro está abaixo do limite de detecção e que ocorre um enorme aumento da secreção de melatonina à noite, quando comparada com a secretada durante o dia. No caso de parturientes que desenvolvem mastite, não é observado o pico noturno de melatonina (Pontes et al., 2006).

Além disto, foi mostrada uma correlação negativa entre a secreção de TNF e a secreção de melatonina. Portanto, esses estudos corroboram a hipótese de que a produção noturna de melatonina é abolida com o aumento de TNF. Adicionam-se às evidências oriundas desses trabalhos, dados da literatura com processos inflamatórios agudos indicativos desta relação, apesar de os autores focarem na possibilidade de a melatonina interferir na produção da citocina. Como exemplo, o pico noturno de melatonina está reduzido em pacientes com infarto agudo do miocárdio, quando comparados com pacientes normais (Dominguez-Rodriguez *et al.*, 2002). Em 2004, os mesmos autores compararam as concentrações diurnas e noturnas de melatonina com as de interleucina 6 (IL-6) e mostraram que há aumento desta última e redução da concentração noturna de melatonina após o infarto do miocárdio. Apesar do trabalho apenas medir estes dois parâmetros, os autores, baseados em hipóteses da literatura, sugerem que a melatonina estaria controlando a produção de IL-6 e não o oposto (Domiguez-Rodriguez *et al.*, 2004).

Em resumo, no ano de 2006 foi proposto um novo paradigma para a inserção da glândula pineal em respostas à injúria, e considerando que a produção de melatonina pela pineal é suprimida em face de uma injúria aguda e que esta supressão depende da translocação nuclear do NFkB. Esta translocação bloqueia a transcrição de AA-NAT em roedores. Esta proposta de um **eixo imunopineal** tem de ser validada para outras formas de injúria e em outros modelos clínicos, como o curso perioperatório.

2.4 Mediadores inflamatórios e produção de melatonina pela glândula pineal

A inflamação é a resposta do organismo a estímulos agressores de naturezas diversas, com o objetivo de reparação tecidual. Este processo apresenta-se primeiramente de forma aguda, gerando aumento da produção de diferentes citocinas, condição que

também provoca aumento do estresse oxidativo (Ritter *et al.*, 2004). Na inflamação aguda ocorre aumento do fluxo sanguíneo, alterações estruturais na microvascularização, saída de proteínas plasmáticas e leucócitos formando o exsudato inflamatório e migração dos leucócitos da microcirculação para o foco da lesão. É na migração celular que se verifica a interação dos leucócitos com o endotélio, dividida em três etapas: *rolling*, adesão e transmigração (Markus *et al.*, 2003).

A resposta imunológica ao trauma cirúrgico gera intensa resposta inflamatória e imunossupressiva, principalmente da imunidade celular (Gilliland *et al.*, 1997). Esta resposta é mediada por citocinas que regulam respostas imunes específicas e não específicas (inflamatórias). As citocinas pró-inflamatórias, TNF e IL-1, que coexistem com o antagonista competitivo da IL-1, o receptor solúvel do TNF, e com a IL-10, que é anti-inflamatória (Gilliland *et al.*, 1997) estão associadas com indução e manutenção da dor pós-incisional (Wolf *et al.*, 2008), com hiperalgesia (Watkins *et al.*, 1995), e com os efeitos reduzidos de opioides analgésicos (Hutchinson *et al.*, 2008).

Também participam desta resposta inflamatória perioperatória a IL-1 β e a IL-6, ambas com importante papel na dor pós-operatória, por induzirem a sensibilização periférica e central (Wiertelack *et al.*, 1994). Estudos recentes experimentais e clínicos evidenciaram que estes mediadores da inflamação aguda inibem o ritmo de secreção da melatonina, que parece estar relacionado à severidade da injúria cirúrgica. Em parturientes com mastite, observou-se que a alta concentração de TNF associou-se à baixa concentração de melatonina (Pontes *et al.*, 2006).

Este conjunto de evidências corrobora a hipótese de um eixo imunopineal, que foi suprimido na fase inicial da resposta de defesa, porque o organismo não recebe informação

circadiana através do braço hormonal. Em puérperas submetidas à cesariana, a produção da melatonina é restaurada em torno do décimo quinto dia pós-operatório, quando o TNF é reduzido a concentrações abaixo das detectáveis. Também este neuro-hormônio apresenta importante efeito anti-inflamatório (El-Shenawy *et al.*, 2002). Este corpo de evidências apóia a ideia de que a resposta inflamatória apresenta um ritmo diário, com mínima intensidade no período do escuro (Lopes *et al.*, 1997) e que a melatonina pode bloquear o início da resposta inflamatória, por inibir parcialmente o rolamento e a adesão de neutrófilos (Lotufo *et al.*, 2001). Os possíveis mecanismos pelos quais a melatonina pode interferir no processo inflamatório são: i) inibição da produção de óxido nítrico e redução da expressão da óxido nítrico-sintetase; ii) ativação do fator de transcrição NF- κ B; iii) redução da expressão da óxido nítrico sintetase em nível transcricional; iv) redução dos níveis de prostaglandinas e da expressão da ciclooxigenase-2; e v) redução do recrutamento de polimorfonucleares no sítio inflamado (Cuzzocrea *et al.*, 2001).

2.5 Estresse e regulação do eixo imunopineal

A influência da mente sobre o estado de saúde dos indivíduos bem como sobre sua suscetibilidade e capacidade de recuperação a estados patológicos já é conhecida de longa data. Na Antiguidade, essa interação corpo-mente foi bem evidenciada por Aristóteles (384-322 a.C.), que ensinava que psique e corpo interagem complementarmente. Assim, alterações da psique eram promotoras de mudanças no corpo, e vice-versa. Já na era Cristã, Galeno (129-200 d.C.) observou que mulheres melancólicas eram mais suscetíveis ao desenvolvimento de tumores de mama do que “mulheres de sangue quente” (Dunn, 1988). Na era Moderna, Calzolari (1898 apud Lawrence & Kim, 2000) mostrou que os hormônios

gonadais influenciavam a celularidade tímica. A sistematização e a definição destes conhecimentos feitas por Hans Selye, em 1936, permitiram que eles passassem do campo descritivo para o campo conceitual (Neylan, 1998). A partir de experimentos realizados com ratos expostos agudamente a “agentes danosos” não específicos, Selye definiu a síndrome de adaptação geral, caracterizada por aumento no peso das adrenais, atrofia tímica, esplênica e linfóide, além da presença de úlceras gástricas; tal denominação foi, posteriormente, designada simplesmente como estresse (Neylan, 1998). Os mecanismos básicos de resposta ao estresse são muito similares e foram bem conservados na escala evolutiva, desde invertebrados a vertebrados superiores (Ottaviani *et al.*, 1994).

O estresse pode ser classificado em duas grandes categorias: (1) estresse físico ou “sistêmico” e (2) estresse psicológico ou “processivo”. O estresse físico é secundário a estímulos (por exemplo, hemorragia, cirurgia e respostas inflamatórias) que alteram o estado fisiológico, enquanto o estresse psicológico é causado por estímulos que promovem ameaça imediata ou futura ao organismo (são exemplos clássicos: conflito social, estímulo ambiental aversivo, presença ou sinais do predador) (Sawchenko *et al.*, 1996).

Dados da literatura mostram que a produção de melatonina está alterada de forma consistente após um estresse físico, tanto em roedores (Lopes *et al.*, 1997; 2001) quanto em humanos (Pontes *et al.*, 2006). Em camundongos foi observado que, em condições de inflamação crônica, a produção noturna de melatonina pela pineal depende de uma ação conjunta da atividade simpática, que está aumentada no escuro, e dos níveis de corticosterona circulante, elevados pelo processo inflamatório. Em humanos foi demonstrada correlação negativa entre TNF e melatonina (Pontes *et al.*, 2006; 2007). Então, considerando-se que a glândula pineal é diretamente regulada pelo sistema simpático, é plausível supor que o estresse ativa e disfunciona o sistema autonômico,

determinando alterações no eixo imunopineal, expressas como disfunções do ritmo circadiano e suscetibilidade a processos infecciosos como gripe e herpes, e não infecciosos, como depressão. Estas alterações podem ter influência no eixo hipófise-córtico-adrenal e, portanto, nos hormônios marcadores de estresses, como cortisol e corticosterona. Então, é possível hipotetizar que disfunções no eixo imunopineal determinadas por estas alterações tenham implicação no curso da convalescença pós-operatória. Esta hipótese é embasada por substrato anátomo-funcional, que é responsável por governar os sintomas que expressam a disfunção deste sistema temporizador endógeno. O substrato deste processo é constituído pela substância cinzenta periaquedutal, implicada nas manifestações afetivas, na modulação do sono e na nocicepção. Similarmente, o tálamo, está associado com o despertar e o processamento dos estímulos nociceptivos com o córtex. Então é plausível supor que dor e sistema pineal tenham estreita relação, já que dor persistente determina alterações funcionais nas células do núcleo magno da rafe, as quais modulam manifestações afetivas e o ciclo sono-vigília (Foo & Mason, 2003). No entanto, ainda não está evidenciado se a dor é causa ou conseqüência dos distúrbios do ciclo sono-vigília. Talvez uma melhor elucidação seja encontrada na conceitualização de uma relação de reciprocidade entre os sistemas, nos quais as alterações de sono e dor caracterizam manifestações de um mesmo sistema, em que um pode contribuir para a expressão ou intensidade do outro. Este conjunto de informações poderá permitir um avanço na compreensão do eixo imunopineal. Razão pela qual é premente investigar como se processam as alterações deste eixo em situações clínicas corriqueiras de grande demanda das funções de ajuste sistêmico, como o curso perioperatório (figura 3).

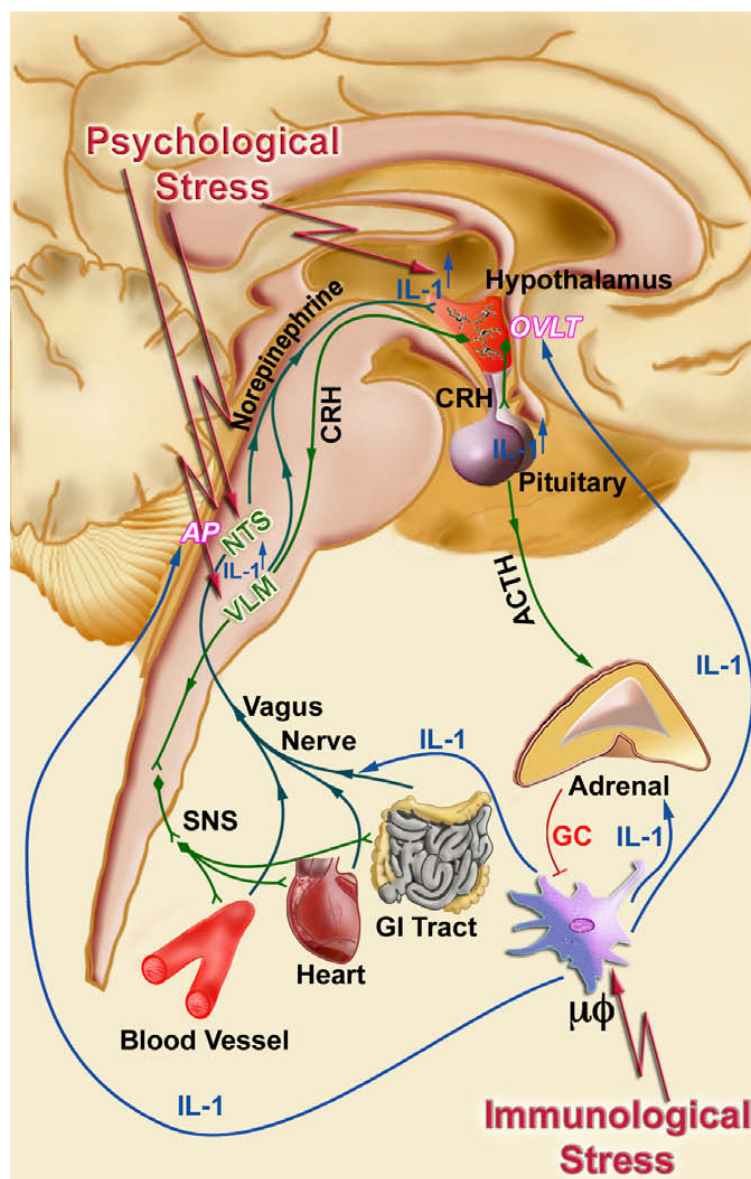


Figura 3 - Esquema representando a ação do estresse psicossocial e imunológico sobre o eixo imunopineal. Observe que o estresse imunológico faz com que células liberem IL-1 e que esta, por sua vez, atuará em diversos sistemas modulando a resposta do eixo.

2.6 Melatonina e dor

A melatonina possui diversas funções fisiológicas, tais como regulação do fotoperíodo, controle da ansiedade, ação anti-inflamatória e, conseqüentemente, controle da dor. Alguns de seus efeitos são mediados pelos receptores, enquanto outros dependem direta e indiretamente dos radicais livres. Dentre os muitos efeitos da melatonina, inclui-se a ação antinociceptiva. Glutamato, ácido gama-aminobutírico, e, particularmente, a neurotransmissão opioide têm demonstrado estar envolvidos na analgesia da melatonina. Estudos em que foram utilizados antagonistas dos receptores de melatonina apoiam a participação de seus receptores na analgesia (Srinivasan et al., 2010). Provavelmente o efeito antinociceptivo da melatonina envolva a ativação de centros supraespinhais (Morgan, 1994; Yu, 2000) e a inibição do fenômeno “*windup*” (Morgan, 1994). Esta hipótese é suportada por dados de modelos experimentais de dor aguda e crônica, incluindo a dor aguda inflamatória, quando a melatonina foi administrada por via oral e intratecal (Cuzzocrea, 1997; Yu, 2000; Raghavedra, 2000). Nos estudos citados, a antinociceção dose-dependente foi observada em roedores. A melatonina produz efeito anti-inflamatório em locais periféricos por impedir a liberação de citocinas pró-inflamatórias (Cuzzocrea, 1997; 2001).

