

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**CORRELAÇÃO ENTRE OS NÍVEIS DE BDNF E MELATONINA NA
ENDOMETRIOSE**

GISLENE DALFERTH COSTA

Porto Alegre
2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**CORRELAÇÃO ENTRE OS NÍVEIS DE BDNF E
MELATONINA NA ENDOMETRIOSE**

GISLENE DALFERTH COSTA

Orientadora: Izabel Cristina Custodio de Souza

Co-orientador: 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

Porto Alegre
2012

FICHA CATALOGRÁFICA

Dalferth Costa, Gislene
CORRELAÇÃO ENTRE OS NÍVEIS DE BDNF E MELATONINA
NA ENDOMETRIOSE / Gislene Dalferth Costa. -- 2012.
73 f.

Orientadora: Izabel Cristina Custodio de Souza.
Coorientador: Wolnei Caumo.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa
de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto
Alegre, BR-RS, 2012.

1. melatonina. 2. 6-sulfatoximelatonina. 3. BDNF.
4. TNF. 5. endometriose. I. Cristina Custodio de
Souza, Izabel, orient. II. Caumo, Wolnei, coorient.
III. Título.

Ao meu esposo Josué pela paciência e incentivo, a minha mãe Clarice que sempre acredita nas minhas escolhas.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida com saúde e vontade de continuar lutando com serenidade e lucidez tendo a capacidade de a cada tropeço ter coragem de começar tudo de novo,

A minha orientadora Dr^a Izabel Cristina Custodio de Souza e ao Co-orientador Dr^o Wolnei Caumo pela paciência, acolhimento e competência profissional para que esse trabalho se tornasse realidade,

Em especial, à enfermeira Nádia Elizabeth Guagnini Laiser por ter me dado condições para o início desse mestrado;

A minha companheira de pesquisa Claudia Carina dos Santos pela perseverança e força na nossa longa caminhada,

Ao acadêmico de medicina André Schwertner pela contribuição essencial para a realização dessa dissertação,

Às enfermeiras Luciana Kist e Vera Lúcia Marin do Hospital da Criança Conceição pela ajuda nas trocas de plantão que precisei durante este período,

Ao Grupo de Pesquisa em Dor e Neuromodulação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre pelo apoio na execução e na concretização deste trabalho,

Aos pacientes que se disponibilizaram a participar desta pesquisa acreditando no progresso da ciência,

Ao programa de Pós-Graduação em Medicina da UFRGS e ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre que proporcionaram as condições necessárias para a conclusão desta jornada.

“Comece fazendo o que é necessário, depois o que é possível, e de repente você estará fazendo o impossível.”

Francisco de Assis

RESUMO

O fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e o *turnover* da melatonina estão associados à dor pélvica crônica (DPC) associada à endometriose. Nós realizamos este estudo para entender se a secreção de melatonina, avaliada pela 6-sulfatoximelatonina urinária (aMT6-s), está correlacionada com o controle do BDNF a outros fatores como fator de necrose tumoral (TNF), interleucina 6 (IL-6), interleucina 10 (IL-10), cortisol ou nível de dor. Foram analisadas vinte mulheres com idade entre 18 e 45 anos com dor pélvica crônica e diagnóstico de endometriose por videolaparoscopia. Diferenças nos padrões temporais de aMT6-s e cortisol salivar de acordo com os intervalos de tempo no dia sugerem que ambos apresentaram padrões fisiológicos de flutuação. A dispersão da média da aMT6-s obtida a cada 6 h foi plotada em uma curva de regressão polinomial correspondendo por 43% da variância no perfil de excreção. Aumentos de 1 ng/mL no BDNF sérico levaram a uma modificação média da aMT6-s de -14,32 [intervalo de confiança (IC) 95% (-24,09 a -4,59)] ou vice-versa, enquanto aumentos de 1 ng/mL no TNF sérico levaram a um aumento da excreção média de aMT6-s em 1,32 (IC 95% 0,65 a 1,98). aMT6-s não estava associada com IL-6, IL-10 ou nível de dor. Portanto, nós encontramos que o BDNF sérico está inversamente correlacionado com a aMT6-s, enquanto os níveis de TNF sérico estão positivamente correlacionados com a aMT6-s. Estes achados demonstraram que a interação e as relações entre BDNF e secreção de melatonina na endometriose são complexas e que estudos longitudinais subsequentes são necessários para elucidar como estes sistemas interagem a longo prazo.

Palavras-chave: melatonina; 6-sulfatoximelatonina; BDNF; TNF; endometriose

ABSTRACT

The brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and melatonin turnover has been involved in the endometriosis-associated chronic pelvic pain (EACPP). We run this study to understand whether melatonin secretion, indexed by urinary 6-sulfatoxymelatonin (aMT6-s), is correlated with BDNF controlling to other factors such as tumor necrosis factor (TNF), interleukin 6 (IL-6), interleukin 10 (IL-10), cortisol or pain index. Twenty females, aged 18 to 45, with chronic pelvic pain and endometriosis diagnoses by videolaparoscopy, were analyzed. Differences in the temporal patterns of aMT6-s and salivary cortisol according to time-of-day intervals suggest that both presented physiological patterns of fluctuation. The dispersion of mean aMT6-s obtained every 6 h fitted a quadratic curve of polynomial regression accounting for 43% of the variance in the excretion profile. Increases of 1 ng/mL in serum BDNF led to a mean change in aMT6-s of -14.34 [confidence interval (CI) 95% (-24.09 to -4.59)] or vice versa, while increases of 1 ng/mL in serum TNF led to an increment of the mean aMT6-s excretion by 1.32 (CI 95%, 0.65 to 1.98). aMT6-s was not associated with interleukin (IL-6), interleukin (IL-10) or pain index. Therefore, we found that serum BDNF is inversely correlated with aMT6-s, while levels of serum TNF are positively correlated with aMT6-s. These findings demonstrated that the interaction and relations of BDNF and melatonin secretion in endometriosis are complex and that further longitudinal studies are needed to elucidate how these systems interact over a longer term.

Key words: melatonin; 6-sulfatoxymelatonin; BDNF; TNF; endometriosis.

LISTA DE TABELAS DO ARTIGO

Table 1. Characteristics of the sample and biomarkers levels	52
Table 2. Linear mixed-effects model estimates using fixed effects.....	53

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Estratégia de busca de referências bibliográficas sobre as bases que fundamentam os objetivos deste estudo.18
- Figura 2.** Lesões endometrióticas na região do Fundo de saco de Douglas e no ligamento sacrouterino direito.....19
- Figura 3.** Teorias de patogênese da endometriose.....21

FIGURA DO ARTIGO

Figure 1: Quadratic curve of polynomial regression of twenty-four-hour 6-sulphatoxymelatonin (aMT6s) excretion (ng/mg of creatinine) profiles to each 6-h interval.....54

LISTA DE ABREVIATURAS

SIGLA	SIGNIFICADO
5-HT _{2C}	5-hidroxitriptamina 2c (neurotransmissor endógeno da serotonina)
AA-NAT	Arilalquilamina N-acetiltransferase
AMPc	Adenosina monofosfato cíclica
aMT _{6s} 6	6-sulfatoximelatonina
BDI	Inventário de depressão de Beck
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
COX-2	Ciclo-oxigenase do tipo 2
CRH	Hormônio liberador de corticotropina
CTI	Centro de Tratamento Intensivo
DPC	Dor pélvica crônica
EAV	Escala análogo visual
E ₂	Estrogênio
GnRH	Hormônio regulador gonadotrófico
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
HPA	Hipotálamo-pituitária-adrenal
IL	Interleucina
lx	Lux (unidade de medida de iluminação)
MT ₁	Receptor de melatonina 1
MT ₂	Receptor de melatonina 2
n	Número
NAS	N-acetilserotonina
NK	Células exterminadoras naturais
PKA	Proteína quinase A
p75 ^{NTR}	Receptor de neurotrofina p75
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro
SF-12	Escala de saúde
SNC	Sistema nervoso central
TNF- α	Fator de necrose tumoral
TrkB	Tirosina kinase B (receptor do BDNF)

LISTA DE ABREVIATURAS DO ARTIGO EM INGLÊS

SIGLA	SIGNIFICADO
3NP	3-nitropropionic acid
aMT6	6-sulfatoxymelatonin
AUC	Area under curve
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
CI	Confidence interval
EACPP	Endometriosis-associated chronic pelvic pain
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
HPA	Hypothalamus-pituitary-adrenal
IL	Interleukin
JSLC	João Sabino Cunha
LME	Linear mixed effects
MAPK	Mitogen-activated protein kinases
mRNA	messenger ribonucleic acid
MT1	Receptors melatonin 1
MT2	Receptors melatonin 2
NMDA	N-Methyl-D-aspartate
NSAIDs	Non-steroidal anti-inflammatory drugs
SCID	Structured clinical interview for DSM disorders
STAI	State-trait anxiety inventory
TNF	Tumor necrosis factor
trkB	tyrosine kinase B
VAS	Visual analogue scale

SUMÁRIO

RESUMO	6
LISTA DE FIGURAS	9
FIGURA DO ARTIGO	10
LISTA DE ABREVIATURAS	11
LISTA DE ABREVIATURAS DO ARTIGO EM INGLÊS	12
1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 Estratégias para localizar e selecionar as informações.....	17
2.2. Aspectos conceituais e fisiopatogenia da endometriose.....	19
2.3. Sistema imunológico e endometriose.....	22
2.4. A dor na endometriose	23
2.5. Endometriose e BDNF	24
2.6. Melatonina.....	26
2.7. BDNF e melatonina.....	27
2.8. 6-Sulfatoximelatonina	28
3. MARCO TEÓRICO	29
5. OBJETIVO.....	31
5.1. Objetivo principal.....	31
5.2. Objetivos secundários	31
6. REFERÊNCIAS	32
7. ARTIGO EM INGLÊS.....	37
8. CONCLUSÕES.....	55
9. PERSPECTIVAS FUTURAS	56
ANEXOS.....	57

1. INTRODUÇÃO

A endometriose é caracterizada pela ocorrência de estroma e glândulas endometriais fora da cavidade uterina, sendo sua primeira descrição creditada ao médico alemão Von Rokitansky em 1860 (1). Corresponde a uma condição de caráter multifatorial, estrógeno-dependente, associada a uma resposta inflamatória generalizada na cavidade peritoneal. É considerada a causa mais comum de dor pélvica crônica nas mulheres em idade reprodutiva, apresentando prevalência de 22% neste grupo (2). Também está associada à infertilidade e a quadros depressivos (3). Diversos fatores têm sido implicados em sua etiologia, como menstruação retrógrada, hereditariedade, disfunções imunológicas, toxinas ambientais (4) e, mais recentemente, estresse oxidativo (5).

Considerando que a endometriose é uma doença inflamatória imunomediada, pode-se hipotetizar que esteja relacionada à alteração de marcadores como a melatonina, neuro-hormônio produzido pela glândula pineal, que, por via neural retino-hipotalâmica e por uma via polissináptica, recebe informações do ciclo claro-escuro ambiental. A pineal é responsável pela síntese de melatonina na fase de escuro a partir da acetilação da serotonina pela ação da enzima aril-alquil-N-acetiltransferase (AA-NAT), que é ativada pela noradrenalina. Como a inervação da pineal é feita pela via simpática, o desencadeamento da via de transdução adenosina monofosfato cíclica (AMPC) - proteína quinase A (PKA) é decorrente da estimulação de adrenoceptores β_1 (6, 7).