Além do seu efeito analgésico, a melatonina tem efeito na modulação afetiva e no ciclo sono/vigília (Foo & Mason 2003). Este efeito multifacetado da melatonina torna-a opção terapêutica atrativa em patologias que cursam com ruptura do sistema temporizador endógeno, associada com dor, inflamação e alterações do ritmo sono-vigília. Estes efeitos foram observados primeiramente em humanos nas condições de dor aguda (Caumo et al., 2007; 2009) e em modelos de dor experimental com animais (El-Shenawy et al., 2002).

Os possíveis mecanismos pelos quais a melatonina pode interferir no processo inflamatório e algogênico são: i) inibição da produção de óxido nítrico e redução da expressão da enzima óxido nítrico sintetase; ii) ativação do fator de transcrição NF- κ B; iii) redução da expressão da enzima óxido nítrico sintetase em nível transcricional; iv) redução dos níveis de prostaglandinas e da expressão da cicloxigenase-2; e v) redução do recrutamento de polimorfonucleares no sítio inflamado (Cuzzocrea, 2001). Também, o efeito analgésico é provavelmente secundário à ação em receptores específicos do tipo M1 e M2 (Caumo et al., 2007).

3 JUSTIFICATIVA

3 JUSTIFICATIVA

Embora a secreção da melatonina seja estimulada pelo sistema simpático, mediadores inflamatórios como a IL-1 e o TNF podem bloquear a ação deste sistema, conforme mostrado em estudos com camundongos e em alguns trabalhos com modelo de inflamação em humanos. Em camundongos em condições de inflamação crônica, a produção noturna da melatonina pela glândula pineal depende de uma ação conjunta da atividade simpática, que está aumentada no escuro, e dos níveis de corticosterona circulante, elevados pelo processo inflamatório. Portanto, é possível hipotetizar que a pineal tenha capacidade de responder a citocinas pró-inflamatórias circulantes. A inibição desta via de transcrição por corticosterona potencializa, enquanto que a ativação induzida por TNF inibe a produção da melatonina induzida por noradrenalina em glândulas pineais de ratos em cultura. Considerando-se que esta é uma via central para o desencadeamento e o controle do decurso temporal da resposta inflamatória, estas evidências, embora incipientes, suportam a teoria de que a glândula pineal não é apenas controlada pela alternância claro-escuro, mas que, em condições adversas, também pode sofrer o controle de sinalizadores da inflamação. A partir deste conjunto de dados, é premente que se avalie a relação entre marcadores inflamatórios, como o TNF e o cortisol, e a secreção da melatonina no curso perioperatório. Nosso intuito neste estudo é aproveitar a complexa logística desenvolvida e o conhecimento adquirido medindo a flutuação da melatonina frente ao estresse de pacientes submetidas a histerectomia abdominal para testar a hipótese de que a intensidade da supressão da produção de melatonina está relacionada à convalescença pós-operatória. Pois as evidências de um estudo como este, cujo propósito é de compreender a fisiopatogenia, poderá reforçar e servir de substrato neurobiológico à resposta alcançada

com a melatonina exógena perioperatória.

4 MARCO TEÓRICO

4 MARCO TEÓRICO

A síntese de melatonina pela glândula pineal em condições normais, é regulado pelos estímulos fóticos, que são conduzidos por meio de vias que conectam a retina aos núcleos paraventriculares, que sinalizam estruturas do sistema autonômico simpático, por meio da noradrenalina, a ativar receptores β_1 . Esta etapa envolve a acetilação da serotonina em N-acetil-serotonina, por meio da transcrição e/ou ativação da enzima AA-NAT, crucial à síntese da melatonina.

De acordo com as evidências de nossa base teórica, é possível hipotetizar que a intensidade da resposta inflamatória e dos níveis de hormônios de estresse, como o cortisol, pode intensificar ou inibir a síntese deste neuro-hormônio no período perioperatório. Esta hipótese é plausível, já que a ativação da enzima de transcrição AA-NAT constitui etapa crucial do processo. Adiciona-se a isto o fato de a melatonina dificultar a instalação da resposta inflamatória, etapa decisiva para a cicatrização da região injuriada. Este processo parece ter como mecanismo central à ação do TNF que inibe a transcrição da AA-NAT e as produções de N-acetil-serotonina e melatonina. Considerando-se que o planejamento desta pesquisa levou em conta o tipo de cirurgia, a causa da cirurgia, as condições clínicas das pacientes e o controle dos múltiplos fatores que pudessem interferir no processo de convalescença, este estudo constitui um modelo para investigar a fisiopatogenia do eixo imunopineal no cenário clínico perioperatório.

As etapas que integram as vias de síntese da melatonina e a modulação por mediadores inflamatórios e de estresse, construídas a partir da base teórica que sustenta este estudo, estão apresentadas na figura 4.

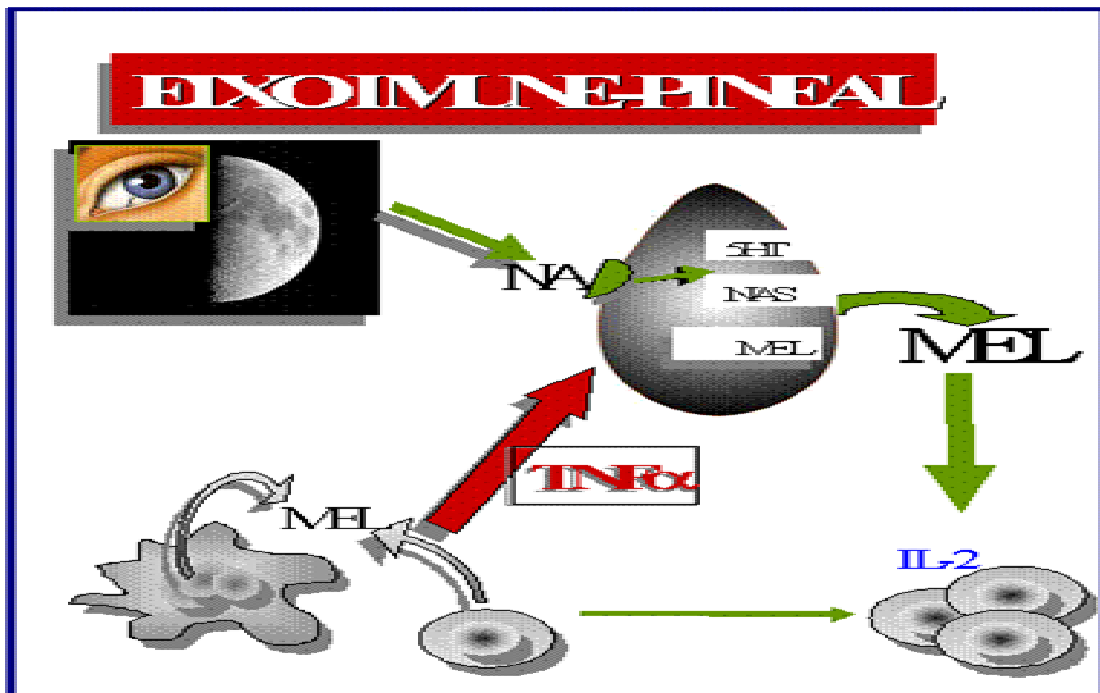


Figura 4 - Modelo conceitual das relações entre a síntese de melatonina e a modulação por mediadores inflamatórios, construído a partir da base teórica que sustenta este estudo.

5 OBJETIVOS

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivos Gerais

Avaliar a secreção da melatonina pela glândula pineal por meio das vias da inflamação e neuroendócrina perioperatória de pacientes submetidas à histerectomia abdominal.

5.2 Objetivos Específicos

Avaliar no curso perioperatório de pacientes submetidas à histerectomias abdominal, a síntese da melatonina noturna pela glândula pineal através dos seguintes fatores:

- TNF sérico;
- cortisol sérico;
- ansiedade-estado, ajustando pelos níveis de cortisol, ansiedade-traço e dor.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Baler R, Covington S, Klein DC. Rat arylalkylamine N-acetyltransferase gene: Upstream and intronic components of a bipartite promoter. *Biology of the Cell* 1999, 91(9):699-705.
- Bergiannaki J-D, Soldatos CR, Paparrigopoulos TJ, Syrengelas M, Stefanis CN. Low and high melatonin excretors among healthy individuals. *J. Pineal Res* 1995, 18 (3): 159-164.
- Bhakar AL, Tannis LL, Zeindler C, Russo MP, Jobin C, Park DS, MacPherson S, Barker PA. Constitutive nuclear factor-kappa B activity is required for central neuron survival. *J Neurosci* 2002, 22: 8466-8475.
- Carrillo-Vico A, Guerrero JM, Lardone PJ, Reiter RJ. A review of the multiple actions of melatonin on the immune system. *Endocrine* 2005, 27(2):189-200.
- Caumo W, Torres F, Moreira NL Jr, Auzani JA, Monteiro CA, Londero G, Ribeiro DF, Hidalgo MP. The clinical impact of preoperative melatonin on postoperative outcomes in patients undergoing abdominal hysterectomy. *Anesth Analg* 2007;105:1263-1271.
- Caumo W, Levandovski R, Hidalgo MP. Preoperative anxiolytic effect of melatonin and clonidine on postoperative pain and morphine consumption in patients undergoing abdominal hysterectomy: a double-blind, randomized, placebo-controlled study. *J Pain* 2009; 10:100-108.
- Coon SL, Mazuruk K, Bernard M, Roseboom PH, Klein DC, Rodriguez IR. The human serotonin N-acetyltransferase (EC 2.3.1.87) gene (AANAT): structure, chromosomal localization, and tissue expression. *Genomics* 1996, 15;34(1): 76-84.
- Cuzzocrea S, Zingarelli B, Gilad E, Hake P, Salzman AL, Szabó C: Protective effect of melatonin in carrageen-induced models of local inflammation: Relationship to its inhibitory effect on nitric oxide production and its peroxynitrite scavenging activity. *J Pineal Res* 1997;23:106-116.
- Cuzzocrea S, Reiter RJ. Pharmacological action of melatonin in shock, inflammation and ischemia/reperfusion injury. *Eur J Pharmacol* 2001,426(1-2):1-10.
- Dominguez-Rodriguez A, Abreu-Gonzalez P, Garcia MJ, Sanchez J, Marrero F, de Armas-Trujillo D. Decreased nocturnal melatonin levels during acute myocardial infarction. *J. Pineal Res* 2002, 33(4): 248-52.
- Dominguez-Rodriguez A, Abreu-Gonzalez P, Garcia M, Ferrer J, de la Rosa A, Vargas M, Reiter RJ. Light/dark patterns of interleukin-6 in relation to the pineal hormone

- melatonin in patients with acute myocardial infarction. *Cytokine* 2004, 26(2): 89-93.
- Dunne CF. Hormonal therapy for breast cancer. *Cancer Nurs* 1988,11(5): 288-94.
- El-Shenawy SM, Abdel-Salam OM, Baiuomy AR, El-Batran S, Arbid MS. Studies on the anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of melatonin in the rat. *Pharmacol Res* 2002, 46(3):235-43.
- 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.
- Ferreira ZS, Cipolla-Neto J, Markus RP. Presence of P2-purinoceptors in the rat pineal gland. *Br J Pharmacol* 1994, 112: 107–110.
- Ferreira ZS, Fernandes PA, Duma D, Assreuy J, Avellar MC, Markus RP. Corticosterone modulates noradrenaline-induced melatonin synthesis through inhibition of nuclear kappa B. *J Pineal Res* 2005, 38: 182–188.
- Filteau S. The influence of mastitis on antibody transfer to infants through breast milk. *Vaccine* 2003, 24: 3377–81.
- Foo H, Mason P. Brainstem modulation of pain during sleep and waking. *Sleep Med Rev* 2003, 7:145-154.
- Fridmacher V, Kaltschmidt B, Goudeau B, Ndiaye D, Rossi FM, Pfeiffer J, Kaltschmidt C, Israel A, Memet S. Forebrain-specific neuronal inhibition of nuclear factor-kappaB activity leads to loss of neuroprotection. *J Neurosci* 2003, 23:9403-9408.
- Gastel JA, Roseboom PH, Rinaldi PA, Weller JL, Klein DC. Melatonin production: proteasomal proteolysis in serotonin N-acetyltransferase regulation. *Science* 1998, 279(5355):1358-60.
- Gilliland HE, Armstrong MA, Carabine U, McMurray TJ. The choice of anesthetic maintenance technique influences the antiinflammatory cytokine response to abdominal surgery. *Anesth Analg* 1997, 85(6):1394-8.
- Hellhammer DH, Buchtal J, Gutberlet I, Kirschbaum C. Social hierarchy and adrenocortical stress reactivity in men. *Psychoneuroendocrinology*. 1997;22(8):643-50.
- Hutchinson MR, Coats BD, Lewis SS, et al. Proinflammatory cytokines oppose opioid-induced acute and chronic analgesia. *Brain Behav Immun* 2008, 22(8):1178-89.
- Jiang-Shieh YF, Wu CH, Chien HF, et al. Reactive changes of interstitial glia and pinealocytes in the rat pineal gland challenged with cell wall components from gram-positive and -negative bacteria. *J Pineal Res* 2005, 38(1):17-26.