Embora o comando de secreção de melatonina seja regulado pelo sistema simpático, tanto em estudos experimentais com camundongos, quanto em alguns modelos de inflamação em humanos, mediadores inflamatórios como a IL-1 e o TNF- α mostraram-se capazes de bloquear a ação do sistema simpático (8). Um estudo demonstrou que a corticosterona, glicocorticoide liberado pela glândula adrenal em animais, potencializa a produção de melatonina induzida por noradrenalina em cultura de células pineais de ratos, enquanto o TNF- α a inibe (9), comprovando haver uma modulação da liberação de melatonina pelos mediadores inflamatórios. Logo, sendo a endometriose uma condição inflamatória, é possível que o eixo de produção da melatonina esteja alterado em pacientes com essa condição. A 6-sulfatoximelatonina urinária (aMT6s) é o principal metabólito da melatonina, refletindo

aproximadamente 90% dos seus níveis séricos (10, 11).

Outro marcador envolvido na fisiopatogenia da endometriose é o fator neurotrófico derivado do cérebro (*BDNF*) que, em conjunto com seus receptores TrkB e p75NTR, é amplamente expresso no sistema reprodutor feminino (12). Sabe-se que desempenha um papel central na neurogênese e plasticidade sináptica (13), atuando na regulação da função, do crescimento e da diferenciação neuronal (13, 14). Age também como regulador positivo de antioxidantes. Estudo recente de Zhang *et al.* sugere que uma variante alélica do gene *BDNF* (Val66Met) pode contribuir para o aumento da susceptibilidade a estágios de endometriose mais avançados (III e IV), para a gravidade dos sintomas e para a infertilidade associada à doença (15). Não apenas a localização do *BDNF* no sistema reprodutivo, mas também sua potencial atividade sobre o estresse oxidativo sugerem, um possível papel do *BDNF* na patogênese da endometriose e na infertilidade associada.

Estudos prévios demonstram que o BDNF está envolvido na regulação de muitas funções desempenhadas pelo eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) (16-18), assim como, que estressores ativam o eixo HPA através de circuitos polissinápticos (19, 20). Portanto, é cabível uma análise da relação entre o eixo HPA e o BDNF na endometriose, uma vez que essa cascata de eventos converge no núcleo paraventricular hipotalâmico para ativar neurônios produtores de hormônio liberador de corticotropina (CRH) (21).

Na endometriose, possivelmente vários sinais nociceptivos são ativados por receptores sensoriais periféricos especializados na percepção da dor. Assim, alterações neurofuncionais que envolvam interação entre neuromoduladores, neurotransmissores e transdutores de sinais, em uma rede de sinapses, propiciariam um melhor entendimento da etiologia e mecanismos de manutenção da dor (22). Assim, nós postulamos que a análise da disfunção do sistema neuro-imune-endócrino, avaliada por BDNF, melatonina, cortisol e citocinas, pode nos indicar os mecanismos sistêmicos envolvidos no curso da endometriose.

O presente estudo originou o artigo intitulado “Relationship between serum BDNF and urinary 6-sulfatoximelatonin in endometriosis associated chronic pelvic pain”, submetido para apreciação pela revista *Neuroscience Letters*. A estrutura da apresentação 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 DE LITERATURA

2.1 Estratégias para localizar e selecionar as informações

Nesta revisão da literatura, pretende-se apresentar alguns aspectos sobre a relação entre a função do eixo imune-pineal, aferida através da mensuração da excreção urinária aMT6s, e o BDNF na endometriose. Na apresentação do tema, foram focados os seguintes tópicos: 1) endometriose, 2) melatonina e 3) *BDNF*. A estratégia de busca envolveu as seguintes bases de dados: MEDLINE (site PubMed), LILACS e SciELO, além disso, foi consultado o banco de teses da CAPES. As referências bibliográficas dos artigos identificados foram revisadas para localizar outras referências não contempladas na busca inicial.

Nos *sites* PubMed, LILACS e SCIELO, foram realizadas buscas através dos termos “*endometriosis*”, “*BDNF and melatonin*” e “*BDNF and melatonin and endometriosis*”. Usando o termo “*endometriosis*”, encontrou-se 19.088 artigos no Pubmed, 711 no LILACS, 115 no SCIELO e 37683 na CAPES; utilizando “*BDNF and melatonin*”, foram encontrados 24 artigos no pubmed, 2 artigos no LILACS, um artigo no SCIELO e 535 artigos na CAPES. Correlacionando “*BDNF and melatonin and endometriosis*”, não foi encontrado nenhum artigo ou tese relevante em qualquer das quatro fontes pesquisadas.

Para apresentar o tema, usou-se a revisão sistemática esquematizada na figura 1.

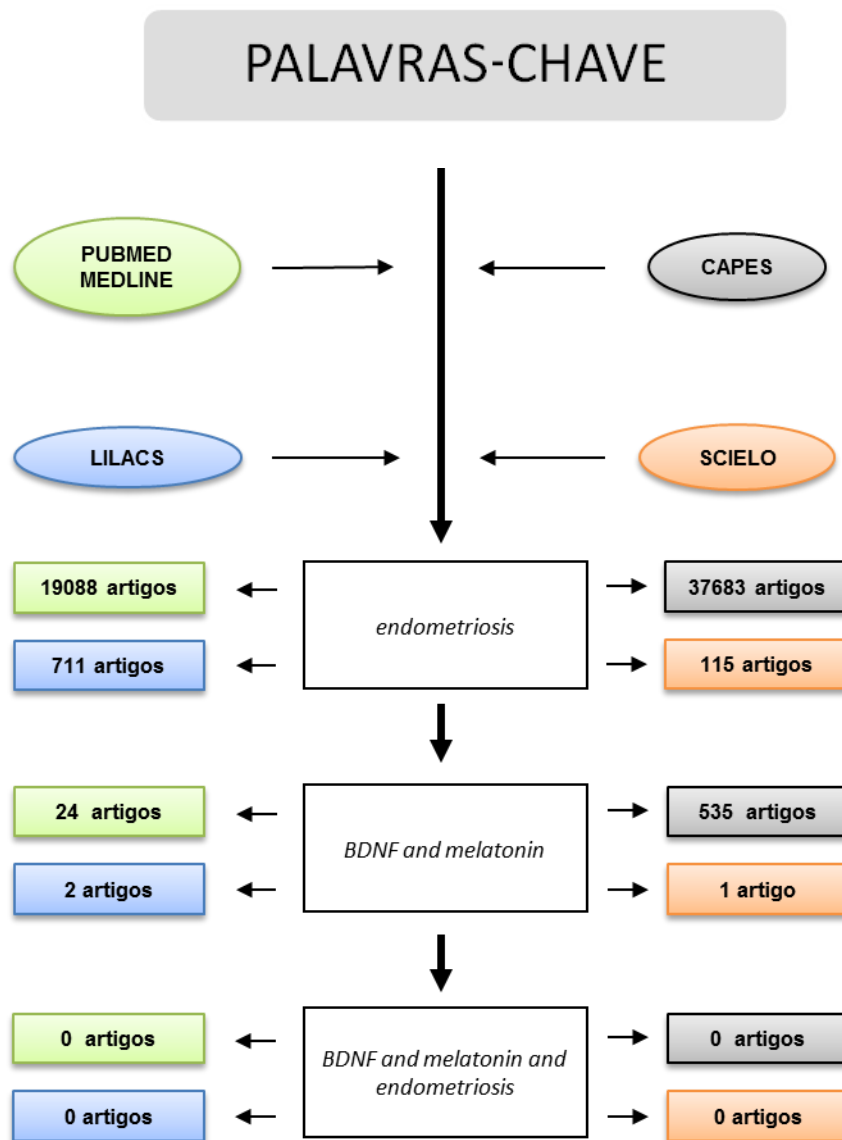


Figura 1. Estratégia de busca de referências bibliográficas sobre as bases que fundamentam os objetivos deste estudo.

2.2. Aspectos conceituais e fisiopatogenia da endometriose

A endometriose é uma condição que atinge mulheres em idade reprodutiva, tendo como principal característica o implante e crescimento de tecido endometrial fora da cavidade uterina. Seu principal sintoma é a dor pélvica crônica (DPC), que pode se manifestar como: dismenorrea severa progressiva (dor menstrual excessiva), dispareunia profunda (dor pélvica no ato sexual) ou disquezia (dor pélvica na defecação). Cursa também, em muitos casos, com redução da fertilidade (23, 24). Embora Carl Von Rokitansky tenha descrito pela primeira vez em 1860 a visualização de tecido semelhante ao endométrio em peças de necropsia (1), a endometriose, da forma como é conhecida atualmente, somente foi descrita por Sampson em 1927 (25). Sua causa permanece desconhecida, estando provavelmente envolvidos: menstruação retrógrada, hereditariedade, deficiência da imunidade e toxinas ambientais. Recentemente, o estresse oxidativo tem sido proposto como outro fator com potencial importância na fisiologia da doença (5). As principais teorias quanto à etiologia da endometriose podem ser visualizadas na figura 2.

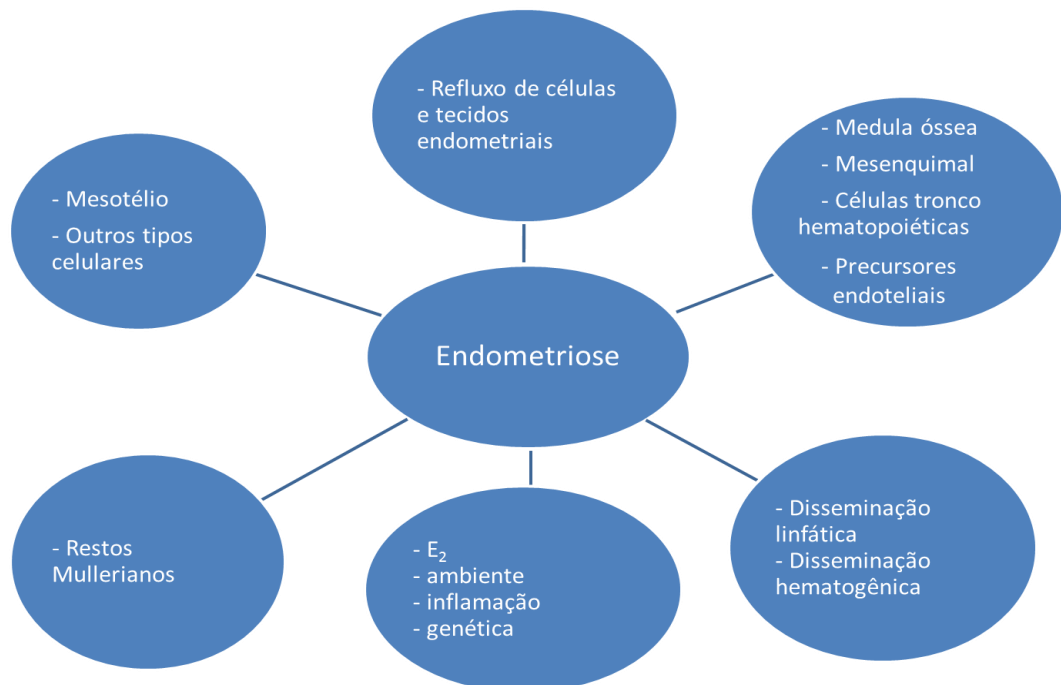


Figura 2. Teorias de patogênese da endometriose. (Adaptado de Burney *et al.*, 2012)

Para o definitivo diagnóstico da endometriose, o padrão ouro a ser realizado é a inspeção visual da pelve por via laparoscópica, exceto quando a doença é visível na vagina ou em outras áreas, o que raramente ocorre (27). Devido à necessidade de métodos sofisticados e nem sempre disponíveis como a videolaparoscopia, para seu diagnóstico definitivo, é difícil definir a real prevalência desta patologia na população. Outro fator que torna sua identificação complexa é o fato de não existir relação direta entre a presença da doença e os sintomas apresentados pela paciente, sendo que, muitas vezes, algumas portadoras são assintomáticas (28). Além disso, muitas mulheres com dor pélvica e quadro clínico sugestivo da doença podem não ter evidência de endometriose à laparoscopia.

A prevalência em mulheres assintomáticas pode variar de 2% a 50%, dependendo da população e da modalidade diagnóstica utilizada (29). Palma Dias *et al.* (1995) demonstraram, em um estudo realizado no serviço de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), que, em pacientes com dor pélvica submetidas à laparoscopia, a endometriose foi identificada em 56,1% dos casos, e foi o segundo diagnóstico mais frequente em pacientes com infertilidade (28,3%) (30).

Esta doença acomete principalmente mulheres nulíparas. As áreas do organismo com maior prevalência de endometriose são: o fundo de saco de Douglas (figura 3), ovários, ligamento redondo, tubas uterinas, cérvix, vagina e trato urinário. Este último é acometido em cerca de 1% a 2% dos casos, sendo a bexiga afetada em 84% das vezes (principalmente trígono e colo vesical) (31).

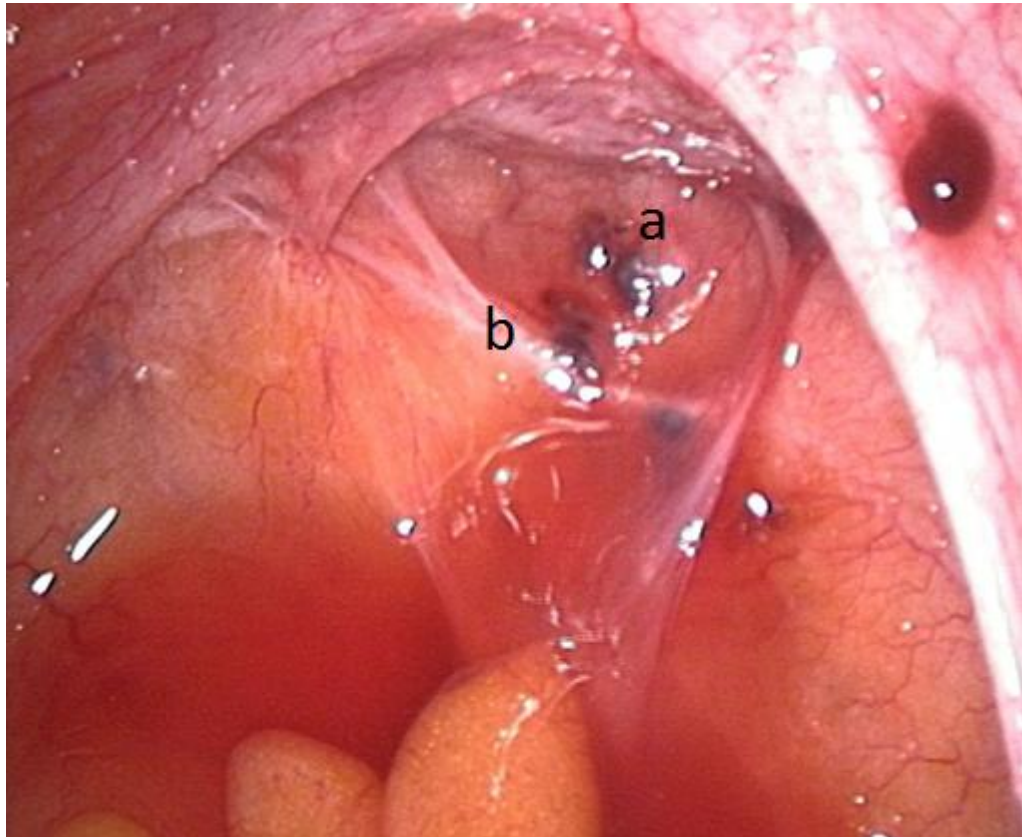


Figura 3. Lesões endometrióticas na região do fundo de saco de Douglas (a) e no ligamento sacrouterino direito (b) (adaptado de Nunc *et al.*, 2011) (32).

A complexidade da endometriose resulta em alta morbidade (33). É uma doença multifatorial associada em geral a uma resposta inflamatória na cavidade peritoneal (34). O tecido endometrial ectópico tem a propriedade de responder às variações hormonais, sendo que, normalmente, a dor pélvica associada à endometriose tende a ser cíclica e progressiva, podendo tornar-se contínua com a evolução da doença (35). Estudo demonstrou que, nesse processo patológico, há comprometimento da qualidade de vida, inclusive sexual, com limitações importantes em atividades físicas, laborais e recreativas (36).

2.3. Sistema imunológico e endometriose

A endometriose está associada a uma resposta inflamatória generalizada na cavidade peritoneal (34), sendo que, possivelmente, o sistema imunológico tenha algum papel em sua patogênese. Um estudo apontou falhas na defesa imunológica, como alterações na imunidade mediada pelas células *T*, que prejudicariam a capacidade de eliminação de células e fragmentos endometriais em localizações ectópicas na cavidade pélvica (37). Sabe-se que as células *NK* desempenham importante papel no *clearance* dessas células ectópicas e que as células *T* reguladoras teriam, portanto, papel decisivo no surgimento e manutenção da doença (38).

Além disso, uma série de alterações imunológicas foi identificada no fluido peritoneal dessas pacientes (4), incluindo a presença de um número aumentado de macrófagos ativado com maior produção de citocinas e diminuição da atividade fagocítica (39). Mulheres com endometriose apresentam um perfil de citocinas bastante diverso daquele encontrado em mulheres saudáveis, com concentrações peritoneais elevadas de diversas citocinas, como fator inibidor da migração de macrófagos, IL-1, IL-2, IL-6, IL-8 e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (38). Também foram descritas alterações em linfócitos *B*, aumento de fatores de crescimento e fatores angiogênicos derivados das próprias lesões, da secreção de macrófagos ou ainda de outras células do sistema imunológico (26, 40). Alguns autores têm, inclusive, considerado a endometriose como uma doença autoimune devido à presença frequente de autoanticorpos, doenças autoimunes associadas, como diabetes tipo 1, hipotireoidismo, lúpus e artrite reumatóide, e também abortos recorrentes (41).

2.4. A dor na endometriose

Dentre os sintomas de endometriose, a dor pélvica crônica (DPC) pode ser definida como uma dor debilitante, constante ou recorrente por um período superior a 6 meses. A prevalência de DPC é variável de acordo com a população estudada, oscilando de 3,8% na população geral (42) a até 40% em amostras de pacientes inférteis (43). A endometriose é considerada a causa mais comum de DPC em mulheres em idade reprodutiva (23).

Os mecanismos de produção da dor na endometriose incluem: 1) produção e liberação, por meio de células do sistema imunológico associadas aos implantes endometriais, de substâncias mediadoras da resposta inflamatória (fatores de crescimento e citocinas) (44); 2) efeitos diretos e indiretos causados pelos sangramentos dos implantes (45); 3) invasão do plexo neural pélvico, especialmente em implantes profundos no fundo de saco de Douglas (46). Em algumas mulheres, a dor pode ser exacerbada pela ocorrência concomitante de outras condições dolorosas crônicas, como síndrome do intestino irritável, cistite intersticial, cálculos urinários de repetição, vulvodinia, síndrome temporomandibular, enxaqueca e fibromialgia.

Ainda são pouco conhecidos os mecanismos algogênicos relacionados aos implantes ectópicos. Estudos falharam na tentativa de encontrar correlação entre os escores e tipos de dor e os vários aspectos da anatomia e bioquímica dos implantes (23). Por outro lado, a mais constante correlação registrada parece ser entre a gravidade da dor e a profundidade de infiltração no peritônio ou órgãos pélvicos. Sabe-se que a porcentagem de pacientes relatando dor é maior em mulheres com implantes infiltrantes profundos em áreas altamente inervadas (como a região uterossacra) do que em mulheres com outros tipos de implantes (47).

Estudo em modelos animais recentemente demonstrou que os implantes ectópicos estão associados ao desenvolvimento de inervação sensorial e simpática próprias, similar a inervação encontrada no útero de ratos saudáveis, achado que foi também mostrado em mulheres com endometriose (48). O processo de dor crônica provavelmente também está relacionado à sensibilização central decorrente da ativação e modulação das fibras sensoriais por agentes inflamatórios, possivelmente com alguma influência do estradiol. O estímulo

sensibilizador inicial, modulado pelos agentes inflamatórios, levaria a uma hiperexcitabilidade duradoura dos neurônios no sistema nervoso central (SNC), produzindo dor crônica. A inconsistência da correlação entre dor e os implantes ectópicos pode refletir, portanto, entre outros aspectos, a variabilidade dos muitos fatores relacionados ao suprimento nervoso dos implantes. A dor produzida seria variável de acordo com o tipo de nervo, os agentes ativadores ou sensibilizadores, os locais no SNC que recebem essas informações sensoriais e o efeito modulador do estradiol (23).

Embora a remoção cirúrgica dos implantes ectópicos alivie os sintomas dolorosos em muitas mulheres, esse procedimento pode falhar. A dor pode tornar a ocorrer mesmo sem evidência de doença residual ou qualquer outra patologia visceral e/ou somática identificável (49). O uso de medicações, como os agonistas do GnRH, utilizados no tratamento dessas pacientes, suprime a secreção hipofisária de gonadotrofinas e a consequente produção de esteroides sexuais, levando ao desenvolvimento de um estado hipoestrogênico sistêmico. Esse tratamento resulta na eliminação ou redução dos tamanhos dos implantes (50), sendo geralmente efetivo na diminuição dos sintomas dolorosos nas mulheres com endometriose (51), porém com efeitos adversos bastante significativos, como o aparecimento de fogachos, redução da libido e ressecamento vaginal.

2.5. Endometriose e BDNF

O *BDNF* é uma neurotrofina amplamente expressa no SNC. Tem sido reconhecido por seus efeitos na plasticidade sináptica (13), estando envolvido na proliferação, diferenciação, sobrevivência e morte de células neuronais e não-neuronais durante o desenvolvimento do SNC adulto (14). Os níveis de *BDNF* plasmáticos e no fluido folicular apresentam modificações dinâmicas tanto durante o ciclo menstrual de mulheres férteis com ciclos normais como na estimulação ovariana controlada para fertilização *in vitro*. Além disso, demonstrou-se que a sua concentração cai consideravelmente após a menopausa (52-54). Esses achados sugerem que o *BDNF* pode também desempenhar um papel importante na reprodução feminina. Experimentos envolvendo perda ou ganho de função revelaram que o

BDNF possui papel significativo na esteroidogênese, na foliculogênese, no desenvolvimento folicular precoce, na extrusão de corpos polares e na ovulação (55-58).

Poucos estudos avaliaram a expressão de *BDNF* na endometriose. O *BDNF* é sabidamente um regulador positivo de antioxidantes e bloqueia o desenvolvimento do estresse oxidativo, processo recentemente implicado na patogênese da endometriose. Tem sido sugerido que as espécies reativas de oxigênio podem promover o crescimento e a adesão das células endometriais na cavidade peritoneal e levar à infertilidade (59-61). Portanto, não apenas a localização do *BDNF* no sistema endócrino reprodutivo, mas também sua potencial atividade sobre o estresse oxidativo, sugerem um possível papel do *BDNF* na patogênese da endometriose e na infertilidade associada.