- Jouvet A, Fevre-Montange M, Besancon R, et al. Structural and ultrastructural characteristics of human pineal gland, and pineal parenchymal tumors. *Acta Neuropathol* 1994, 88(4):334-48.
- Kaltschmidt B, Kaltschmidt C. Constitutive NF-kappa B activity is modulated via neuron-astroglia interaction. *Exp. Brain Res* 2000, 130:100-104.
- Karin M, Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu Rev Immunol* 2000, 18:621-663.
- Kovalenko A, Wallach D. If the prophet does not come to the mountain: dynamics of signaling complexes in NF-kappaB activation. *Mol Cell* 2006, 22(4):433-6.
- Kunz-Ebrecht SR, Mohamed-Ali V, Feldman PJ, Kirschbaum C, Steptoe A. Cortisol responses to mild psychological stress are inversely associated with proinflammatory cytokines. *Brain Behav Immun* 2003, 17(5):373-83.
- Lawrence H. Keloid (Alibert) and Intractable Patches of Chronic Inflammation of the Skin Treated by Scarification. *Br Med J* 1898, 2(1959):151.
- Licastro F, Candore G, Lio D, et al. Innate immunity and inflammation in ageing: a key for understanding age-related diseases. *Immun Ageing* 2005; 2:8.
- Lopes C, deLyra JL, Markus RP, Mariano M. Circadian rhythm in experimental granulomatous inflammation is modulated by melatonin. *J. Pineal Res* 1997, 23:72-8.
- Lopes C, Mariano M, Markus RP. Interaction between the adrenal and the pineal gland in chronic experimental inflammation induced by BCG in mice. *Inflam Res* 2001, 50:6-11.
- 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, 430:351-7.
- Markus RP, Afeche SC, Barbosa Jr EM, Lotufo CMC, Ferreira ZS, Cipolla-Neto J. **Glândula Pineal e Melatonina** in Marques N, Menna-Barreto L. *Cronobiologia: Princípios e Aplicações*. São Paulo, 2003: 191-222.
- Markus RP, Santos JM, Zago W, Reno LA. Melatonin nocturnal surge modulates nicotinic receptors and nicotine-induced [3H]glutamate release in rat cerebellum slices. *J Pharmacol Exp Ther* 2003, 305:525-30.
- 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.

- Massa A, Casagrande S, Bajetto A, et al. SDF-1 controls pituitary cell proliferation through the activation of ERK1/2 and the Ca²⁺-dependent, cytosolic tyrosine kinase Pyk2. *Ann N Y Acad Sci* 2006,1090:385-98.
- Mattson MP, Camandola S. NF-kappaB in neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. *J Clin Invest* 2001, 107(3):247-54
- Morgan PJ, Barret P, Howell E, Helliwell R. Melatonin receptors: localization, molecular pharmacology and physiological significance. *Neurochem Int* 1994;24:101–146.
- Mortani Barbosa EJ, Ferreira ZS, Markus RP. Purinergic and noradrenergic cotransmission in the rat pineal gland. *Eur J Pharmacol* 2000, 401(1):59-62.
- Nadeau S, Rivest S. Endotoxemia Prevents the Cerebral Inflammatory Wave Induced by Intraparenchymal Lipopolysaccharide Injection: Role of Glucocorticoids and CD141. *J Immunol* 2002, 169:3370-81.
- Nadeau S, Rivest S. Glucocorticoids play a fundamental role in protecting the brain during innate immune response. *J Neurosci* 2003, 23:5536-44.
- Nelson RJ, Drazen DL. Melatonin mediates seasonal changes in immune function. *Ann N Y Acad Sci* 2000, 917:404-15.
- Neylan TC. Hans Selye and the field of stress research. *J Neuropsychiatry* 1998, 10(2):230-231.
- Ockenfels MC, Porter L, Smyth J, Kirschbaum C, Hellhammer DH, Stone AA. Effect of chronic stress associated with unemployment on salivary cortisol: overall cortisol levels, diurnal rhythm, and acute stress reactivity. *Psychosom Med* 1995,57(5):460-7.
- O'Neill LA, Kaltschmidt C. NF-kappa B: a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function. *Trends Neurosci* 1997, 20(6):252-8.
- Ottaviani E, Franchini A, Caselgrandi E, Cossarizza A, Franceschi C. Relationship between corticotropin-releasing factor and interleukin-2: evolutionary evidence. *FEBS Letters* 1994, 351:19-21.
- Paulson PE, Casey KL, Morrow TJ. Long-term changes in behavior and regional cerebral blood flow associated with painful peripheral mononeuropathy in the rat. *Pain* 2002, 95:31-40.
- Pontes GN, Cardoso EC, Carneiro-Sampaio MMS, 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.

- Raghavedra V, Agrewala JN, Kulkarni SK: Melatonin reversal of lipopolysaccharides-induce thermal and behavioral hyperalgesia in mice. *Eur Pharmacol* 2000;395:15-21.
- Reiter RJ, Tan DX, Gitto E, et al. Pharmacological utility of melatonin in reducing oxidative cellular and molecular damage. *Pol J Pharmacol* 2004,56(2):159-70.
- Roseboom PH, Coon SL, Baler R, Mccune SK, Weller JL, Klein DC. Melatonin synthesis: analysis of the more than 150-fold nocturnal increase in serotonin N-acetyltransferase messenger ribonucleic acid in the rat pineal gland. *Endocrinol* 1996, 137:3033-45.
- Ross MH, Reith EJ, Romrell LJ. *Histologia: texto e atlas*. São Paulo: Panamericana, 1993, 779p.
- Sawchenko PE, Brown ER, Chan RK, Ericsson A, Li HY, Roland BL, Kovacs KJ. The paraventricular nucleus of the hypothalamus and the functional neuroanatomy of visceromotor responses to stress. *Progress in Brain Research* 1996, 107:201-222.
- 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.
- Srinivasan V, Pandi-Perumal SR, Spence DW, Moscovitch A, Trakht I, Brown GM, Cardinali DP. Potential use of melatonergic drugs in analgesia: mechanisms of action. *Brain Res Bull*. 2010;;81(4-5):362-71.
- Sugden D. Melatonin: binding site characteristics and biochemical and cellular responses. *Neurochem Int* 1994, 24(2):147-57.
- Tsai SY, O'Brien TE, McNulty JA. Microglia play a role in mediating the effects of cytokines on the structure and function of the rat pineal gland. *Cell Tissue Res* 2001, 303(3):423-31.
- Watkins LR, Maier SF, Goehler LE. Immune activation: the role of pro-inflammatory cytokines in inflammation, illness responses and pathological pain states. *Pain* 1995,63(3):289-302.
- Wiertelak EP, Furness LE, Horan R, Martinez J, Maier SF, Watkins LR. Subcutaneous formalin produces centrifugal hyperalgesia at a non-injected site via the NMDA-nitric oxide cascade. *Brain Res* 1994, 649(1-2):19-26.
- Wolf G, Livshits D, Beilin B, Yirmiya R, Shavit Y. Interleukin-1 signaling is required for induction and maintenance of postoperative incisional pain: genetic and pharmacological studies in mice. *Brain Behav Immun* 2008, 22(7):1072-7.

Yoshimura T, Nagabukuro A, Matsuda Y, Suzuki T, Kuroiwa A, Iigo M, Namikawa T, Ebihara S. Chromosomal mapping of the gene encoding serotonin N-acetyltransferase to rat chromosome 10q32.3 and mouse chromosome 11E2. *Cytogenet. Cell Genet.* 1997, 79(3-4):172-5.

Yu CX, Zhu B, Xu SF, Cao XD, Wu GC: The analgesic effects of peripheral and central administration of melatonin in rats. *Eur J Pharmacol* 2000;403:49-53.

Ziegler EC, Ghosh S. Regulating inducible transcription through controlled localization. *Sci STKE* 2005, 17(284).

7 ARTIGO EM INGLÊS

Pineal melatonin surge, surgical stress and postoperative pain in patients undergoing abdominal hysterectomy

Pineal melatonin surge, surgical stress and postoperative pain in patients undergoing abdominal hysterectomy

Mirella de Oliveira Tatsch-Dias^{1,5}, Rosa Maria Levandovski¹, Marcelo Gregianin Rocha⁴,

Pedro Augusto Carlos Magno Fernandes², Iraci da Silva Lucena Torres^{1,4,5}, Maria Paz

Loayza Hidalgo¹, Regina Pekelmann Markus², Wolnei Caumo^{1,3,4,5}

Post-Graduate Program in Medical Sciences, School of Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)¹, Laboratory of Chronopharmacology, Department of Physiology, Institute of Bioscience, University of São Paulo²; Anesthetist, Pain and Palliative Care Service at Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)³; Laboratory of Pain & Neuromodulation at HCPA/UFRGS⁴ and Associate Professor, Pharmacology Department, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS, Brazil⁵

From the Post-Graduate Program in Medical Sciences, School of Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) Porto Alegre, Brazil

Running title: Pineal melatonin surge and surgical stress

Corresponding authors

Wolnei Caumo MD, PhD

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Laboratory of Pain & Neuromodulation.

Rua Ramiro Barcelos, 2350 - CEP 90035-003

Bairro Rio Branco - Porto Alegre - RS – Phone (51) 3359.8083

E-mail: caumo@cpovo.net

Regina P Markus, PhD, Prof.

Laboratory of Chronopharmacology

Institute of Bioscience

University of São Paulo

Rua do Matão – travessa 14

05508-900 São Paulo, Brasil

E-mail: rmarkus@usp.br

Key words: melatonin, pain, anxiety, TNF, cortisol, surgery.

Abstract

Surgical neuro-endocrine metabolic response is associated with distress, fatigue, anxiety, and acute postoperative pain. The immune-pineal axis hypothesis suggests that circulating TNF and cortisol found during an innate-immune response modulates nocturnal melatonin surge. Here we tested whether changes in TNF and cortisol induced by a surgical intervention follow this premise. In addition we evaluated whether the level of melatonin could influence pain and anxiety. We evaluated 12 women who underwent an abdominal hysterectomy. Blood was collected, at 10h00 and 22h00, one week and one day before surgery; at the first and second days after surgery and at 22h00 on the day of surgery. On the night of surgery there was no melatonin surge. High levels of TNF or cortisol were accompanied by lower nocturnal melatonin output, which was linked to an increase in postoperative pain reported on VAS (visual analogue scale) and a higher trait and state of anxiety, evaluated by State-Trait Anxiety Inventory. In conclusion, this work confirms that mediators of inflammation, such as TNF and cortisol, modulate nocturnal melatonin surge. This could be an important marker for surgical behavior because of its relationship with both anxiety and the reduction of postoperative pain.

Introduction

Neuro-endocrine metabolic response in the perioperative period is associated with distress, fatigue, anxiety, and acute postoperative pain [1, 2]. Aspects of pre-surgical psychological functioning may also contribute to post-surgical pain. Although pre-surgical anxiety [3-7] and pre-surgical depression [4, 5] are predictors of post-surgical pain, few reasearches have investigated the interaction between the neuroendocrine-immune system, preoperative stress, and post-surgical recovery. A relevant aspect in this equation is the involvement of the neuroendocrine-immune interaction in the relationship between preoperative stress and post-surgical pain [8, 9], or wound healing [10]. For example, pain is associated with the deregulation of immune and endocrine factors critical to the woundhealing cascade [11]. The balance between the syntheses of pro and anti-inflammatory mediators will result in the defensive action against pathogens, limiting tissue damage and enhancing fast recovery and tissue healing [12].

Both acute and chronic stressors can deregulate the hypothalamic pituitary adrenal (HPA) axis and its end product, cortisol [13, 14]. Post-surgical pain was associated with increased in-vitro production of pro-inflammatory cytokines [15]. Also, among the relevant hormone mediators of inflammation is melatonin, either provinient from the pineal gland or synthesized at the site of injury [16]. When an organism is injured, independent of the hour of the day, a prompt and efficient response is required. The activation of the immune-pineal axis decreases nocturnal melatonin surge allowing a full migration of leukocytes, even at night [16]. Molecules that trigger the nuclear factor kappa B (NFKB) pathway, a hallmark transcription factor in the innate-immune response, blocks pineal melatonin synthesis. As a matter of fact, an inverse correlation between the tumor necrosis factor (TNF) concentration and nocturnal melatonin surge was observed in women who delivered by

caesarean surgery or that have mastitis [17, 18]. In addition, TNF blocks the transcription of the key enzyme for melatonin synthesis (aryl-alkyl-N-acetyltransferase, AA-NAT) and the synthesis of melatonin in cultured rat pineal glands [19]. The effect of glucocorticoids on this balance is dualistic. A low increase in corticosterone increases nocturnal melatonin output due to the inhibition of the NF κ B pathway [20-23], while very high concentrations lead to the inhibition of pineal production [24].

The present study followed the daytime and nighttime levels of melatonin, TNF and cortisol, in women that had undergone a hysterectomy from the pre-surgical to postsurgical periods. In addition questionnaires for evaluating stress and pain levels showed a correlation between personal information and biochemical profiles.

The main result was to reinforce the existence of an immune-pineal axis, since there was no increase in melatonin on the night of the surgery. In addition, the data suggests that melatonin output is modulated by TNF and cortisol levels and can be a predictor for pain.

METHODS

Study Population

After approval by the ethics committee and written informed consent was given, 12 patients, ASA classification I to II, ages 18 to 55, scheduled to undergo total abdominal hysterectomy for myomatosis, were enrolled into a cohort study. Patients with contraindications to regional anesthesia, mental impairment, chronic pain, history of congestive heart failure, valvular heart disease, renal or hepatic disease, use of psychotropic drugs, alfa- and beta blockers, and or with language difficulties were excluded. Patients with a body mass index (BMI) higher than 27 kg/m², a history of psychiatric disorder, and/or patients with positive screening (scores > 8) for minor psychiatric disorders (somatic

symptoms, depressive moods, depressive thoughts, and decreased energy) on the World Health Organization's (WHO) Self-Reporting Questionnaire (SRQ-20) were also excluded [25].

Procedures

The sequence of assessments is presented in **figure 1**. The first evaluation was one week before the hospitalization in the Ambulatory of Preoperative Assessment. All patients entered the hospital in the afternoon on the day before surgery and the same anesthetist, who provided information in the peri-operative course, saw them again. Blood was taken to ascertain melatonin, TNF, and cortisol levels at the periods shown in **figure 1**.