Recentemente, identificou-se a expressão de *RNA* de *BDNF* em endometriomas e endométrio eutópico de mulheres com dor crônica relacionada à endometriose (62). Demonstrou-se também haver elevação significativa nos níveis de *BDNF* nessas pacientes (63). Essas evidências indicam que o *BDNF* possa ser um modulador do crescimento neuronal no endométrio das pacientes com endometriose, podendo, dessa forma, contribuir para os sintomas dolorosos nessa população (63).

O papel do *BDNF* na patogênese da endometriose e sua relação com outros biomarcadores, incluindo citocinas inflamatórias e melatonina, não estão completamente elucidados. O *BDNF* parece estar envolvido em reações inflamatórias, tendo sua produção aumentada em resposta a citocinas pró-inflamatórias, como IL-2 e IL-6 (64, 65). Evidências crescentes indicam que o *BDNF* também é um importante modulador da neurotransmissão sensorial nas vias nociceptivas (66).

Embora alguns estudos tenham relatado que o *BDNF* possa exacerbar comportamentos indicativos de dor (67), diversos outros trabalhos têm enfatizado um papel antinociceptivo. Variados tipos de processos álgicos, incluindo dor visceral (68), inflamatória (69), e neuropática (70) aumentam a síntese de *BDNF* e de seu receptor *TrkB* no gânglio da raiz dorsal da medula, demonstrando um aparente efeito antinociceptivo (68). Portanto, a relação

entre *BDNF* e dor é bastante complexa, necessitando de maiores esclarecimentos em alguns pontos.

2.6. Melatonina

A melatonina, ou N-acetil-5-metoxitriptamina, é um neuro-hormônio predominantemente produzido pela glândula pineal nos períodos de ausência de luminosidade; possui efeitos anti-inflamatórios, analgésicos e antioxidantes. A pineal é innervada pelo sistema nervoso simpático, o qual estimula a produção de melatonina e determina seu pico fisiológico noturno (6, 7).

Os primeiros estudos avaliando a participação da glândula pineal na resposta inflamatória datam da década de 1990. Através de estudos em modelos animais (71), demonstrou-se que a produção noturna de melatonina dependia não somente da sinalização noradrenérgica, mas também da corticosterona produzida pela medula adrenal (72). A partir destes resultados, suscitou-se a hipótese de que a pineal é responsiva a glicocorticoides e que, durante o processo inflamatório, a produção de melatonina seria influenciada pela ação facilitadora dos corticoides. Estudos subsequentes utilizando cultura de células da glândula pineal estimuladas por noradrenalina evidenciaram que a resposta na produção de melatonina depende da concentração de corticosterona, sendo que baixas concentrações potencializam, enquanto altas concentrações inibem a produção de melatonina induzida por noradrenalina. Evidências de estudos experimentais e de estudos clínicos têm sugerido que outros mediadores da inflamação e do estresse também interfiram na secreção de melatonina. Demonstrou-se que, no início da resposta inflamatória, a produção noturna de melatonina pela glândula pineal é silenciada, passando a melatonina a ser produzida localmente com o objetivo de combater o agente injuriante (9).

Logo, enquanto a corticosterona potencializa a produção de melatonina induzida por noradrenalina em células pineais de rato em cultura, a ativação induzida por *TNF- α* (que ocorre nos processos inflamatórios) a inibe. A partir deste conjunto de dados, é evidente que a dosagem de 6-sulfatoximelatonina urinária pode expressar o estado modular adrenérgico no

eixo imune-pineal, mas também refletir o efeito modulador negativo de mediadores inflamatórios neste eixo.

A endometriose é uma doença inflamatória imunomediada e pode estar relacionada à desregulação do sistema temporizador endógeno, cujo principal marcador é a melatonina. Partindo desta premissa, diversos estudos têm testado a melatonina no tratamento de condições que cursam com dor tanto aguda quanto crônica. Demonstrou-se que ela possui efeito analgésico em pacientes com cefaleia (73), refluxo gastro-esofágico (74), fibromialgia (75) e dor aguda pós operatória (76-80).

2.7. BDNF e melatonina

A relação entre melatonina e *BDNF* não é completamente conhecida, porém importantes avanços têm ocorrido nesse campo. Sabe-se que melatonina e *BDNF* compartilham alguns efeitos de neuroproteção. O *BDNF* é sabidamente um regulador positivo de antioxidantes e bloqueia o desenvolvimento do estresse oxidativo, protegendo neurônios contra danos causados pelo mesmo em modelos experimentais (81, 82), efeito também descrito para a melatonina.

Neurônios de mamíferos expressam receptores MT1 e MT2 de melatonina acoplados à proteína G, os quais medeiam os efeitos neuronais da melatonina (83). Tem sido sugerido que a melatonina e seus receptores possam ter algum papel no neurodesenvolvimento e na regulação de fatores neurotróficos (84, 85). *In vitro*, a melatonina promove a viabilidade e diferenciação de células-tronco neuronais e aumenta a produção de *BDNF*, o que é atribuído à sua ação em receptores MT1 (86). Também o tratamento crônico com agomelatina, agonista dos receptores de melatonina MT1 e MT2, e antagonista do receptor 5-HT_{2C}, causa *up-regulation* de fatores neurotróficos, incluindo o *BDNF* (87). Recentemente foi demonstrado que a administração de N-acetilserotonina (NAS), que é um precursor da melatonina, leva à ativação do *TrkB*, receptor de *BDNF* (88), o que poderia possivelmente explicar algumas de suas ações em comum.

2.8. 6-Sulfatoximelatonina

A melatonina sérica é rapidamente metabolizada, principalmente no fígado (89), e excretada pelos rins como 6-sulfatoximelatonina (*aMT6s*), seu principal metabólito urinário. Ao contrário das amostras isoladas de melatonina plasmática ou urinária, as dosagens de *aMT6s* pela manhã refletem acuradamente os picos plasmáticos da concentração de melatonina na noite (90), o que a torna um marcador bastante útil, especialmente em estudos epidemiológicos em larga escala. Demonstrou-se que a medida isolada de 6-sulfatoximelatonina urinária matinal, mesmo a longo prazo, é um marcador fidedigno para os níveis de melatonina em mulheres pré-menopáusicas (91).

Além da maior facilidade de aferição, uma vez que é um método não-invasivo, podendo a urina ser colhida pela própria paciente em sua casa, apresenta estabilidade química bastante adequada para armazenamento das amostras. A estabilidade da *aMT6s* na urina observada é de até 5 dias em temperatura ambiente, o que é particularmente importante quando se realizam estudos com indivíduos em seus ambientes sociais (92).

Diversos estudos utilizam os níveis urinários de *aMT6s* como substitutos para os níveis plasmáticos de melatonina, porém poucos a correlacionaram com desfechos clínicos. Estudo de Hidalgo *et al.* (2011), demonstrou que a excreção de *aMT6s* é um preditor de desfechos clínicos na depressão, especialmente em relação à responsividade ao tratamento com inibidores da recaptção da noradrenalina (93).

Ainda que não existam trabalhos avaliando a excreção de *aMT6s* na endometriose, sua excreção já foi aferida em outras condições mórbidas. Entre os pacientes com enxaqueca crônica, demonstrou-se diminuição dos níveis de *aMT6s* durante os ataques agudos, porém sem diferença entre os indivíduos com a doença que estavam sem dor no momento da aferição (amostras de urina de 12h) (94). Já em indivíduos com cefaleia em salvas, não houve diferença entre os níveis diurnos e noturnos de *aMT6s*, ao contrário dos controles, sendo os níveis noturnos significativamente menores mesmo durante os períodos de remissão (95).

3. MARCO TEÓRICO

A partir do conjunto de dados apresentado, ressalta-se o envolvimento do eixo HPA, mas especificamente da melatonina na regulação de múltiplas funções, incluindo efeitos analgésicos, anti-inflamatórios e antioxidantes. Observa-se também que o BDNF, além de suas ações de neuroproteção e neuroplasticidade, apresenta efeito de regulação positiva (*upregulation*) de substâncias antioxidantes, contribuindo para o controle do estresse oxidativo, processo recentemente identificado na fisiopatogenia da endometriose.

Ambos os marcadores citados parecem estar envolvidos, ou pelo menos relacionados à fisiopatologia desta condição, sendo que a relação entre os dois não é totalmente clara. O BDNF parece estar envolvido na regulação de muitas funções do eixo HPA. Portanto, é cabível uma análise da relação entre o eixo HPA e o BDNF na endometriose para uma compreensão mais completa e exata da doença. No presente trabalho, avaliou-se os níveis de aMT6s urinária em pacientes com dor pélvica crônica associada a endometriose, correlacionando-os com os níveis de BDNF, cortisol salivar e citocinas (IL-6 e IL-10).

4. JUSTIFICATIVA

A partir desta revisão literária, observa-se que, apesar dos avanços no estudo da função imune-pineal e de diversos mediadores como BDNF, cortisol salivar e citocinas IL-2 e IL-10 no contexto de condições patológicas, ainda existem poucos trabalhos abordando esses marcadores de forma conjunta. Esse aspecto ainda não foi abordado na literatura em relação à endometriose. Considerando-se a relevância social do problema, uma vez que a endometriose leva a prejuízo e sofrimento aos indivíduos e à sociedade, se justificam estudos inovadores que possam proporcionar avanço na compreensão da fisiopatogenia da doença, possibilitando incrementos no processo diagnóstico e terapêutico.

Caso esse estudo demonstre a disfunção do eixo neuro-imune-pineal, abrem-se caminhos para possíveis novos alvos diagnósticos e terapêuticos. O interesse sobre este tópico pauta-se na premissa de que a condição dolorosa crônica constitui grande parte da procura a atendimento médico, sendo a maior parcela nos serviços de atenção primária à saúde. Assim, os mecanismos envolvidos na geração, modulação, amplificação e perpetuação da dor, são importantes como base para um programa terapêutico abrangente para tratamento e reabilitação. A partir disso, entende-se que mais estudos serão necessários para a compreensão desse processo complexo.

5. OBJETIVO

5.1. Objetivo principal

- Verificar se a secreção de melatonina, por meio da excreção do metabólito aMT6s, está correlacionada com os níveis de BDNF no soro de pacientes com endometriose.

5.2. Objetivos secundários

- Correlacionar os níveis de BDNF e aMT6s com intensidade da dor, cortisol salivar e marcadores inflamatórios (IL 6, IL 10 e TNF);
- Correlacionar os níveis dos marcadores inflamatórios (IL-6, IL-10 e TNF) com intensidade da dor, aMT6s, BDNF e cortisol salivar.

6. REFERÊNCIAS

1. Rokitansky. Über Uterusdrüsen-Neubildung. Z Gesell-schaft (Wien). 1860;16:577-81.
2. Moen MH, Muus KM. Endometriosis in pregnant and non-pregnant women at tubal sterilization. *Hum Reprod.* 1991;6(5):699-702. Epub 1991/05/01.
3. Lorencatto C, Vieira MJ, Pinto CL, Petta CA. [Evaluation of the frequency of depression in patients with endometriosis and pelvic pain]. *Rev Assoc Med Bras.* 2002;48(3):217-21. Epub 2002/09/28. Avaliacao da frequencia de depressao em pacientes com endometriose e dor pelvica.
4. Rajaratnam SM, Arendt J. Health in a 24-h society. *Lancet.* 2001;358(9286):999-1005. Epub 2001/10/05.
5. Guney M, Oral B, Karahan N, Mungan T. Regression of endometrial explants in a rat model of endometriosis treated with melatonin. *Fertility and sterility.* 2008;89(4):934-42. Epub 2007/06/22.
6. Markus RP, Santos JM, Zago W, Reno LA. Melatonin nocturnal surge modulates nicotinic receptors and nicotine-induced [3H]glutamate release in rat cerebellum slices. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics.* 2003;305(2):525-30. Epub 2003/02/28.
7. 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. *Pharmacological reviews.* 2003;55(2):325-95. Epub 2003/05/30.
8. CARVALHO WAL, L. Mecanismos celulares e moleculares da dor inflamatória. Modulação periférica e avanços terapêuticos. *Revista Brasileira de Anestesiologia.* 1998;48:137-58.
9. 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. *Journal of pineal research.* 2006;41(4):344-50. Epub 2006/10/04.
10. Reiter RJ, Tan DX, Terron MP, Flores LJ, Czarnocki Z. Melatonin and its metabolites: new findings regarding their production and their radical scavenging actions. *Acta biochimica Polonica.* 2007;54(1):1-9. Epub 2007/03/14.
11. SOARES JUNIOR JMH, F. S. and BARACAT, E. C. Melatonin and puberty: what is the evidence? *Rev Bras Ginecol Obstet.* 1998;30(10):483-5.
12. Zhang QY, Guan Q, Wang Y, Feng X, Sun W, Kong FY, et al. BDNF Val66Met polymorphism is associated with Stage III-IV endometriosis and poor in vitro fertilization outcome. *Hum Reprod.* 2012;27(6):1668-75. Epub 2012/03/27.
13. Cowansage KK, LeDoux JE, Monfils MH. Brain-derived neurotrophic factor: a dynamic gatekeeper of neural plasticity. *Current molecular pharmacology.* 2010;3(1):12-29. Epub 2009/12/25.
14. Kimpston J. The brain derived neurotrophic factor and influences of stress in depression. *Psychiatria Danubina.* 2012;24 Suppl 1:S169-71. Epub 2012/11/28.
15. Zhang XY, Chen da C, Xiu MH, Haile CN, Luo X, Xu K, et al. Cognitive and serum BDNF correlates of BDNF Val66Met gene polymorphism in patients with schizophrenia and normal controls. *Human genetics.* 2012;131(7):1187-95. Epub 2012/03/01.
16. Minichiello L, Calella AM, Medina DL, Bonhoeffer T, Klein R, Korte M. Mechanism of TrkB-mediated hippocampal long-term potentiation. *Neuron.* 2002;36(1):121-37. Epub 2002/10/09.
17. Shalev I, Lerer E, Israel S, Uzefovsky F, Gritsenko I, Mankuta D, et al. BDNF Val66Met polymorphism is associated with HPA axis reactivity to psychological stress characterized by genotype and gender interactions. *Psychoneuroendocrinology.* 2009;34(3):382-8. Epub 2008/11/08.
18. Onen Sertoz O, Tolga Binbay I, Koylu E, Noyan A, Yildirim E, Elbi Mete H. The role of BDNF and HPA axis in the neurobiology of burnout syndrome. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry.* 2008;32(6):1459-65. Epub 2008/06/11.
19. Alexander N, Osinsky R, Schmitz A, Mueller E, Kuepper Y, Hennig J. The BDNF Val66Met polymorphism affects HPA-axis reactivity to acute stress. *Psychoneuroendocrinology.* 2010;35(6):949-53. Epub 2010/01/19.
20. Naert G, Maurice T, Tapia-Arancibia L, Givalois L. Neuroactive steroids modulate HPA axis activity and cerebral brain-derived neurotrophic factor (BDNF) protein levels in adult male rats. *Psychoneuroendocrinology.* 2007;32(8-10):1062-78. Epub 2007/10/12.

21. Herman JP, Cullinan WE, Ziegler DR, Tasker JG. Role of the paraventricular nucleus microenvironment in stress integration. *The European journal of neuroscience*. 2002;16(3):381-5. Epub 2002/08/24.
22. Lacerte M, Shah RV. Interventions in chronic pain management. 1. Pain concepts, assessment, and medicolegal issues. *Archives of physical medicine and rehabilitation*. 2003;84(3 Suppl 1):S35-8. Epub 2003/04/24.
23. Berkley KJ, Rapkin AJ, Papka RE. The pains of endometriosis. *Science*. 2005;308(5728):1587-9. Epub 2005/06/11.
24. Abrao MS, Podgaek S, Filho BM, Ramos LO, Pinotti JA, de Oliveira RM. The use of biochemical markers in the diagnosis of pelvic endometriosis. *Hum Reprod*. 1997;12(11):2523-7. Epub 1998/01/22.
25. Sampson JA. Metastatic or Embolic Endometriosis, due to the Menstrual Dissemination of Endometrial Tissue into the Venous Circulation. *The American journal of pathology*. 1927;3(2):93-110 43. Epub 1927/03/01.
26. Burney RO, Giudice LC. Pathogenesis and pathophysiology of endometriosis. *Fertility and sterility*. 2012. Epub 2012/07/24.
27. Kennedy S, Bergqvist A, Chapron C, D'Hooghe T, Dunselman G, Greb R, et al. ESHRE guideline for the diagnosis and treatment of endometriosis. *Hum Reprod*. 2005;20(10):2698-704. Epub 2005/06/28.
28. Vercellini P, Trespidi L, De Giorgi O, Cortesi I, Parazzini F, Crosignani PG. Endometriosis and pelvic pain: relation to disease stage and localization. *Fertility and sterility*. 1996;65(2):299-304. Epub 1996/02/01.
29. Mackintosh W. Endometriosis. *InnovAit*. 2012;5:36-40.
30. Palma Dias R. BL, et al. Indicações e achados diagnóstico em laparoscopias diagnósticas no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. *Rev ATM*. 1995;1:11-6.
31. Tobias-Machado M, Di Giuseppe R, Barbosa CP, Borrelli M, Wroclawski ER. [Vesical endometriosis: diagnosis and therapeutic aspects]. *Rev Assoc Med Bras*. 2001;47(1):37-40. Epub 2001/05/08. Endometriose vesical: aspectos diagnosticos e terapeuticos.
32. Nunc He. Lesões endometrióticas na região do Fundo de saco de Douglas e no ligamento sacrouterino direito. In: Douglas_endometriose.jpg, editor. *Wikipedia: Hic et Nunc*; 2011. p. endometriotic lesions in the Douglas pouch and on the right sacrouterine ligament.
33. Garalejic E, Bojovic-Jovic D, Damjanovic A, Arsic B, Pantic I, Turjacanin-Pantelic D, et al. Hamilton anxiety scale (HAMA) in infertile women with endometriosis and its correlation with magnesium levels in peritoneal fluid. *Psychiatria Danubina*. 2010;22(1):64-7. Epub 2010/03/23.
34. Gupta S, Agarwal A, Krajcir N, Alvarez JG. Role of oxidative stress in endometriosis. *Reproductive biomedicine online*. 2006;13(1):126-34. Epub 2006/07/06.
35. Cunha Filho JSL. Endometriose. In: Freitas F, editor. *Rotinas em Ginecologia*. Porto Alegre: Artmed; 2011. p. 147-8.
36. Marques A, Bahamondes L, Aldrighi JM, Petta CA. Quality of life in Brazilian women with endometriosis assessed through a medical outcome questionnaire. *The Journal of reproductive medicine*. 2004;49(2):115-20. Epub 2004/03/17.
37. Tariverdian N, Theoharides TC, Siedentopf F, Gutierrez G, Jeschke U, Rabinovich GA, et al. Neuroendocrine-immune disequilibrium and endometriosis: an interdisciplinary approach. *Seminars in immunopathology*. 2007;29(2):193-210. Epub 2007/07/12.
38. Podgaek S. Padrões de resposta imune em pacientes com endometriose. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo; 2006.
39. Sharpe-Timms KL, Piva M, Ricke EA, Surewicz K, Zhang YL, Zimmer RL. Endometriotic lesions synthesize and secrete a haptoglobin-like protein. *Biology of reproduction*. 1998;58(4):988-94. Epub 1998/04/18.
40. Fulbrook P. Core temperature measurement in adults: a literature review. *Journal of advanced nursing*. 1993;18(9):1451-60. Epub 1993/09/01.
41. Christofolini DM, Teles JS, Vilarino FL, Andre GM, Bianco B, Barbosa CP. COMT polymorphism and the risk of endometriosis-related infertility. *Gynecological endocrinology : the official journal of the International Society of Gynecological Endocrinology*. 2011;27(12):1099-102. Epub 2011/04/19.

42. Zondervan K, Barlow DH. Epidemiology of chronic pelvic pain. *Bailliere's best practice & research Clinical obstetrics & gynaecology*. 2000;14(3):403-14. Epub 2000/08/30.
43. Reiter RC. A profile of women with chronic pelvic pain. *Clinical obstetrics and gynecology*. 1990;33(1):130-6. Epub 1990/03/01.
44. Wu MY, Ho HN. The role of cytokines in endometriosis. *Am J Reprod Immunol*. 2003;49(5):285-96. Epub 2003/07/12.
45. Na YJ, Yang SH, Baek DW, Lee DH, Kim KH, Choi YM, et al. Effects of peritoneal fluid from endometriosis patients on the release of vascular endothelial growth factor by neutrophils and monocytes. *Hum Reprod*. 2006;21(7):1846-55. Epub 2006/03/22.
46. Bonte H, Chapron C, Vieira M, Fauconnier A, Barakat H, Fritel X, et al. Histologic appearance of endometriosis infiltrating uterosacral ligaments in women with painful symptoms. *The Journal of the American Association of Gynecologic Laparoscopists*. 2002;9(4):519-24. Epub 2002/10/19.
47. Anaf V, Simon P, El Nakadi I, Fayt I, Simonart T, Buxant F, et al. Hyperalgesia, nerve infiltration and nerve growth factor expression in deep adenomyotic nodules, peritoneal and ovarian endometriosis. *Hum Reprod*. 2002;17(7):1895-900. Epub 2002/07/03.
48. Berkley KJ, Dmitrieva N, Curtis KS, Papka RE. Innervation of ectopic endometrium in a rat model of endometriosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(30):11094-8. Epub 2004/07/17.
49. Abbott JA, Hawe J, Clayton RD, Garry R. The effects and effectiveness of laparoscopic excision of endometriosis: a prospective study with 2-5 year follow-up. *Hum Reprod*. 2003;18(9):1922-7. Epub 2003/08/19.
50. Wright JA, Sharpe-Timms KL. Gonadotropin-releasing hormone agonist therapy reduces postoperative adhesion formation and reformation after adhesiolysis in rat models for adhesion formation and endometriosis. *Fertility and sterility*. 1995;63(5):1094-100. Epub 1995/05/01.
51. Olive DL. Optimizing gonadotropin-releasing hormone agonist therapy in women with endometriosis. *Treatments in endocrinology*. 2004;3(2):83-9. Epub 2005/03/04.
52. Seifer DB, Lambert-Messerlian G, Schneyer AL. Ovarian brain-derived neurotrophic factor is present in follicular fluid from normally cycling women. *Fertility and sterility*. 2003;79(2):451-2. Epub 2003/02/06.
53. Begliomini S, Casarosa E, Pluchino N, Lenzi E, Centofanti M, Freschi L, et al. Influence of endogenous and exogenous sex hormones on plasma brain-derived neurotrophic factor. *Hum Reprod*. 2007;22(4):995-1002. Epub 2007/01/26.
54. Monteleone P, Artini PG, Simi G, Cela V, Casarosa E, Begliomini S, et al. Brain derived neurotrophic factor circulating levels in patients undergoing IVF. *Journal of assisted reproduction and genetics*. 2007;24(10):477-80. Epub 2007/08/28.
55. Jensen T, Johnson AL. Expression and function of brain-derived neurotrophin factor and its receptor, TrkB, in ovarian follicles from the domestic hen (*Gallus gallus domesticus*). *The Journal of experimental biology*. 2001;204(Pt 12):2087-95. Epub 2001/07/07.
56. Seifer DB, Feng B, Shelden RM, Chen S, Dreyfus CF. Brain-derived neurotrophic factor: a novel human ovarian follicular protein. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2002;87(2):655-9. Epub 2002/02/12.
57. Kawamura K, Kawamura N, Mulders SM, Sollewijn Gelpke MD, Hsueh AJ. Ovarian brain-derived neurotrophic factor (BDNF) promotes the development of oocytes into preimplantation embryos. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(26):9206-11. Epub 2005/06/22.
58. Lee E, Jeong YI, Park SM, Lee JY, Kim JH, Park SW, et al. Beneficial effects of brain-derived neurotrophic factor on in vitro maturation of porcine oocytes. *Reproduction*. 2007;134(3):405-14. Epub 2007/08/22.
59. Szczepanska M, Kozlik J, Skrzypczak J, Mikołajczyk M. Oxidative stress may be a piece in the endometriosis puzzle. *Fertility and sterility*. 2003;79(6):1288-93. Epub 2003/06/12.
60. Jackson LW, Schisterman EF, Dey-Rao R, Browne R, Armstrong D. Oxidative stress and endometriosis. *Hum Reprod*. 2005;20(7):2014-20. Epub 2005/04/09.
61. Augoulea A, Mastorakos G, Lambrinoudaki I, Christodoulakos G, Creatsas G. The role of the oxidative-stress in the endometriosis-related infertility. *Gynecological endocrinology : the official*