Insert figure 1

Pre-anesthetic medications and anesthesia technique

The patients received 15 mg of midazolam orally on the night before surgery (22:00 h) and one hour pre-operatively. On arrival in the anesthesia room, all patients underwent standard monitoring. Before the spinal anesthesia, physiologic solutions 0.9% 10 mL/kg, cefazolin (2 g) plus fentanyl (100 µg) were administered intravenously. The combined spinal epidural anesthesia (CSE) was performed with the patient placed in a sitting position. A 27-gauge pencil-point spinal needle was introduced in the L3-L4 or L4-L5 space for intrathecal administration of morphine 100 µg (prepared with a 1-mL tuberculin syringe), mixed with 3 mL of 0.5% hyperbaric bupivacaine (15 mg) in a total volume of 3.1 mL. Cerebrospinal fluid (CSF) assessment was confirmed with aspiration before and after injection. Only those patients with CSF return both before and after the subarachnoid injection were included in the study. After removal of the spinal needle, the epidural space

was cannulated at L2-L3 or L3-L4 using the loss of resistance technique, and a 16-gauge catheter was inserted. The epidural catheter was secured with tape, and it was confirmed that there was no blood or CSF return from the aspiration of the catheter. The epidural catheter remained untested until the patient requested additional analgesia. Ropivacaine at 5-mL doses (10 mg.mL⁻¹), was given epidurally if there were signs of inadequate analgesia. Continuous propofol (0.08 to 0.1 mg/kg/min⁻¹), to maintain conscious sedation during the surgery as well as supplementary oxygen by an intranasal catheter were administered. A vesicourethral catheter was routinely maintained until the first postoperative day. At the end of surgery, sedation was stopped, and the extradural catheter was removed. Intraoperative variables, including ropivacaine and ephedrine doses, length of surgery, blood loss, and anesthetic and surgical complications were noted.

Postoperative Analgesia

After being transferred to the postanesthesia care unit, the patients received tenoxicam 20 mg intravenously and they were permitted to receive morphine 3 mg intravenously every 30 min if their pain was unrelieved (score on VAS higher than 30 mm). If pain was not relieved, dipyrone 1000 mg was given every 6 hours. Twenty four hours after the surgery the analgesia in all patients was maintained with codeine 30 mg plus acetaminophen 500 mg every 6 hours and sodium diclofenac 75 mg three times per day. If required, metoclopramide 10 mg was administered for nausea. If this was ineffective, ondansetron 4 mg was given. For analytical purposes, the number of anti-inflammatory and analgesics, as well as the anti-emetic doses used in the first 48 hours after surgery were considered, including all the analgesic doses and the doses of both antiemetics (metoclopramide and ondansetron).

A checklist was used to monitor respiratory, urinary, cardiovascular, and neurological complications. It also covered points related to the surgery, anesthesia, surgical wound, electrolytic disturbance, and bleeding.

Blood sampling

Blood samples were collected from all patients to check serum melatonin levels, TNF- α and cortisol according to the times presented in **figure 1**. Blood samples were centrifuged in plastic tubes for 10 min at $4500 \times g$ at 4°C , and serum was stored at -80°C for hormone assays. On the day of the assays the samples of serum were thawed and diluted according to the kit instruction. Each sample was thawed only once.

Melatonin, TNF and cortisol determination

Serum melatonin, TNF and cortisol were determined by ELISA using commercial kits that follow the basic principles of competitive immunoassays. Serum melatonin was determined using a MP Biomedicals, Inc (Irvine, California, USA) kit, serum TNF was measured with a PharMingen (San Diego, CA, USA) kit and cortisol with a kit purchased from DRG Instruments GmbH (Wiesbaden, Germany). The lower detection limits of the kits are 3 pg/mL for melatonin, 1 pg/mL for TNF, and 2.5 pg/mL for cortisol.

Assessment and instruments

The data were collected in the following multiple standardized phases: (1) during the period of preoperative evaluation, a structured questionnaire was used to collect information

concerning demographic characteristics, clinical state, and anxiety level; (2) the surgical procedures were assessed using the anesthesiologist's records; (3) all patients were followed-up two days after surgery to obtain blood samples and data related to anxiety and pain. Data regarding drug records, medical and diagnostic examinations were all collected from the patient's records. Two independent, trained data collectors followed a standard method by which they reviewed all clinical and laboratory information available in the hospital. The gynecologist in charge of discharge was blinded to the aim of the study and all other measures.

Patient characteristics were collected using a structured questionnaire, and each patient underwent psychological testing. The two evaluators received one month (30 hours) of training with role-playing activities and discussion, focusing on difficulties that might occur during the interviews. They presented the tests in a random order to prevent order effects and were assisted in 15% of the interviews by the principal investigator. All of the psychological tests used in the present study were validated and adapted for the Brazilian population.

Assessment of pain and psychological state

a) The state anxiety (transitory anxiety that varies according to the situation) and trait anxiety (a lifelong pattern of anxiety, a personality feature) were assessed by the State-Trait Anxiety Inventory (STAI) using a reduced and revised version of STAI-Form X [26], validated and adapted to Brazilian Portuguese [27-29]. The inventory contains two separate lists of self reporting rating scales for measuring trait (12 questions) and state anxiety (13 questions). In responding to the S-STAI-Form X, subjects chose the number that best describes the intensity of their feelings: (1) not at all, (2) somewhat, (3) moderately, (4) and

very much so. The total score of this scale ranges from 13 to 52. Higher scores denote higher levels of state anxiety. In responding to the T-Anxiety Scale, subjects rate the frequency of their feelings on the following four-point scale: (1) almost never, (2)[sometimes/often], and (3) almost always. Each STAI item is given a weighted score of 1 to 3. The total score of this scale ranges from 12 to 36. Higher scores denote higher levels of anxiety.

b) The intensity of pain was measured by a 100-mm VAS. VAS scores ranged from no pain (zero) to worst possible pain (100 mm).

Statistical Analysis

Participant characteristics and baseline measurements of all outcomes were presented as mean \pm standard deviation (SD), mean \pm standard error of mean (SEM) or frequencies. We utilized GEE (Generalized Equation Model) with robust standard errors (SPSS 18.0) to account for the repeated-measures analysis of the nocturnal serum melatonin (dependent variable). The daily nocturnal melatonin mean was analyzed by regression with repeated measures using GEE to take the multiplicity of inter-correlated values in each subject incorporating an exchangeable working correlation structure model. To analyze the relationship between the melatonin surge on time and its relationship with each one of the following factors, firstly, they were classified according to cutoff points using quartiles: TNF (high $> Q_{75}=5.2$ or low $Q_{75} < 5.2$ ng/mL), cortisol (high $> Q_{50}=22.4$ or low $Q_{50} < 22.4$ ng/mL), and state-anxiety (high $> Q_{50}=24$ or low $Q_{50} < 24$ points]. Secondly, GEE models were conducted separately to assess the relationship of each of these factors with the nocturnal melatonin secretion changes in the study epoch (one week before surgery, day admission at hospital to second day after surgery, a total of 5 days).

Nocturnal melatonin was in all GEE models of the dependent variable. In the model where the relationship between the state-anxiety was assessed, the pain assessed on VAS, trait anxiety, and diurnal cortisol were included as covariates. We used the GEE so as to avoid the potential breakdown in any assumption of non-independence. This easily occurs when one assesses the effect of serial correlations, where it is common to calculate several measures over time in the same or in different respondents [30]. Appropriate post-hoc means contrasts were made for pair-wise comparisons between the groups of patients in each category of the factors (TNF, cortisol, and state-anxiety). Bonferroni's test for post-hoc multiple comparisons was used to identify differences between groups at each time point. Results from the GEE analysis were expressed as a coefficient, 95% confidence interval (CI), and associated the *P* value [31].

RESULTS

12 patients who had undergone abdominal surgery were assessed. Clinical characteristics, intercurrents, duration of surgery, analgesics doses, antiemetic treatment, bleeding and hospital stay duration are shown in **Table 1**.

→ **Insert table 1**

Melatonin, TNF and cortisol profiles

Daytime and nighttime melatonin content in the serum of women submitted to surgery was determined before, on the day of the surgery, and during the recovery time in the hospital. The high content of melatonin at nighttime when compared to daytime was

observed for all days, except for the day of the surgery (**Figure 2**). On the day of surgery, blood was collected at nighttime under dimlight conditions, and daytime blood was not collected because at 10 a.m. the patients were under the surgical procedure. The nocturnal melatonin on the night of the surgery compared with cumulative mean \pm SEM of all postoperative nights was 7.70 ± 2.29 vs. 38.16 ± 3.48 , respectively, being that changes in the nocturnal melatonin surged over time. (GEE model, $\chi^2=546.67$; $P=0.001$). Therefore, melatonin nocturnal surge is suppressed on the night of the surgery.

→ **Insert Figure 2**

No variation in the TNF profile was observed from one week until two days after surgery (**Figure 3**). However, it is important to emphasize the elevated variation of TNF between the patients; mean and standard deviation was 8.14 ± 10.61 ng/mL.

→ **Insert Figure 3**

The daytime cortisol concentration was higher than the nighttime, except for the night of the surgery (**Figure 4**). On the day of surgery there was a significant increase in cortisol levels, which returned to lower levels in the subsequent days.

→ **Insert Figure 4**

Relationship between melatonin and TNF

Changes in the nocturnal melatonin surge according with the level of TNF (high $> Q_{75}=5.2$ or low < 5.2 pg/mL) is shown in **Figure 5**. The means of nocturnal melatonin from

one week before surgery to second day after surgery was 57.35 ± 40.85 vs. 24.17 ± 11.79 , in patients with low and high serum TNF, respectively. The GEE analysis revealed a significant decline in the nocturnal melatonin surge when the TNF content was high ($\chi^2=4.15$; $df=1$; $P=0.04$). This analysis demonstrated an influence of TNF on nocturnal melatonin surge over time ($\chi^2=27.08$; $df=4$; $P=0.001$) and an interaction between nocturnal melatonin surge and time ($\chi^2=887.80$; $df=3$; $P=0.001$). Therefore, patients with high TNF values have a tendency to reduce their nocturnal melatonin value with time.

→ **Insert figure 5**

According to high ($>Q_{50}=22.40$ ng/mL) or low ($<Q_{50}=22.40$ ng/mL) morning cortisol the changes in nocturnal melatonin surge is shown in **Figure 6**. The means of nocturnal melatonin from one week before surgery to the second day after surgery was 33.29 ± 6.69 vs. 14.41 ± 2.19 , in patients with low and high serum cortisol, respectively. The GEE analysis revealed that this decline of nocturnal melatonin surge when the level of cortisol was classified as high was statistically significant ($\chi^2=4.15$; $df=1$; $P=0.03$). This analysis demonstrated that there is an influence of cortisol on nocturnal melatonin surge over time ($\chi^2=40.1$; $df=4$; $P=0.001$) and an interaction between nocturnal melatonin surge and time ($\chi^2=15.39$; $df=3$; $P=0.001$).

→ **Insert figure 6**

Relationship between cortisol, anxiety, pain, and melatonin secretion

The results of the GEE model analysis, showing associations between state-anxiety levels are presented in **Table 2**. The reference values for the comparisons of covariates were the higher scores. Thus, a negative β coefficient value obtained in the GEE model

indicates that the increase in the covariate values is associated with the reduction in nocturnal melatonin serum. A positive regression coefficient in the GEE model indicates that the increment in the covariate values is associated with higher levels of melatonin serum.

In accordance with the high state-anxiety score ($>Q_{50}=24$) or low ($<Q_{50}=24$) the means of nocturnal melatonin from one week before surgery to the second day after surgery was 43.66 ± 8.55 vs. 31 ± 6.46 , respectively. The GEE analysis revealed that this decline of nocturnal melatonin surge was statistically significant ($\chi^2=4.75$; $df=1$; $P=0.03$). The adjusted GEE model (**Table 2**) show that high state-anxiety corresponds with an odds ratio of 7.2 to decrease nocturnal melatonin secretion. The increment of one ng/mL in the serum cortisol was associated with a reduction of 3% in serum melatonin; or vice-versa. As the pain reported on VAS and trait-anxiety scores was included in the model as continuous variables, the negative β coefficient value indicates that the increase in the scores of these scales was associated with reduction in nocturnal melatonin secretion.

→ **Insert table 2**

Discussion

The present study was undertaken in order to test the relevance of the immunepineal axis when challenged by a surgical procedure. Here we show that the nocturnal rise of melatonin is suppressed on the night of the surgery, reinforcing the hypothesis that a proper mounting of the innate immune response is accompanied by the impairment of pineal activity. In addition, we once more observed an inverse correlation between TNF and melatonin, reinforcing the idea of an immune-pineal axis (**figure 6**). Inasmuch, the decrease

of melatonin secretion was associated with the higher postoperative pain reported on VAS, as well as higher trait-state anxiety and higher serum cortisol.

The decline in the nocturnal melatonin surge in perioperative period is possibly explained by integrated action among the nervous system that cooperates dynamically with the immune system detecting an injury event in at least three ways: (1) Through bloodborne immune messengers originating at the wound; (2) through nociceptores-induced sympathetic activation and subsequent stimulation of immune tissues, and (3) through sympathetic-adrenal medullar system and HPA endocrine signaling. The immune messaging begins with the acute phase reaction at the wound [32], in which local macrophages, neutrophils, and granulocytes produce and release into intracellular space and circulation the proinflammatory cytokines IL-1, IL-6, IL-8, and TNF.

The concept of the immune-pineal axis was based on experiments realized with cell and organ culture, as well as whole animals and humans [16, 33]. The nocturnal rise of melatonin is dependent on the transcription and/or the inhibition of the degradation of the enzyme AA-NAT synthesis of melatonin by the pineal gland driven by darkness.