- journal of the International Society of Gynecological Endocrinology. 2009;25(2):75-81. Epub 2009/03/03.
62. Borghese B, Vaiman D, Mondon F, Mbaye M, Anaf V, Noel JC, et al. [Neurotrophins and pain in endometriosis]. *Gynecologie, obstetrique & fertilité*. 2010;38(7-8):442-6. Epub 2010/06/29. Neurotrophines et douleur: etude d'expression et de correlation dans l'endometriose.
 63. Browne AS, Yu J, Huang RP, Francisco AM, Sidell N, Taylor RN. Proteomic identification of neurotrophins in the eutopic endometrium of women with endometriosis. *Fertility and sterility*. 2012;98(3):713-9. Epub 2012/06/22.
 64. Kerschensteiner M, Gallmeier E, Behrens L, Leal VV, Misgeld T, Klinkert WE, et al. Activated human T cells, B cells, and monocytes produce brain-derived neurotrophic factor in vitro and in inflammatory brain lesions: a neuroprotective role of inflammation? *The Journal of experimental medicine*. 1999;189(5):865-70. Epub 1999/03/02.
 65. Toma H, Winston JH, Micci MA, Li H, Hellmich HL, Pasricha PJ. Characterization of the neurotrophic response to acute pancreatitis. *Pancreas*. 2002;25(1):31-8. Epub 2002/07/20.
 66. Michael GJ, Averill S, Nitkunan A, Rattray M, Bennett DL, Yan Q, et al. Nerve growth factor treatment increases brain-derived neurotrophic factor selectively in TrkA-expressing dorsal root ganglion cells and in their central terminations within the spinal cord. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1997;17(21):8476-90. Epub 1997/10/23.
 67. Zhou J, Zhang F, Zhang Y. Corticosterone inhibits generation of long-term potentiation in rat hippocampal slice: involvement of brain-derived neurotrophic factor. *Brain research*. 2000;885(2):182-91. Epub 2000/12/05.
 68. Li Q, Zhang X, Liu K, Gong L, Li J, Yao W, et al. Brain-derived neurotrophic factor exerts antinociceptive effects by reducing excitability of colon-projecting dorsal root ganglion neurons in the colorectal distention-evoked visceral pain model. *Journal of neuroscience research*. 2012;90(12):2328-34. Epub 2012/08/30.
 69. Lin YT, Ro LS, Wang HL, Chen JC. Up-regulation of dorsal root ganglia BDNF and trkB receptor in inflammatory pain: an in vivo and in vitro study. *Journal of neuroinflammation*. 2011;8:126. Epub 2011/10/01.
 70. Tender GC, Li YY, Cui JG. Brain-derived neurotrophic factor redistribution in the dorsal root ganglia correlates with neuropathic pain inhibition after resiniferatoxin treatment. *The spine journal : official journal of the North American Spine Society*. 2010;10(8):715-20. Epub 2010/05/11.
 71. Lopes C, deLyra JL, Markus RP, Mariano M. Circadian rhythm in experimental granulomatous inflammation is modulated by melatonin. *Journal of pineal research*. 1997;23(2):72-8. Epub 1997/12/10.
 72. Lopes C, Mariano M, Markus RP. Interaction between the adrenal and the pineal gland in chronic experimental inflammation induced by BCG in mice. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society [et al]*. 2001;50(1):6-11. Epub 2001/03/10.
 73. Peres MF. Melatonin, the pineal gland and their implications for headache disorders. *Cephalalgia*. 2005;25(6):403-11. Epub 2005/05/25.
 74. Kandil TS, Mousa AA, El-Gendy AA, Abbas AM. The potential therapeutic effect of melatonin in Gastro-Esophageal Reflux Disease. *BMC Gastroenterol*. 2010;10:7. Epub 2010/01/20.
 75. Hussain SA, Al K, II, Jasim NA, Gorial FI. Adjuvant use of melatonin for treatment of fibromyalgia. *J Pineal Res*. 2011;50(3):267-71. Epub 2010/12/17.
 76. 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. *The journal of pain : official journal of the American Pain Society*. 2009;10(1):100-8. Epub 2008/11/18.
 77. Caumo W, Torres F, Moreira NL, Jr., Auzani JA, Monteiro CA, Londero G, et al. The clinical impact of preoperative melatonin on postoperative outcomes in patients undergoing abdominal hysterectomy. *Anesthesia and analgesia*. 2007;105(5):1263-71, table of contents. Epub 2007/10/26.
 78. Borazan H, Tuncer S, Yalcin N, Erol A, Otelcioglu S. 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(2):155-60. Epub 2010/02/27.

79. Mowafi HA, Ismail SA. Melatonin improves tourniquet tolerance and enhances postoperative analgesia in patients receiving intravenous regional anesthesia. *Anesth Analg.* 2008;107(4):1422-6. Epub 2008/09/23.
80. Yousaf F, Seet E, Venkatraghavan L, Abrishami A, Chung F. Efficacy and safety of melatonin as an anxiolytic and analgesic in the perioperative period: a qualitative systematic review of randomized trials. *Anesthesiology.* 2010;113(4):968-76. Epub 2010/09/09.
81. Mattson MP, Maudsley S, Martin B. BDNF and 5-HT: a dynamic duo in age-related neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends in neurosciences.* 2004;27(10):589-94. Epub 2004/09/18.
82. Lipsky RH, Marini AM. Brain-derived neurotrophic factor in neuronal survival and behavior-related plasticity. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 2007;1122:130-43. Epub 2007/12/14.
83. Hirsch-Rodriguez E, Imbesi M, Manev R, Uz T, Manev H. The pattern of melatonin receptor expression in the brain may influence antidepressant treatment. *Medical hypotheses.* 2007;69(1):120-4. Epub 2007/01/02.
84. Jimenez-Jorge S, Guerrero JM, Jimenez-Caliani AJ, Naranjo MC, Lardone PJ, Carrillo-Vico A, et al. Evidence for melatonin synthesis in the rat brain during development. *Journal of pineal research.* 2007;42(3):240-6. Epub 2007/03/14.
85. Niles LP, Armstrong KJ, Rincon Castro LM, Dao CV, Sharma R, McMillan CR, et al. Neural stem cells express melatonin receptors and neurotrophic factors: colocalization of the MT1 receptor with neuronal and glial markers. *BMC neuroscience.* 2004;5:41. Epub 2004/10/30.
86. Kong X, Li X, Cai Z, Yang N, Liu Y, Shu J, et al. Melatonin regulates the viability and differentiation of rat midbrain neural stem cells. *Cellular and molecular neurobiology.* 2008;28(4):569-79. Epub 2007/10/04.
87. Molteni R, Calabrese F, Pisoni S, Gabriel C, Mocaer E, Racagni G, et al. Synergistic mechanisms in the modulation of the neurotrophin BDNF in the rat prefrontal cortex following agomelatine administration. *The world journal of biological psychiatry : the official journal of the World Federation of Societies of Biological Psychiatry.* 2010;11(2):148-53. Epub 2010/01/30.
88. Jang SW, Liu X, Pradoldej S, Tosini G, Chang Q, Iuvone PM, et al. N-acetylserotonin activates TrkB receptor in a circadian rhythm. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2010;107(8):3876-81. Epub 2010/02/06.
89. Lane EA, Moss HB. Pharmacokinetics of melatonin in man: first pass hepatic metabolism. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* 1985;61(6):1214-6. Epub 1985/12/01.
90. Graham C, Cook MR, Kavet R, Sastre A, Smith DK. Prediction of nocturnal plasma melatonin from morning urinary measures. *Journal of pineal research.* 1998;24(4):230-8. Epub 1998/05/08.
91. Schernhammer ES, Rosner B, Willett WC, Laden F, Colditz GA, Hankinson SE. Epidemiology of urinary melatonin in women and its relation to other hormones and night work. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology.* 2004;13(6):936-43. Epub 2004/06/09.
92. Bojkowski CJ, Arendt J, Shih MC, Markey SP. Melatonin secretion in humans assessed by measuring its metabolite, 6-sulfatoxymelatonin. *Clin Chem.* 1987;33(8):1343-8. Epub 1987/08/01.
93. Hidalgo MP, Caumo W, Dantas G, Franco DG, Torres IL, Pezzi J, et al. 6-Sulfatoxymelatonin as a predictor of clinical outcome in depressive patients. *Human psychopharmacology.* 2011;26(3):252-7. Epub 2011/06/18.
94. Masruha MR, de Souza Vieira DS, Minetti TS, Cipolla-Neto J, Zukerman E, Vilanova LC, et al. Low urinary 6-sulphatoxymelatonin concentrations in acute migraine. *The journal of headache and pain.* 2008;9(4):221-4. Epub 2008/07/03.
95. Leone M, Lucini V, D'Amico D, Grazi L, Moschiano F, Fraschini F, et al. Abnormal 24-hour urinary excretory pattern of 6-sulphatoxymelatonin in both phases of cluster headache. *Cephalalgia : an international journal of headache.* 1998;18(10):664-7. Epub 1999/02/09.

7. ARTIGO EM INGLÊS

BDNF as a regulator factor of melatonin secretion in endometriosis-associated with chronic pelvic pain

Gislene Dalferth Costa¹; André Schwertner², Claudia C. Conceição dos Santos¹; Iraci L. S. Torres PharmD, PhD^{1,3}; Alicia Deitos; Andressa de Souza; João Sabino L. da Cunha Filho¹; *Wolnei Caumo MD, PhD^{1,2,3,4}; Izabel Cristina Custodio de Souza PhD^{1,2}.

¹Post Graduate Program in Medical Sciences, School of Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS),

²Laboratory of Pain & Neuromodulation at HCPA/UFRGS;

³Associate Professor, Pharmacology Department, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS, Brazil;

⁴Pain and Palliative Care Service at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

***Corresponding Author:**

Name: Wolnei Caumo MD, PhD

Department: Laboratory of Pain & Neuromodulation

Institution: Hospital de Clínicas de Porto Alegre at UFRGS

Mailing address: Rua Ramiro Barcelos, 2350 - CEP 90035-003 Bairro Rio Branco - Porto Alegre – RS.

Phone: (55) 51- 3359.8083

Fax: (55) 51- 3359.8083

Email: caumo@cpovo.net

ABSTRACT

The brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and melatonin turnover has been involved in the endometriosis-associated chronic pelvic pain (EACPP). We run this study to understand whether melatonin secretion, indexed by urinary 6-sulfatoxymelatonin (aMT6-s), is correlated with BDNF controlling to other factors such as tumor necrosis factor (TNF), interleukin 6 (IL-6), interleukin 10 (IL-10), cortisol or pain index. Twenty females, aged 18 to 45, with chronic pelvic pain and endometriosis diagnoses by videolaparoscopy, were analyzed. Differences in the temporal patterns of aMT6-s and salivary cortisol according to time-of-day intervals suggest that both presented physiological patterns of fluctuation. The dispersion of mean aMT6-s obtained every 6 h fitted a quadratic curve of polynomial regression accounting for 43% of the variance in the excretion profile. Increases of 1 ng/mL in serum BDNF led to a mean change in aMT6-s of -14.34 [confidence interval (CI) 95% (-24.09 to -4.59)] or vice versa, while increases of 1 ng/mL in serum TNF led to an increment of the mean aMT6-s excretion by 1.32 (CI 95%, 0.65 to 1.98). aMT6-s was not associated with interleukin (IL-6), interleukin (IL-10) or pain index. Therefore, we found that serum BDNF is inversely correlated with aMT6-s, while levels of serum TNF are positively correlated with aMT6-s. These findings demonstrated that the interaction and relations of BDNF and melatonin secretion in endometriosis are complex and that further longitudinal studies are needed to elucidate how these systems interact over a longer term.

Key words: melatonin; 6-sulfatoxymelatonin; BDNF; TNF; endometriosis.

INTRODUCTION

Endometriosis in the United States has an estimated prevalence that ranges from 2 to 50% [32]. It is an estrogen-dependent disease associated with chronic pelvic pain (EACPP) and infertility. Accordingly, previous experiments have shown that the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is involved in the regulation of many functions carried out by the hypothalamus-pituitary-adrenal (HPA) axis [28], as well as may have a role in the pathophysiology and pathogenesis of endometriosis [4, 5]. BDNF mRNA expression has been found in ovarian endometriomas and in ectopic endometrium in advanced stages of endometriosis [4, 5], and estrogen has been implicated in increases in BDNF during the estrous cycle [3]. Another way to explain the involvement of BDNF in endometriosis is through its involvement in inflammatory reactions [39], where its production is increased in response to pro-inflammatory interleukins. Together, these findings suggest that BDNF levels may constitute a neurobiological mechanism underlying EACPP.

The BDNF may be involved in endometriosis pathophysiology through its role in neuroendocrine control in conjunction with melatonin. Melatonin (N-acetyl-5-methoxytryptamine) plays an important role in the regulation of physiological functions, including those of the reproductive system [35]. In addition to identifying the systemic activity of melatonin, studies have shown the presence of melatonin receptors (MT1 and MT2) in follicles [35], which supports the hypothesis of its role in ovarian physiology.

Also, the BDNF's effects on different signaling pathways along the hypothalamic-pituitary-gonadal axis seem to reflect its intrinsic control over the reproductive system. Ovulation and inflammatory response are similar in their production of reactive oxygen species [10]. It seems that melatonin and the presence of BDNF in follicular fluid are related to the modulation of damage from reactive oxygen species [36] or other processes, such as mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways. Additionally, in an experimental study, BDNF induced the activation of N-Methyl-D-aspartate (NMDA) receptors in dorsal spinal horn neurons [14]. In another experiment, the neurotoxin mycotoxin 3-nitropropionic acid (3-NP) also increased BDNF and neuronal excitability; whereas

melatonin reversed this effect [37]. These results seem mixed, since in the case of intact cells, other investigators have found that melatonin increases the BDNF level [21, 29]. Thus, in this study we tested the hypothesis whether melatonin secretion, indexed by urinary 6-sulfatoxymelatonin (aMT6-s), is associated with BDNF in EACPP. To answer this question, we assessed the correlation between aMT6-s (outcome) and serum BDNF controlling to other factors such as tumor necrosis factor (TNF), interleukin (IL-6), interleukin (IL-10), cortisol and pain index.

METHODS

Patients

All patients provided written informed consent to participate in this cross-sectional study. It was approved by the Research Ethics Committee at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), and was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki. We recruited 20 patients, aged 18 to 45 years old, complaining of pelvic pain from the gynecology outpatient clinic at the HCPA and by newspaper advertisements. All patients had diagnoses of endometriosis confirmed by laparoscopic surgery in a pelvic pain investigation by the same investigator (JSLC). We excluded patients with diagnosed malignancies, uterine myomas, ovarian cysts and inflammatory pelvic disease, as well as those who were pregnant. Patients with histories of neurologic or oncologic disease, alcohol or other substance abuse in the past 6 months or a regular intake of antidepressants or anticonvulsants that could not be discontinued at least fifteen days prior to the start of the study were not included. Additionally, were excluded patients who were undergoing hormonal therapy or had irregular cycles.

Initially, we aimed to include 20 patients. Post-hoc sample size calculation shows that this sample size would detect an effect size (R^2) of 0.43 having three independent variables in the model, 80% statistical power level and 5% error.

Dependent and independent variables

The dependent variable was melatonin secretion indexed by aMT6-s. Serum BDNF was the independent variable of main interest.

Urine collection and determination of 6-sulfatoxymelatonin

The subjects were instructed to void their bladders upon rising in the morning and to collect all of their urine during the next 24 h, including the complete sample produced the next morning. The subjects were not required to void their bladders at exact times but noted the collection time such that the samples from each patient could later be grouped into specific periods. Each urine void was collected in a different vial (25-mL plastic containers), and all vials were collected from the patients' homes on the second morning and delivered to the laboratory. The aliquots from each patient were then pooled together according to the time of voiding: morning (06:00–12:00 h), afternoon (12:00–18:00 h), evening (18:00–24:00 h) and night (24:00–06:00 h); poured into a plastic bottle and centrifuged (2000 g, 5 min), and the supernatant was stored at -20 °C until assayed.

The concentration of aMT6-s in the pooled samples (divided into four periods as described previously) was determined by enzyme immunoassay (Bulhmann ELISA kit, Alpco Ltd, Windham, NH, USA) using a microtiter plate reader (450 nm, Micronal B-380). The total amount of aMT6-s excreted by each patient over 24 h was estimated by the sum of the concentrations determined in the 6-h intervals [16].

Serum collection and assays

Samples of blood were collected and centrifuged in plastic tubes for 10 min at 5000×g at 4 °C. Serum was obtained and frozen at -80 °C until assays were performed. The levels of biomarkers in blood serum samples were determined using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits, according to the manufacturer's instructions for BDNF (Chemicon/Millipore, catalog no. CYT306—

lower detection of 7.8 pg/mL), TNF (Invitrogen, catalog no. KHC3011—lower detection of 1.7 pg/mL), IL-6 (IBL International, catalog no. BE53061—lower detection limit of 0.92 pg/mL) and IL-10 (Invitrogen, catalog no. KHC0101—lower detection limit of 1 pg/mL).

Cortisol salivary level

Salivary samples were collected at 08:00 h, 16:00 h and 22:00 h by having participants chew on a cotton swab (Salivettes; Sarstedt, Numbrecht, Germany) for 30 seconds. Supernatants were then collected and stored at -20°C until assayed. Salivary cortisol was determined using an ELISA kit from DRG Instruments GmbH (Wiesbaden, Germany) and a Chiron Diagnostics ACS:180 analyzer (Bayer HealthCare Diagnostics, Tarrytown, NY, USA). The lower detection limit was 2.5 pg/mL, and the lower limit of detection was 0.4 nmol/L.

Pain, demographic characteristics and psychological state

Two independent medical examiners who were blind to the group assignments administered the pain scales and conducted psychological tests. All of the psychological tests used in this study were validated for the Brazilian population. Baseline depressive symptoms of the patients were assessed using the *Hamilton Depression Scale* [15], and sleep quality was assessed using the Pittsburgh Sleep Quality Index [6]. Psychiatric disorders were evaluated with the Structured Clinical Interview for DSM-IV Axis I Disorders (SCID-I) [23], and anxiety was measured using the refined version of the Rasch analysis of the State-Trait Anxiety Inventory (STAI) [18].

Pain index was constituted by a cumulative score measured on Visual Analog Scale (VAS) from zero (absence of pain) to 10-cm (worst pain) in these four questions: (i) How intense was your worst pain during the last 24 hours?; ii) How intense was your pain during your menstrual period?; iii) How intense was your pain during intercourse?; iv) How intense was your pain during defecation?; and v) How intense was your pain during urination?

The analgesic intake [acetaminophen, non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) or opioids] was also recorded.

Statistical analysis

For each time point, cortisol analyses were performed on each of the three separate cortisol measurements. We obtained data on the area under the curve (AUC) and a slope was calculated by fitting a linear regression line for each participant, which predicted cortisol values throughout the 24-hour interval.

To understand which variables would be critically involved with melatonin secretion as assessed by aMT6-s, we initially selected variables that would be associated with aMT6-s using Spearman's rank correlation coefficient (r_s). The dispersion of the mean of urinary 6-sulfatoxymelatonin obtained every 6 h was calculated by fitting a quadratic curve through polynomial regression, which predicted the 6-sulfatoxymelatonin-excretion profile throughout 24 h. Because of the within-subject correlation of repeated, longitudinal measurements, analysis of variance and ordinary least squares were invalid approaches to analyzing the data. To account for intercorrelations, we fitted a linear mixed-effects model (LME). In our model, the observational unit was the combination of subject and time point. Covariates, such as time point, BDNF, TNF and age, entered the model as fixed effects. For LME, mean differences were reported, and aMT6-s average curves were plotted to describe the adjusted effect of serum BDNF, TNF and age. LME was used to estimate urinary aMT6-s variations and salivary cortisol throughout the day. Bonferroni's test for post-hoc multiple comparisons was used to identify differences between each time point.

RESULTS

Patient characteristics

The clinical and demographic characteristics of the patients are shown in Table 1.

Cortisol salivary level

Using a LME model followed of Bonferroni's test, an effect of time was detected ($F = 4.51$; $P = 0.02$). Morning cortisol concentrations [19.22 ± 10.70 (ng/mL)] were significantly higher than afternoon [14.00 ± 7.74 (ng/mL)] and nighttime concentrations [13.32 ± 9.34 (ng/mL)], respectively.

Melatonin secretion assessed using urinary 6-sulfatoximelatonin

The Spearman's Rank Correlation between biomarkers and 6-sulfatoximelatonin excretion profile (ng/mg of creatinine) in the 24:00-to-6:00 interval (aMT6-s) was the following: IL-10 ($r_s = 0.15$), IL-6 ($r_s = 0.08$), cortisol salivary level (area under the curve) ($r_s = 0.15$), TNF ($r_s = 0.36$) and pain index ($r_s = 0.33$). Only the correlation between aMT6-s and BDNF was significant ($r_s = -0.55$ ($P < 0.001$)).