Activation of beta-adrenoceptors by noradrenaline triggers the cyclic-AMP – protein kinase A pathway. The phosphorylation of the cyclic-AMP regulating element (CRE) transcription factor induces the transcription of the AA-NAT gene, while the phosphorylation of the enzyme impairs its degradation by the proteasome [34]. In diurnal animals, such as humans, the Aa-nat gene is transcribed independent of CREB-P signaling, but the protein formed is immediately degraded by the proteasome. However, TNF, which triggers NF κ B through TNFR1 located in pinealocytes, seems to impair melatonin synthesis in humans. An inverse relationship between TNF and melatonin was already observed in women with mastitis [17] or that delivered by caesarean section [18], and here

we show that after another surgical procedure high levels of TNF are correlated with low levels of melatonin. The reduction in nocturnal melatonin surge is necessary for allowing a proper migration of leukocytes to the site of lesion, as melatonin, at concentrations compatible to nocturnal surge, impairing leukocytes rolling and adhesion [35, 36].

It is interesting to note that in the samples the mean TNF did not vary between the pre and postoperative periods, since there was great variance. Even so, the segregation of the sample in high and low TNF disclosed the inverse correlation between TNF and melatonin. **In addition to** its action on peripheral receptors, it inhibits apoptosis of neutrophils, which is essential for maintaining immune homeostasis and limiting host tissue damage by promoting resolution of the inflammatory response [37]. These effects of melatonin may prevent or decrease the consequences of perioperative stress, in fact, even changing the onset of the entire perioperative neuroendocrinologic stress response. This in turn could result in an overall decrease in the global hormonal stress response.

Regarding cortisol, a clear increase in the corticaladrenal hormone was observed on the night of surgery. In addition, low cortisol was associated with higher nocturnal levels of melatonin. We have shown that the perfusion of rat pineal glands “*in vivo*” with concentrations of corticosterone found in mild stressed rats [23] increases the nocturnal output of melatonin [22]. This increase was due to the inhibition of the NF κ B pathway, which amplifies noradrenaline-induced melatonin synthesis [20, 38]. On the other hand, higher levels of corticosterone in rats either did not change [20] or increase [39] the production of melatonin in cultured rat pineal glands. In the present study, the increase in cortisol lead to a reduction in melatonin output (**Figure 6**). Therefore, both TNF and cortisol corroborated to reduce nocturnal melatonin output.

Our findings revealed that patients with high cortisol have lower levels of melatonin,

and low melatonin is associated with high scores in the stress questionnaire. This demonstrates the consistency of our findings because of the psychological aspect of trait-state anxiety which gauges the adaptive capability of an individual challenged by a stressor in consonance with a hormonal stress maker. Also, our findings are consistent with the State-Trait Anxiety theory, which predicts that individuals with high trait-anxiety are generally hypersensitive to stimuli and psychologically more reactive [5]. Considering as well, that as far as the trait-state anxiety as higher postoperative pain have been associated with unfavorable perioperative outcomes [5], such as increased risk for infections observed for several types of procedures, including hysterectomy [40]. Overall these evidences reinforce the use of melatonin in pre-operative settings to improve the perioperative outcomes.

By analogy, the trait-state distinction applies to neural, endocrine, and immune subsystems. Since the stress is the resource-intensive process of mounting allostatic responses to challenges that occur in the external or internal environment, in the perioperative period a stress response is elicited by triggers a neuroendocrine reaction involving three aspects: *i)* Sympathomedullary release of norepinephrine, epinephrine, and NPY as hormones [41]; *ii)* CRH activation of the HPA axis including the production of glucocorticoids [42, 43]; and *iii)* activation of locus ceruleus and noradrenergic limbic brain [44] sympathetic components of the central autonomic network. From the pain perspective, the stress response has several key properties [45]. *First*, noxious signaling is among its triggers. *Second*, the overall reaction to the stressor includes both anticipatory and reactive responses. *Third*, these responses occur in multiple, hierarchically organized, or nested, neurocircuits. When a stressor occurs, the hypothalamic PVN receives and integrates neural input from diverse sources which include sensory input, the limbic brain, and the

frontal cortex. Serotonin (5-HT), aceticoline, and norepinephrine are among the most important neurotransmitters involved in neurogenic stimulation of CRH production [42, 46]. Periventricular norepinephrine is the most salient neurotransmitter in HPA axis activation when the stressor is noxious [47]. This corroborated with the hypothesis that lower nocturnal melatonin surge was associated with higher postoperative pain, an effect that is linked with these multiple neuro-immune-endocrine processes that exerts an extensive neural and non-neural physiological impact affecting overall health, functional capability, and sense of well-being. Although complex patterns of brain activation are a part of the process from which pain emerges, the preoperative stress encompasses interdependent neural, endocrine and immune activation, that may explain the hyperalgesic status observed in chronically stressed patients [48].

To determine whether a causal relationship exists between the reduction of nocturnal melatonin output in the perioperative period and the level of pain in the postoperative period we correlated the level of pain assessed by VAS with nocturnal melatonin surge (**Table 2**). Our finding demonstrated that the intensity of postoperative pain is related with higher suppression of melatonin surge (**table 2**). This is a rational physiopathological basis to explain previous experimental and clinical findings about the antinociceptive properties of melatonin in posttraumatic [49] or perioperative periods [50-53]. This also provides additional evidence for the biological plausibility of the impact of the anxiolytic effect of the melatonin on postoperative pain in patients with higher anxiety levels [53]. Thus, these evidences permit us to aggregate the physiopathological mechanisms that link the effect of the use of melatonin to reduce perioperative anxiety and pain in the surgical course [51]. This body of evidence supports the hypothesis that the effects of melatonin are mediated by direct action on the central nervous system. The

anxiolytic and analgesic effects are mediated by plasma membrane-bound melatonin receptors and modulated by opiate receptors [54, 55]. In addition, serotonergic 5-HT_{2A} receptors, dopaminergic D₂-receptors, adrenergic alpha₂-adrenoceptors and L-argininergic nitric oxide pathway were also shown to play a role in melatonin-mediated antinociception [55]. These effects of melatonin were consistently demonstrated in several clinical and experimental studies [52, 53, 55] and here we reinforce the idea, showing that endogenous melatonin also induces antinociception. Together with the information that nocturnal melatonin surge is suppressed in the perioperative period and that the patient with lower melatonin level has more pain, the use of melatonin as a coadjuvant in the treatment of surgical pain is reinforced.

Some methodological aspects of the present study should be highlighted. Firstly, this study aimed to explore the relationship between pineal melatonin, surgical stress, and postoperative pain with a focus in pathogenic mechanisms in a selective sample, thus the clinical extrapolation must proceed with caution. Secondly, hysterectomy may be associated with a specific psychological and behavioral state that is not common in other surgical populations; thus, the conclusion of this study may be limited in its generalization to this surgical population alone.

In conclusion, the results support the hypothesis that the pineal gland plays a role in the progressive reaction to surgical stress. In the proinflammatory phase, TNF shutdown melatonin production and allows for the mounting of the defense response. Also, it is observed that the cortisol is a determinant in the regulation of nocturnal melatonin surge, together with the release of high amounts of TNF in the circulation, at the start of a defense response, suppressing the melatonin surge. Taking into account these evidences, it is

possible to suppose that this orchestrated reaction between TNF, cortisol, and the pineal gland should be essential in allowing for a full and efficient postoperative recovery.

Acknowledgements

This research was supported by the Postgraduate Research Group at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil, the Postgraduate Program in Medical Sciences at the School of Medicine of the Federal University of Rio Grande do Sul; Foundation for Support of Science of São Paulo State (FAPESP, 2007/07871/6) and Foundation of Support of Research at Rio Grande do Sul (FAPERGS). The authors declare that there are no financial or other relationships that might lead to a conflict of interest.

REFERENCES

1. KENEFICK A L. Patterns of symptom distress in older women after surgical treatment for breast cancer. *Oncol Nurs Forum* 2006; 33: 327-335.
2. YERMAL S J, WITEK-JANUSEK L, PETERSON J, et al. Perioperative pain, psychological distress, and immune function in men undergoing prostatectomy for cancer of the prostate. *Biol Res Nurs* 2010; 11:351-362.
3. KATZ N. Methodological issues in clinical trials of opioids for chronic pain. *Neurology*. 2005; 65: S32-S49.
4. OZALP G, SARIOGLU R, TUNCEL G, et al. Preoperative emotional states in patients with breast cancer and postoperative pain. *Acta Anaesthesiol Scand* 2003; 47: 26-29.
5. CAUMO W, SCHMIDT A P, SCHNEIDER C N, et al. Preoperative predictors of moderate to intense acute postoperative pain in patients undergoing abdominal surgery. *Acta Anaesthesiol Scand* 2002; 46: 1265–1271.
6. GERBERSHAGEN HJ, DAGTEKIN O, ROTHE T, et al. Risk factors for acute and chronic postoperative pain in patients with benign and malignant renal disease after nephrectomy. *Eur J Pain* 2009; 13:853-860.
7. KAIN ZN, SEVARINO FB, RINDER C, et al. Preoperative anxiolysis and postoperative recovery in women undergoing abdominal hysterectomy. *Anesthesiology* 2001; 94: 415-22.
8. KIECOLT-GLASER JK, PAGE GG, MARUCHA PT, et al. Psychological influences on surgical recovery. Perspectives from psychoneuroimmunology. *Am Psychol* 1998; 53: 1209-1218.
9. PAGE GG. Surgery-induced immunosuppression and postoperative pain management. *AACN Clin Issues* 2005; 16:302-9.

10. MCGUIRE L, HEFFNER K, GLASER R et al. Pain and wound healing in surgical patients. *Ann Behav Med* 2006; 31:165-72.
11. PAGE GG , BEN-ELIYAHU S. The immune-suppressive nature of pain. *Semin Oncol Nurs* 1997; 13:10-5.
12. LICASTRO F, CANDORE G, LIO D, et al. Innate immunity and inflammation in ageing: a key for understanding age-related diseases. *Immun Ageing* 2005; 2: 8.
- 13.HELLHAMMER D H, BUCHTAL J, GUTBERLET I, et al. Social hierarchy and adrenocortical stress reactivity in men.*Psychoneuroendocrinology* 1997; 22: 643-650.
14. OCKENFELS M C, PORTER L, SMYTH J, et al. Effect of chronic stress associated with unemployment on salivary cortisol: overall cortisol levels, diurnal rhythm, and acute stress reactivity. *Psychosom Med* 1995; 57: 460-467.
15. GEISS A, VARADI E, STEINBACH K, et al. Psychoneuroimmunological correlates of persisting sciatic pain in patients who underwent discectomy. *Neurosci Lett* 1997; 237: 65-68.
16. MARKUS R P, FERREIRA Z S, FERNANDES P A, et al. The immune-pineal axis: a shuttle between endocrine and paracrine melatonin sources. *Neuroimmunomodulation* 2007; 14: 126–133.
17. PONTES G N, CARDOSO E C, CARNEIRO-SAMPAIO M M S, et al. Injury switches melatonin production source from endocrine (pineal) to paracrine (phagocytes) – melatonin in human colostrum and colostrum phagocytes. *J Pineal Res* 2006; 41: 136- 141.
18. PONTES G N, CARDOSO E C, CARNEIRO-SAMPAIO M M S, et al. Pineal melatonin and the innate immune response: the TNF- α increase after cesarean section suppresses nocturnal melatonin production. *J Pineal Res* 2007; 43: 365-371.
19. DA SILVEIRA CRUZ-MACHADO S, CARVALHO-SOUSA C E, TAMURA E K, et

- al. TLR4 and CD14 receptors expressed in rat pineal gland trigger NF κ B pathway. *J Pineal Res* 2010; 49:183-92.
20. FERREIRA Z S, FERNANDES P A, DUMA D, et al. Corticosterone modulates noradrenaline-induced melatonin synthesis through inhibition of nuclear kappa B. *J Pineal Res* 2005; 38: 182–188.
21. FERNANDES P A, CECON E, MARKUS R P, et al. Effect of TNF- α 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: 344–350.
22. FERNANDES P A, BOTHOREL B, CLESSE D, et al. Local corticosterone infusion enhances nocturnal pineal melatonin production in vivo. *J Neuroendocrinol* 2009; 21: 90–97.
23. COUTO-MORAES R, PALERMO-NETO J , MARKUS RP The immune-pineal axis: stress as a modulator of pineal gland function. *Ann N Y Acad Sci* 2009; 1153:193-202.
24. YUWILER A Effects of steroids on serotonin-N-acetyltransferase activity of pineals in organ culture. *J Neurochem* 1989; 52:46-53.
25. MARI JJ, WILLIAMS P. A validity Study of a Psychiatric Screening Questionnaire (SRQ-20) in Primary Care in the City of Sao Paulo. *Br J Psychiatry* 1986; 148: 23–26.
26. TORRES I L S, WOLNEI C. Evaluation of the structure of Brazilian State-Trait Anxiety Inventory using a Rasch psychometric approach. *J Psychosomatic Research* 2010; 68: 223–233
27. GORENSTEIN C, ANDRADE L. Validation of a Portuguese version of the Beck Depression Inventory and the State-Trait Anxiety Inventory in Brazilian subjects. *Braz J Med Biol Res* 1996; 29: 453–457.

28. FIORAVANTI ACM, et al. Avaliação da Estrutura Fatorial da Escala de Ansiedade-Traço do IDATE. *Avaliação Psicológica* 2006; 5: 217–224.
29. BIAGGIO AMB. A decade of research on state-trait in Brazil. In: Spielberger C, Diaz-Guerrero R, editors. *Cross-cultural anxiety*. New York: Hemisphere 1990; 157–167.
30. ZEGER SL , LIANG KY Longitudinal data analysis for discrete and continuous outcomes. *Biometrics* 1986; 42:121-30.
31. HERBERT RD. How to estimate treatment effects from reports of clinical trials. I: Continuous outcomes. *Australian Journal of Physiotherapy* 2000; 46: 229-35.
32. GRUYS E, TOUSSAINT M, NIEWOLD T, et al. Acute phase reaction and acute phase proteins. *J Zhejiang Univ SCI* 2005; 6B:1045-1056,
33. SKWARLO-SONTA K, MAJEWSKI P, MARKOWSKA M et al. Bidirectional communication between the pineal gland and the immune system. *Can J Physiol Pharmacol* 2003; 81:342-9.
34. MARKUS R P, et al. *Pharmacology & Therapeutics* 2010; 126: 251-262.
35. LOTUFO C M, LOPES C, DUBOCOVICH M L, et al. Melatonin and Nacetylserotonin inhibit leukocyte rolling and adhesion to rat microcirculation. *Eur J Pharmacol* 2001; 430: 351–357.
36. LOTUFO CM, YAMASHITA CE, FARSKY SH et al. Melatonin effect on endothelial cells reduces vascular permeability increase induced by leukotriene B4. *Eur J Pharmacol* 2006; 534:258-63.
37. NELSON RJ, DRAZEN DL. Melatonin mediates seasonal changes in immune function. *Ann NY Acad Sci* 2000; 917: 404–415.

38. FERNANDES P A, CECON E, MARKUS R P, et al. 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: 344–350.
39. CECON E, FERNANDES P A, PINATO L, et al. Daily variation of constitutively activated nuclear factor kappa B (NFkB) in rat pineal gland. *Chronobiology International* 2010; 27:52-67.
40. LEVANDOVSKI R, FERREIRA M B C, HIDALGO M P L, et al. Impact of preoperative anxiolytic on surgical site infection in patients undergoing abdominal hysterectomy. *Am J Infect Control* 2008;36:718-726.
41. PADGETT DA, GLASER R: How stress influences the immune response. *Trends Immunol* 2003; 24:444-448.
42. DEKLOET E R. Hormones and the stressed brain. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1018:1-15.
43. RASHID S, LEWIS G F. The mechanisms of differential glucocorticoid and mineralocorticoid action in the brain and peripheral tissues. *Clin Biochem* 2005; 38:401-409.
44. TSIGOS C, CHROUSOS G P: Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *J Psychosom Res* 2002; 53:865-871.
45. HERMAN J P, FIGUEIREDO H, MUELLER N K, et al. Central mechanisms of stress integration: Hierarchical circuitry controlling hypothalamo- pituitary-adrenocortical responsiveness. *Front Neuroendocrinol* 2003; 24:151-180.
46. BLACK P H. Central nervous system-immune system interactions: Psychoneuroendocrinology of stress and its immune consequences. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38:1-6.

47. PACAK K: Stressor-specific activation of the hypothalamic- pituitary-adrenocortical axis. *Physiol Res* 2000; 49(Suppl 1): S11-S17.
48. MCEWEN B S, KALIA M. The role of corticosteroids and stress in chronic pain conditions. *Metabolism* 2010;59 Suppl 1:S9-S15.
49. MCFARLANE AC, BARTON CA, BRIGGS N et al. The relationship between urinary melatonin metabolite excretion and posttraumatic symptoms following traumatic injury. *J Affect Disord* 2010; 127: 365-369.
50. YOUSAF F, SEET E, VENKATRAGHAVAN L et al. Efficacy and safety of melatonin as an anxiolytic and analgesic in the perioperative period: a qualitative systematic review of randomized trials. *Anesthesiology* 2010; 113:968-976.
51. BORAZAN H, TUNCER S, YALCIN N, et al. Effects of preoperative oral melatonin medication on postoperative analgesia, sleep quality, and sedation in patients undergoing elective prostatectomy: a randomized clinical trial. *J Anesth* 2010; 24:155-160.
52. CAUMO W, TORRES F, MOREIRA NL JR, et al. The clinical impact of preoperative melatonin on postoperative outcomes in patients undergoing abdominal hysterectomy. *Anesth Analg* 2007;105:1263-71.
53. CAUMO W, LEVANDOVSKI R, HIDALGO MP. Preoperative anxiolytic effect of melatonin and clonidine on postoperative pain and morphine consumption in patients undergoing abdominal hysterectomy: a double-blind, randomized, placebo-controlled study. *J Pain* 2009; 10:100-8.
54. YU C X, ZHU B, XU S F, et al. The analgesic effects of peripheral and central administration of melatonin in rats. *Eur J Pharmacol* 2000; 403:49-53.

55. MANTOVANI M, KASTER MP, PERTILE R et al. Mechanisms involved in the antinociception caused by melatonin in mice. *J Pineal Res* 2006; 41:382-9.

Table 1. Characteristics of sample, clinical variables measured during intraoperative and postoperative periods (n=12).

Age (years)†	43.13 ± 5.73
Formal education (years)	8 ± 3.74
Body mass index	26.40 ± 4.42
Number of previous surgeries	1.67 ± 1.04
State-anxiety at baseline	21.69 ± 4.87
Trait-anxiety	20.50 ± 6.51
Pain on VAS at baseline (mm)	11.9 ± 14.8
Duration of surgical procedure (min)	202.4 ± 24.16
Dose of analgesics non-opioids postoperative in the first 48 h after surgery (mg)	2029.36 ± 1290.67
Dose of AINES postoperative in the first 48 h after surgery (mg)	53.15 + 39.55
Dose of morphine postoperative in the first 48 h after surgery (mg)	21.80 ± 29.68
Number of antiemetic doses in the first 48 h after surgery (mg)	13.73 ± 18.51
Bleeding (MI)† (ml)	405.14 ± 378.55

Table 2. GEE model adjusted on nocturnal melatonin secretion (4 days)

Parameters	β	95% CI		χ^2	Df	P
(Intercept)	34.49	1.23	67.762	4.131	1	0.042
High state- anxiety	7.24**	2.69	134.939	8.625	1	0.003
Cortisol	-3.067	-4.78	-1.693	4.234	1	0.040
Trait-anxiety	-0.96	-1.82	-0.109	4.880	1	0.027
Pain on VAS (mm)	-2.73	-2.731	-1.334	32.803	1	0.001

VAS-Visual Analogue Scale

SE, standard error; β , regression coefficient from GEE models for panel data controlling for repeated individual observations.

&Positive value indicates increase on melatonin secretion; a negative value indicates decrease on melatonin secretion.

** State-anxiety classified as high ($>Q50=24$) or low ($<Q50=24$). The value represents the odds ratio to present lower melatonin secretion with high state-anxiety.

TNF
Melatonin
Cortisol
Pain
Anxiety










1 week before surgery	1 day before surgery	Day surgery	1st day surgery	2nd after surgery
Blood sample				
10:00 	10:00 	Surgical procedure	10:00 	10:00 
 22:00	 22:00	 22:00	 22:00	 22:00

Figure 1. Sequence of assessments and procedures during the study period.

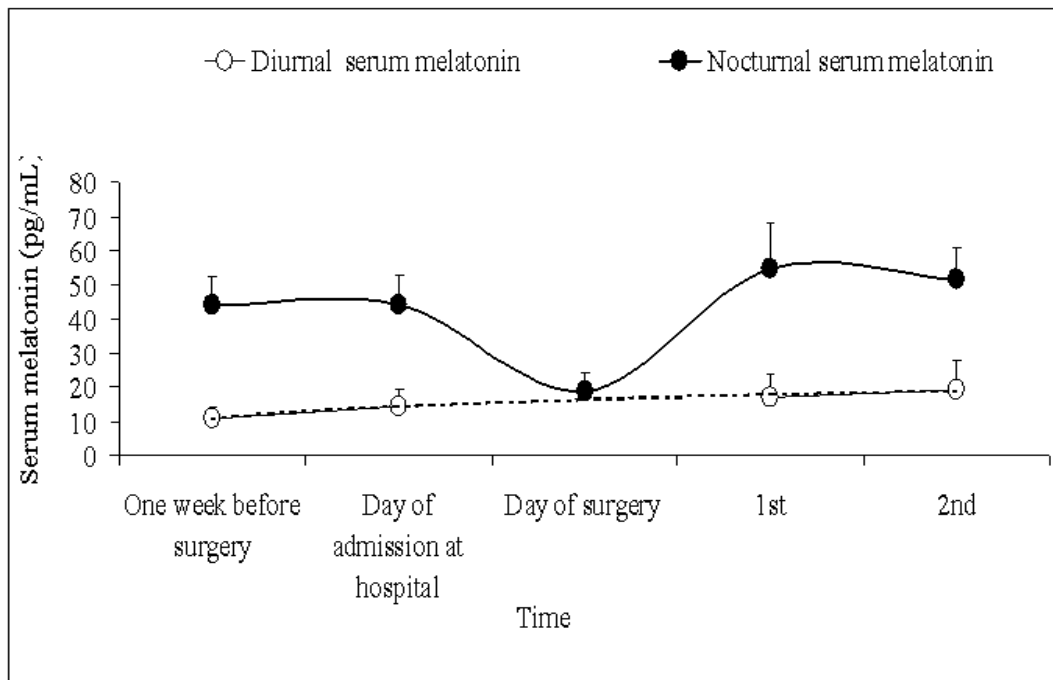


Figure 2. Concentration of melatonin in the serum of patients from one week before to two days after surgery. Data are presented as mean \pm SEM (n= 12).

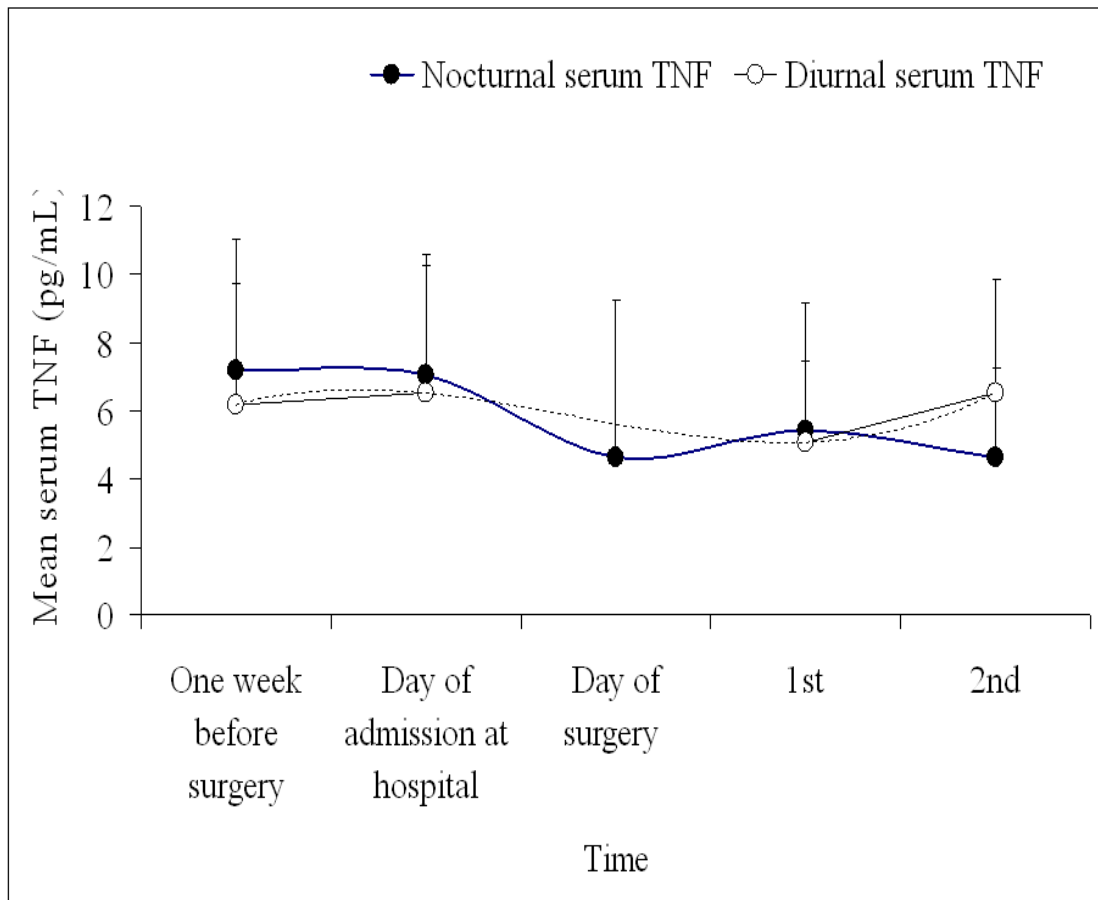


Figure 3. Daytime and nighttime serum concentration of TNF from pre-operative to postoperative days. Data are shown as mean \pm S.E.M. (n=12). The blood was obtained at 10h00 and 22h00 in all days, except for the day of surgery, when the blood was obtained only at night.

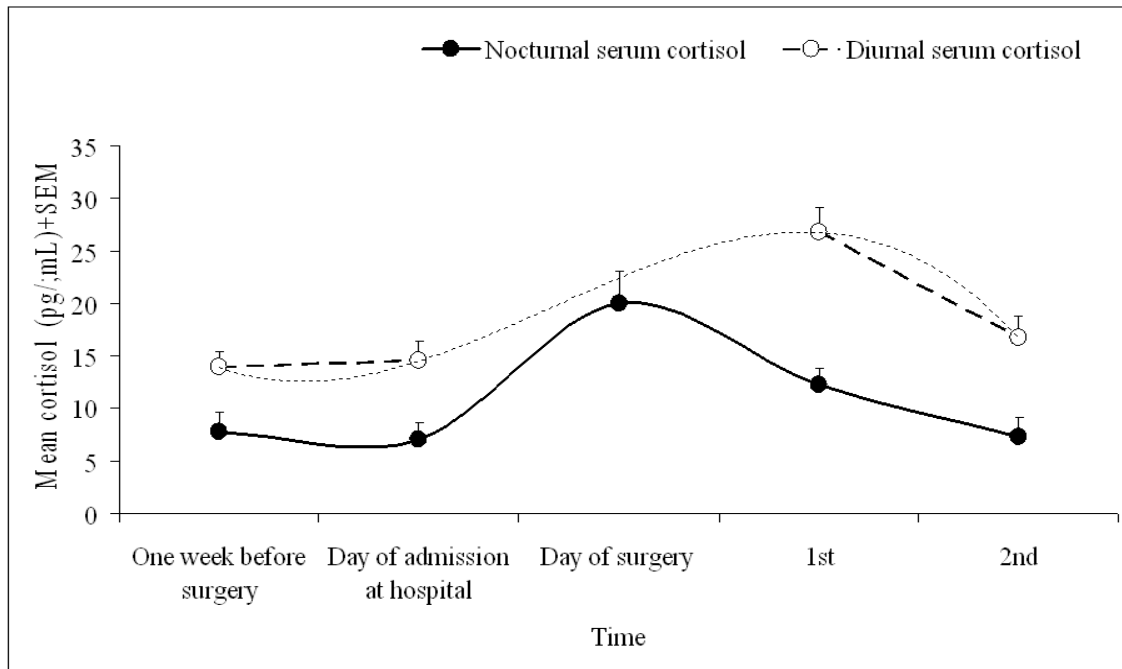


Figure 4. Daytime and nighttime serum concentration of cortisol in the pre-operative and postoperative days. Data are shown as mean \pm S.E.M. (n= 12). The blood was obtained at 10h00 and 22h00 on all days, except for the day of surgery, when the blood was obtained only at night.

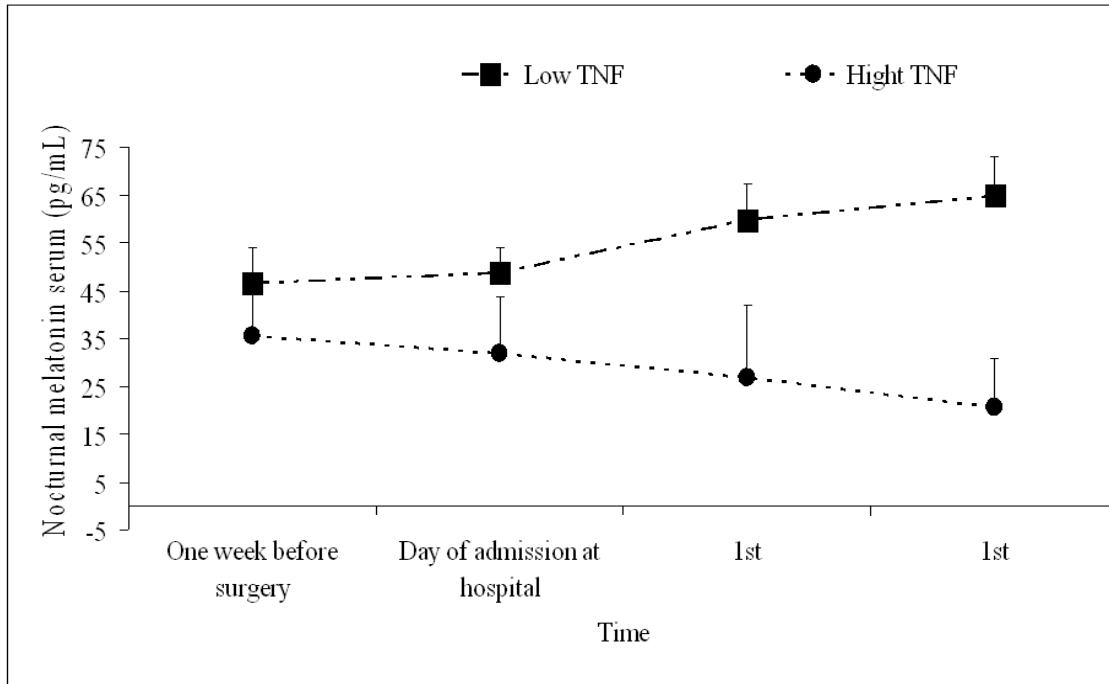


Figure 5. Profile of nocturnal plasma melatonin concentration (pg/mL) from one week before the surgery to the 2nd day after surgery according to the level of TNF (high > Q75=5.2 or low < 5.2 pg/mL). Data are present as mean +SEM (n=12).

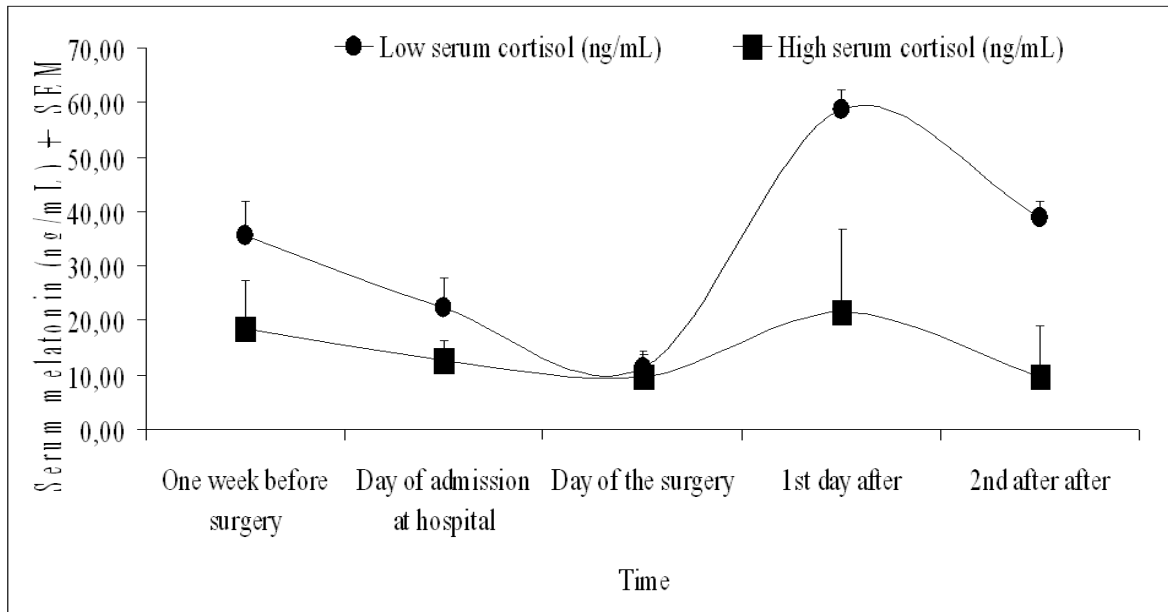


Figure 6. Profile of nocturnal plasma melatonin concentration (pg/mL) from one week before the surgery to the 2nd day after surgery according to the diurnal serum cortisol (high $> Q_{50}=22.4$ or low $Q_{50} < 22.4$ ng/mL). Data are present as mean +SEM (n=12).

8 CONCLUSÕES

8 CONCLUSÕES

Os resultados deste trabalho reforçam a hipótese de que a glândula pineal desempenha um papel expressivo na reação ao estresse cirúrgico.

Dentre os muitos efeitos da melatonina, inclui-se a ação nociceptiva. Este efeito a torna uma opção terapêutica atrativa em patologias associadas com dor, inflamação e alterações do ritmo sono-vigília.

Na fase pró-inflamatória, o TNF promove o desligamento da produção de melatonina pela glândula pineal, o que permite a montagem da resposta de defesa. Além disso, o cortisol é um fator determinante na regulação da onda noturna da melatonina, juntamente com a liberação de TNF na circulação, no início de uma resposta de defesa, suprimindo assim o aumento da melatonina.

Considerando tais evidências, é possível supor que a reação que ocorre entre o TNF, o cortisol e a glândula pineal deve ser essencial para permitir uma recuperação completa e eficiente no período pós-operatório.

9 PERSPECTIVAS FUTURAS

9 PERSPECTIVAS FUTURAS

Espera-se que estes resultados auxiliem na compreensão dos mecanismos fisiopatogênicos da resposta imunoinflamatória e que a supressão da melatonina via TNF possa ser atenuada ou revertida por meio de intervenções que minimizem a resposta ao estresse perioperatório. Além disto, os dados provenientes desta linha de investigação poderão auxiliar na compreensão do estresse perioperatório, o que poderá, também, originar dados que permitirão planejar intervenções que aumentem ou reduzam a resposta neuroendócrina metabólica ao estresse cirúrgico e seu impacto no processo saúde-doença relacionada a ansiedade e dor aguda. É de particular relevância a continuação desta linha de pesquisa para compreender os mecanismos neuroimunoendócrinos que sustentam o benefício clínico observado com a melatonina exógena pré-operatória em estudos precedentes. Tanto no limiar de dor quanto na função do próprio eixo imunopineal. Além disto, estes achados dão suporte para que continuemos a investigação sobre a interação de condições estressoras e a fisiopatogenia de processos dolorosos. Neste aspecto, é de particular interesse do nosso grupo de Cronofarmacologia, Dor e Neuromodulação a continuidade da investigação sobre estresse, eixo imunopineal, dor aguda e dor crônica musculoesquelética.

10 ANEXOS

ANEXO I – CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

NOME DO ESTUDO: AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO ENTRE PRODUÇÃO DE MELATONINA E RESPOSTA IMUNO-INFLAMATÓRIA DE PACIENTES SUBMETIDAS À HISTERECTOMIA

Número do protocolo: _____

INSTITUTO: Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Pesquisador responsável: Drs. Wolnei Caumo e Maria Paz Loayza Hidalgo

Telefone: 99813977 ou 99854066

Comitê de Pesquisa e Ética em Saúde do HCPA: 2101-8304

Nome do Paciente: _____

1. OBJETIVOS DESTE ESTUDO

A finalidade deste estudo é avaliar a resposta inflamatória do organismo produzida pela cirurgia durante os primeiros vinte dias de pós-operatório. Será avaliado o grau dessa resposta e seu efeito na dor e inflamação no local da cirurgia.

2. EXPLICAÇÃO DOS PROCEDIMENTOS

A senhora terá que responder perguntas antes da cirurgia, durante o período que estiver no hospital e após a alta, em casa. Nas avaliações realizadas após a alta hospitalar deverá marcar o grau da sua dor diariamente, durante os primeiros 30 dias após a cirurgia. O que poderá ser mais incômodo são as coletas de sangue realizadas por uma profissional, formada em Bioquímica. Essas coletas serão realizadas duas vezes ao dia, pela manhã e à noite, nos seguintes tempos: sete dias antes da operação. Além dessas coletas serão realizadas duas coletas adicionais 10 e 20 dias depois da operação. A sua participação é voluntária. Se concordar, serão realizados os questionários e iniciaremos as coletas de sangue. Gostaríamos de lembrar que as coletas que ocorrerão fora do período em que estiver internada serão realizadas em sua casa. Os demais cuidados relacionados à cirurgia e anestesia e tratamento da dor serão aqueles usados na rotina do Serviço de Anestesia e Medicina Perioperatória do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

3. POSSÍVEIS RISCOS E DESCONFORTOS

O possível desconforto do presente estudo são as perguntas realizadas antes e após a cirurgia e as picadas de agulha para fazer as coletas de sangue nos diferentes momentos.

4. POSSÍVEIS BENEFÍCIOS DESTE ESTUDO

Os resultados desse estudo poderão trazer informações importantes, sobre a relação dos marcadores da inflamação encontrados no sangue e o grau de inflamação no local da cirurgia e níveis de dor. Portanto, caso se confirme a hipótese de que quanto mais intensa for a reação inflamatória pior serão os resultados da operação, avaliados pela dor e inflamação da ferida cirúrgica, poderemos então, avaliar diferentes tipos de medicamentos e tipos de anestesia para poder melhorar a recuperação dos pacientes no pós-operatório.

5. DIREITO DE DESISTÊNCIA

A senhora pode desistir de participar a qualquer momento. Sua decisão de não participar ou de deixar a pesquisa depois de iniciada, não afetará o atendimento médico posterior.

6. PRIVACIDADE

Todas as informações obtidas deste estudo poderão ser publicadas com finalidade científica, preservando os dados de identificação.

7. CONSENTIMENTO

Declaro ter lido – ou me foi lido – as informações acima antes de assinar este formulário. Foi me dada ampla oportunidade de fazer perguntas, esclarecendo plenamente minhas dúvidas. Por este instrumento torno parte, voluntariamente, do presente estudo.

Assinatura do paciente

Assinatura da testemunha

Assinatura do pesquisador responsável

Porto Alegre, de de 200 .

GRUPO DE PESQUISA EM CRONOFARMACOLOGIA, DOR E NEUROMODULAÇÃO

Nome: _____
 Data da entrevista: ____/____/____ Entrevistador: _____
 Prontuário: _____

Testagem: _____
 Nº no Banco: _____

QUESTIONÁRIO DEMOGRÁFICO

Fone Residencial: _____		Celular: _____		CEP: _____	
Profissão: _____		Situação funcional: <input type="checkbox"/> Ativa <input type="checkbox"/> Desempregada <input type="checkbox"/> Em benefício			
End. Comercial: _____		Fone Comercial: _____			
Comercial: _____					
Caso não possa ser encontrado falar com (recado): _____					
Nome: _____		Relacionamento: _____			
Residência: _____					
1	Peso (Kg): _____	Altura (cm): _____			
2	Estado civil:	(1) solteira	(2) casada	(3) separada	(4) Divorciada
3	Sexo:	(1) Masculino		(2) Feminino	
4	Escolaridade (anos de estudo): _____				
5	Empregado	(1) Sim		(2) Não	
6	Profissão: _____				
7	Turno de atividade:	(1) M	(2) T	(3) N	(4) INSS (Aposentada ou encostada)
8	Fuma?	(1) Sim		(2) Não	
9	Quantos cigarros por dia?	_____ (NÚMERO DE CIGARROS, NÃO CARTEIRAS)			
10	Consome bebida alcoólica?	(1) Sim		(2) Não	
11	Você já usou alguma droga?	(1) Sim		(2) Não	
SE RESPOSTA POSITIVA, PROSSEGUE AS PERGUNTAS ABAIXO					
	Droga	Freqüência de uso		Duração do uso:	
	Maconha				
	Hashish				
	Cocaína				
	Crack				
	Alucinógenos (LSD, chá de cogumelo)				
	Solventes voláteis (Cola, Lala, Lança-perfume)				
	Anfetaminas (Hipopofagia, Inibex, Ecstasy, Ritulina,				
	Outras (especificar)				
12	Você tem alguma doença diagnosticada?	(1) Sim		(2) Não	
	Doença	(1) Sim		(2) Não	
	Hipertensão				
	Infarto				
	Insuficiência cardíaca				
	Diabetes				
	Doença da tireoide				
	Epilepsia				
	Asma				

	Outras (ESPECIFIQUE)			
13	Tem diagnóstico de doença dos nervos (realizado por médicos)	(1) Sim	(2) Não	
14	Qual o diagnóstico?			
15	Há quanto tempo tem o diagnóstico?(MESES):			
16	Usa remédio para os nervos?	(1) Sim	(2) Não	
17	Se usa qual (is)	(1) Antidepressivo tricíclico (2) Antidepressivo serotoninérgico (3) Inibidor da MAO (4) Buspirona	(5) Benzodiazepínico (6) Carbamazepina (7) Fenobarbital (8) Ácido valproico	
18	Região de maior dor?			
19	Quando foi a primeira vez que você notou a presença dessa dor?	(1) nas últimas duas semanas (2) dois a três meses (3) a partir de 3 a 6 meses (4) a partir de 6 meses a 1 ano	(5) a partir de 1 a 2 anos (6) a partir 2 a 5 anos (7) Há mais de 5 anos (8) Não se aplica	
20	Toma algum remédio para dor?	(1) Sim	(2) Não	
		Medicamento	Quantidade	Frequência
				%Alívio da dor
21	Você já procurou um serviço de emergência devido a dor?	(1) Sim	(2) Não	
22	Você já foi hospitalizado devido a dor?	(1) Sim	(2) Não	
23	Você já recebeu ou recebe benefícios financeiros devido a sua dor?(encostado, em benefício)	(1) Sim	(2) Não	
24	Você já recebeu ou recebe benefícios financeiros devido a sua dor?(encostado, em benefício)	(1) Sim	(2) Não	
25	Em que hora do dia a sua dor é pior?	(1) Início da manhã (2) Final da manhã (3) Início da tarde (4) Fim da tarde	(3) À noite (6) Durante o sono (7) Não varia (8) Varia, mas não tem hora	
26	A dor lhe atrapalha para iniciar o sono?	(1) todas as noites (2) quase todas as noites	(3) algumas noites (4) nunca	
27	A dor lhe acorda durante a noite?	(1) todas as noites (2) quase todas as noites	(3) algumas noites (4) nunca	

GRUPO DE PESQUISA EM CRONOFARMACOLOGIA, DOR E NEUROMODULAÇÃO

Nome: _____
Data da entrevista: ____/____/____ **Entrevistador:** _____
Prontuário: _____

Testagem: _____
Nº no Banco: _____

SELF REPORTING QUESTIONNAIRE (SRQ)

- | | | |
|---|------------|------------|
| 1. Você tem dores de cabeça com frequência? | () SIM | () NÃO |
| 2. Tem falta de apetite? | () SIM | () NÃO |
| 3. Dorme mal? | () SIM | () NÃO |
| 4. Fica com medo com facilidade? | () SIM | () NÃO |
| 5. Suas mãos tremem? | () SIM | () NÃO |
| 6. Se sente nervoso, tenso ou preocupado | () SIM | () NÃO |
| 7. Tem problema digestivo? | () SIM | () NÃO |
| 8. NÃO consegue pensar com clareza? | () SIM | () NÃO |
| | (concorda) | (discorda) |
| 9. Sente-se infeliz? | () SIM | () NÃO |
| 10. Chora mais que o comum? | () SIM | () NÃO |
| 11. Acha difícil gostar de suas atividades diárias? | () SIM | () NÃO |
| 12. Acha difícil tomar decisões? | () SIM | () NÃO |
| 13. Seu trabalho diário é um sofrimento? (tormento) | () SIM | () NÃO |
| 14. NÃO é capaz de ter um papel útil na vida? | () SIM | () NÃO |
| | (concorda) | (discorda) |
| 15. Perdeu o interesse pelas coisas? | () SIM | () NÃO |
| 16. Acha que é uma pessoa que não vale nada? | () SIM | () NÃO |
| 17. O pensamento de acabar com a vida já passou por sua cabeça? | () SIM | () NÃO |
| 18. Se sente cansado o tempo todo? | () SIM | () NÃO |
| 19. Tem sensações desagradáveis no estômago? | () SIM | () NÃO |
| 20. Fica cansado com facilidade? | () SIM | () NÃO |
| | Soma total | _____ |

GRUPO DE PESQUISA EM CRONOFARMACOLOGIA, DOR E NEUROMODULAÇÃO

Nome: _____
 Data da entrevista: ____/____/____ Entrevistador: _____
 Prontuário: _____

Testagem: _____
 Nº no Banco: _____

IDATE - PARTE II

Leia cada pergunta e faça um círculo em redor do número à direita que melhor indicar como você geralmente se sente.

Não gaste muito tempo numa única afirmação, mas tente dar a resposta que mais se aproximar de como você se sente geralmente.

AVALIAÇÃO

Quase sempre-----4 Às vezes-----2
 Frequentemente-----3 Quase nunca-----1

- | | | | | |
|--|---|---|---|---|
| 1. Sinto-me bem..... | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 2. Canso-me facilmente..... | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 5. Perco oportunidades porque não consigo tomar decisões rapidamente..... | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 7. Sou calmo, ponderado e senhor de mim mesmo..... | | | | |
| 8. Sinto que as dificuldades estão se acumulando de tal forma que não as consigo resolver..... | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 9. Preocupo-me demais com as coisas sem importância | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 10. Sou feliz..... | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 12. Não tenho muita confiança em mim mesmo..... | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 16. Estou satisfeito..... | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 17. Idéias sem importância me entram na cabeça e ficam me preocupando..... | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 18. Levo os desapontamentos tão a sério que não consigo tirá-los da cabeça..... | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 20. Fico tenso e perturbado quando penso em meus problemas do momento..... | 1 | 2 | 3 | 4 |

*** Os itens marcados em vermelhos são as perguntas de caráter positivo do IDATE-traço.**

OBS: TODOS ITENS ESCORIADOS EM 3 RESPOSTAS, 2 e 3 = 2

GRUPO DE PESQUISA EM CRONOFARMACOLOGIA, DOR E NEUROMODULAÇÃO

Nome: _____
Data da entrevista: ____/____/____ **Entrevistador:** _____
Prontuário: _____

Testagem: _____
Nº no Banco: _____

IDATE - PARTE I

Leia cada pergunta e faça um círculo ao redor do número à direita da afirmação que melhor indicar como você se sente agora, neste momento.

Não gaste muito tempo numa única afirmação, mas tente dar uma resposta que mais se aproxime de como você se sente neste momento.

AVALIAÇÃO

Muitíssimo-----4 Um pouco-----2
 Bastante-----3 Absolutamente não----1

- | | | | | |
|--|---|---|---|---|
| 1- Sinto-me calmo..... | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 2- Sinto-me seguro..... | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 5- Sinto-me à vontade..... | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 6- Sinto-me perturbado..... | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 7- Estou preocupado com possíveis infortúnios..... | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 8- Sinto-me descansado..... | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 11- Sinto-me confiante..... | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 13- Estou agitado..... | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 14- Sinto-me uma pilha de nervos..... | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 16- Sinto-me satisfeito..... | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 17- Estou preocupado..... | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 18- Sinto-me confuso..... | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 19- Sinto-me alegre..... | 1 | 2 | 3 | 4 |

*** Os itens demarcados em vermelhos são as perguntas de caráter positivo do IDATE-estado.**

OBS: Questões 6,7 e 18 tem apenas 3 respostas possíveis. 1=1, 2 e 3= 2, 4=4. Demais perguntas: 4 categorias de resposta.

GRUPO DE PESQUISA EM CRONOFARMACOLOGIA, DOR E NEUROMODULAÇÃO

Nome: _____
Data da entrevista: ____/____/____ Entrevistador: _____
Prontuário: _____

Testagem: _____
Nº no Banco: _____

Data: ____/____/____.

ESCALA ANÁLOGO VISUAL E DIÁRIO DE DOR

Avalie o grau da dor que está sentindo. Marque claramente na linha com um traço vertical.

0 _____ 10
SEM DOR **PIOR DOR POSSÍVEL**

1. Em que hora do dia a sua dor é pior? _____
2. Tomou medicação analgésica (Paracetamol) para dor?
() Não () Sim, A que horas? _____ Dosagem? _____

QUESTIONÁRIO DIÁRIO DE SONO

AS PERGUNTAS A SEGUIR SÃO REFERENTES AO DIA DE ONTEM.

POR FAVOR, RESPONDA O MAIS FIELMENTE POSSÍVEL

1. A que horas você foi deitar ontem? ____/____ (horas e min).
2. A que horas você acha que pegou no sono? ____/____ (horas e min).
3. Você lembra de ter acordado e dormido de novo: 1. () Sim 2. () Não
Quantas vezes _____
4. Seu sono desta noite foi?

PÉSSIMO

ÓTIMO

5. Comparando seu sono desta noite com o seu habitual, o desta noite foi:

PIOR

IGUAL

MELHOR

6. A que horas você acordou hoje _____
7. Como você se sentiu ao acordar?

MUITO MAL

MUITO BEM

8. Você dormiu a sesta ou cochilou durante o dia de ontem? 1. () Sim 2. () Não
Quantas vezes? _____ de que horas a que horas?

GRUPO DE PESQUISA EM CRONOFARMACOLOGIA, DOR E NEUROMODULAÇÃO

Nome: _____
Data da entrevista: ____/____/____ **Entrevistador:** _____
Prontuário: _____

Testagem: _____
Nº no Banco: _____

AVALIAÇÕES PÓS-OPERATÓRIAS

- Qual a cirurgia realizada? (VERIFICAR A DESCRIÇÃO DA ALTA) _____
- Tipo de incisão: 1 () mediana 2 () phanestil (transversa) 3 () shevron 4 () lombotomia
- Tempo de internação hospitalar (VERIFIQUE O DIA DE ENTRADA E DE SAÍDA DO HOSPITAL):
_____.
- Tempo de permanência na sala de recuperação (EM MINUTOS – USAR COMO REFERÊNCIA INICIAL A PRIMEIRA AVALIAÇÃO DA ENFERMAGEM E COMO REFERÊNCIA FINAL O HORÁRIO DE ALTA DA FICHA DE ENFERMAGEM): _____

5. COMPLICAÇÕES PÓS-OPERATÓRIAS

5.1. Teve infarto	Sim	Não	7. Hemograma	Sim	Não
5.2. Teve edema agudo de pulmão	Sim	Não	7.1. Leucócitos:	Bastonados:	
5.3. Teve infecção respiratória	Sim	Não	7.2. Metamielócitos:	Mielócitos:	
5.4. apresentou arritmia com necessidade de tratamento	Sim	Não	8. Punção acidental de duramater (FICHA ANESTESIA)	Sim	Não
5.5 Teve atelectasia	Sim	Não	9. Lesão de nervos (VER NA EVOLUÇÃO)	Sim	Não
5.6 Teve infecção urinária	Sim	Não	10. Rx de tórax (DESCRIÇÃO):		
6. INFECÇÃO DA FERIDA OPERATÓRIA					
6.1. Teve infecção da ferida operatória	Sim	Não			
6.2. Foi realizada drenagem da ferida operatória	Sim	Não			
6.2.1. com uso de anestésico local	Sim	Não	11. Antibioticoterapia por mais de 24h	Sim	Não
6.3. Secreção serosa	Sim	Não	11.1. Quais antibióticos?		
6.4. Eritema	Sim	Não			
6.5. Exsudato purulento (pus)	Sim	Não			
6.6. Deiscência	Sim	Não			
6.7. Isolamento bacteriano (culturais)	Sim	Não			
6.7.1. qual agente:			11.2. Tempo de uso:		
6.7.2. origem da amostra:			12. Outras complicações	Sim	Não

REGISTRO DE FÁRMACOS
(OBTENHA OS DADOS DO PRONTUÁRIO DO PACIENTE DURANTE A INTERNAÇÃO)

MEDICAMENTOS (listar todos os medicamentos em uso nos últimos 7 dias)					
MEDICAMENTO	VIA	DOSE	INTERVALO	TEMPO DE USO (duração e último uso)	EFEITOS ADVERSOS

GRUPO DE PESQUISA EM CRONOFARMACOLOGIA, DOR E NEUROMODULAÇÃO

Nome: _____
Data da entrevista: ___/___/___ **Entrevistador:** _____
Prontuário: _____

Testagem: _____
Nº no Banco: _____

REGISTRO DAS MEDICAÇÕES USADAS NO TRANSOPERATÓRIO

Medicação pré-anestésica: (1) sim (2) não			
Qual?			Dose (mg):
Qual?			Dose (mg):
Medicação	Sim	Não	Doses
Midazolam			mg
Diazepan			mg
Fentanil			µg
Alfentanil			µg
Tiopental			mg
Propofol			mg
Antiinflamatório no transoperatório (DOSE EM mg)			
Morfina neuroaxial			Subaracnóidea: (mg) Peridural: (mg)
Remifentanil			mg
Clonidina			µg
Metoprolol			mg
Heparina			UI
Insulina			UI
Ropivacaína			% (ml)
Bupivacaína			% (ml)
Bupivacaína pesada			% (ml)
Lidocaína			% (ml)
Usou antibiótico			
Qual (is) - Nome e dose em mg			
Cirurgia realizada:		Tempo de cirurgia:	
Perda sanguínea (ml) (OLHAR NA FICHA DE ANESTESIA E NA DA ENFERMAGEM)			
Tempo médio (h) de permanência na SRPA:			
Usou intracath? 1 () sim 2 () não			
Usou PAM? 1 () sim 2 () não			