Figure 1 shows the dispersion of the mean aMT6-s excretion obtained every 6 h. Differences in the temporal pattern of the aMT6-s, according to the time-of-day intervals are presented in table 2. The model accounted for 43% of the variance across the aMT6-s excretion profile (ng/mg of creatinine) using 6-h intervals.

DISCUSSION

The present findings highlight that melatonin secretion is modulated negatively by BDNF and positively by TNF (Table 2). This relationship between BDNF and EACPP is plausible because this neurotrophin plays a major role in inflammatory pain and in central nociceptive modulation [26]. BDNF acts on central synapses of pain pathways [30] and it is upregulated in the dorsal horn following peripheral inflammation [20, 39]. Thus, the BDNF–trkB receptor system might provide a therapeutic target for chronic pain states with limited treatment options such as EACPP.

Although the explanation of inverse correlation between BDNF and aMT6-s is not clear, these findings support the hypothesis that they had a better control of their inflammatory condition. This hypothesis is supported by clinical evidences in which anti-TNF treatment was related to a down regulation of BDNF [12]. Accordingly, an over expression of neurotrophins may actually be involved in the modulation rather than the induction of inflammatory responses [25]. In this context, several lines of evidences support the involvement of BDNF in EACPP: *First*, reports that the hypothalamus and the anterior pituitary gland play important roles in the regulation of the reproductive system by melatonin [9]. Borghese et al. (2010) found overexpression of neurotrophins in all endometrial lesions [4] and other studies have shown that plasma BDNF levels change during the menstrual cycle and that their concentrations fall steadily after menopause [2, 27, 34]. Also, experiments involving gain or loss of function have shown that BDNF enhances steroidogenesis, folliculogenesis, early follicular development, polar body extrusion, and ovulation [17, 19, 22, 33]. *Second*, this hypothesis is supported by a recent report that BDNF polymorphism might increase risk for stage III–IV endometriosis and endometriosis-related infertility [41]. *Third*, we demonstrated in recent randomized clinical trials, that melatonin reduced the serum BDNF levels in endometriosis [40]. *Fourth*, since the BDNF serves as a molecular “sensor” for neuronal excitability and is involved in maladaptive neuroplasticity processes, there is a possibility that melatonin interrupts those responses. Thus, melatonin might prevent amplification of sensory signals to the pain matrix by neuronal, endocrinal and immune mechanisms [13].

Considering that macrophage-derived products, such as TNF, IL-1 β and IL-12 integrate this cascade of responses [1], it is possible that BDNF and melatonin have reciprocal mechanisms that auto-regulate their secretions under the influence of TNF. This is plausible because the melatonin anti-inflammatory effect could be due to anti-inflammatory activity at peripheral sites marked by inhibition of the release of pro-inflammatory cytokines [7, 31] and by the rolling and adhesion of neutrophils to the endothelial layer [24]. BDNF seems to be involved in inflammatory reactions [20, 39] and its production is increased in response to pro-inflammatory cytokines such as TNF.

The differences in the temporal patterns of aMT6-s according to the time-of-day intervals suggests that the melatonin secretion by the pineal gland is preserved. Although this pattern is disrupted by the increase of TNF in the initial phase of the inflammatory response [38], this effect on endocrine melatonin surge is transient. In chronic inflammatory conditions, occurs an increase the paracrine melatonin surge in immune-competent cells and astrocytes [8]. The paracrine melatonin surge is a possible physiological mechanism of shutting down of the inflammatory response. This is plausible because experimental and clinical data showed that melatonin reduces pro-inflammatory cytokines including IL-6, IL-8, and tumor necrosis factor TNF. Hence, melatonin improves the clinical course of illnesses which have an inflammatory etiology [11].

Although the design used in this study is not ideal for inferring a direct causal relationship, it permits us to investigate interactions among BDNF, melatonin secretion and TNF in patients with EACPP. In summary, we found that melatonin secretion is modulated negatively by BDNF—or vice versa—and positively by TNF. Several factors may explain these findings, such as the effects of estrogens on BDNF and melatonin secretion. Finally, the pathways by which endometriosis can be regulated are numerous, and the small number of subjects in this study can explain its low power for detecting some correlations, possibly resulting in type II error. Finally, these findings indicate that the interaction and relationship between BDNF and melatonin in endometriosis is complex and that further longitudinal studies are needed to elucidate how these systems interact over a long period of time.

Acknowledgements

This research was supported by grants from the following Brazilian agencies: the Committee for the Development of Higher Education Personnel – CAPES - PNPd/CAPES (for W.C. and I.C.C.S); the National Council for Scientific and Technological Development - CNPq (Dr. I.L.S. Torres, Dr. W. Caumo; and the Foundation for Support of Research at Rio Grande do Sul (FAPERGS).

References

- [1] A.L. Abbas, AH; Pillai, S, Cellular and Molecular Immunology, Elsevier Saunders, Philadelphia, 2012.
- [2] S. Begliuomini, E. Casarosa, N. Pluchino, E. Lenzi, M. Centofanti, L. Freschi, M. Pieri, A.D. Genazzani, S. Luisi, A.R. Genazzani, Influence of endogenous and exogenous sex hormones on plasma brain-derived neurotrophic factor, *Hum Reprod* 22 (2007) 995-1002.
- [3] M. Blurton-Jones, P.N. Kuan, M.H. Tuszynski, Anatomical evidence for transsynaptic influences of estrogen on brain-derived neurotrophic factor expression, *The Journal of comparative neurology* 468 (2004) 347-360.
- [4] B. Borghese, D. Vaiman, F. Mondon, M. Mbaye, V. Anaf, J.C. Noel, D. de Ziegler, C. Chapron, [Neurotrophins and pain in endometriosis], *Gynecologie, obstetrique & fertilité* 38 (2010) 442-446.
- [5] A.S. Browne, J. Yu, R.P. Huang, A.M. Francisco, N. Sidell, R.N. Taylor, Proteomic identification of neurotrophins in the eutopic endometrium of women with endometriosis, *Fertility and sterility* 98 (2012) 713-719.
- [6] D.J. Buysse, C.F. Reynolds, 3rd, T.H. Monk, S.R. Berman, D.J. Kupfer, The Pittsburgh Sleep Quality Index: a new instrument for psychiatric practice and research, *Psychiatry research* 28 (1989) 193-213.
- [7] S. Cuzzocrea, A.P. Caputi, Protective effect of melatonin on zymosan-induced cellular damage, *Biological signals and receptors* 8 (1999) 136-142.
- [8] S. da Silveira Cruz-Machado, L. Pinato, E.K. Tamura, C.E. Carvalho-Sousa, R.P. Markus, Glia-pinealocyte network: the paracrine modulation of melatonin synthesis by tumor necrosis factor (TNF), *PloS one* 7 (2012) e40142.
- [9] E. Diaz, M.L. Garidou, H. Dardente, A. Salingre, P. Pevet, V. Simonneaux, Expression and regulation of Icer mRNA in the Syrian hamster pineal gland, *Brain research. Molecular brain research* 112 (2003) 163-169.
- [10] L.L. Espey, Current status of the hypothesis that mammalian ovulation is comparable to an inflammatory reaction, *Biology of reproduction* 50 (1994) 233-238.
- [11] E. Esposito, S. Cuzzocrea, Antiinflammatory activity of melatonin in central nervous system, *Current neuropharmacology* 8 (2010) 228-242.
- [12] S. Forsgren, O. Grimsholm, T. Dalen, S. Rantapaa-Dahlqvist, Measurements in the Blood of BDNF for RA Patients and in Response to Anti-TNF Treatment Help Us to Clarify the Magnitude of Centrally Related Pain and to Explain the Relief of This Pain upon Treatment, *International journal of inflammation* 2011 (2011) 650685.
- [13] R.A. Garcia, S.C. Afeche, J.H. Scialfa, F.G. do Amaral, S.H. dos Santos, F.B. Lima, M.E. Young, J. Cipolla-Neto, Insulin modulates norepinephrine-mediated melatonin synthesis in cultured rat pineal gland, *Life sciences* 82 (2008) 108-114.

- [14] S.J. Geng, F.F. Liao, W.H. Dang, X. Ding, X.D. Liu, J. Cai, J.S. Han, Y. Wan, G.G. Xing, Contribution of the spinal cord BDNF to the development of neuropathic pain by activation of the NR2B-containing NMDA receptors in rats with spinal nerve ligation, *Experimental neurology* 222 (2010) 256-266.
- [15] M. Hamilton, A rating scale for depression, *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 23 (1960) 56-62.
- [16] M.P. Hidalgo, W. Caumo, G. Dantas, D.G. Franco, I.L. Torres, J. Pezzi, E. Elisabetsky, B.C. Detanico, A. Piato, R.P. Markus, 6-Sulfatoxymelatonin as a predictor of clinical outcome in depressive patients, *Human psychopharmacology* 26 (2011) 252-257.
- [17] T. Jensen, A.L. Johnson, Expression and function of brain-derived neurotrophin factor and its receptor, TrkB, in ovarian follicles from the domestic hen (*Gallus gallus domesticus*), *The Journal of experimental biology* 204 (2001) 2087-2095.
- [18] M.B. Kaipper, E. Chachamovich, M.P. Hidalgo, I.L. Torres, W. Caumo, Evaluation of the structure of Brazilian State-Trait Anxiety Inventory using a Rasch psychometric approach, *Journal of psychosomatic research* 68 (2010) 223-233.
- [19] K. Kawamura, N. Kawamura, S.M. Mulders, M.D. Sollewijn Gelpke, A.J. Hsueh, Ovarian brain-derived neurotrophic factor (BDNF) promotes the development of oocytes into preimplantation embryos, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (2005) 9206-9211.
- [20] M. Kerschensteiner, E. Gallmeier, L. Behrens, V.V. Leal, T. Misgeld, W.E. Klinkert, R. Kolbeck, E. Hoppe, R.L. Oropeza-Wekerle, I. Bartke, C. Stadelmann, H. Lassmann, H. Wekerle, R. Hohlfeld, Activated human T cells, B cells, and monocytes produce brain-derived neurotrophic factor in vitro and in inflammatory brain lesions: a neuroprotective role of inflammation?, *The Journal of experimental medicine* 189 (1999) 865-870.
- [21] X. Kong, X. Li, Z. Cai, N. Yang, Y. Liu, J. Shu, L. Pan, P. Zuo, Melatonin regulates the viability and differentiation of rat midbrain neural stem cells, *Cellular and molecular neurobiology* 28 (2008) 569-579.
- [22] E. Lee, Y.I. Jeong, S.M. Park, J.Y. Lee, J.H. Kim, S.W. Park, M.S. Hossein, Y.W. Jeong, S. Kim, S.H. Hyun, W.S. Hwang, Beneficial effects of brain-derived neurotropic factor on in vitro maturation of porcine oocytes, *Reproduction* 134 (2007) 405-414.
- [23] J. Lobbestael, M. Leurgans, A. Arntz, Inter-rater reliability of the Structured Clinical Interview for DSM-IV Axis I Disorders (SCID I) and Axis II Disorders (SCID II), *Clinical psychology & psychotherapy* 18 (2011) 75-79.
- [24] C.M. Lotufo, C. Lopes, M.L. Dubocovich, S.H. Farsky, R.P. Markus, Melatonin and N-acetylserotonin inhibit leukocyte rolling and adhesion to rat microcirculation, *European journal of pharmacology* 430 (2001) 351-357.
- [25] L. Manni, T. Lundeberg, P. Tirassa, L. Aloe, Role of cholecystokinin-8 in nerve growth factor and nerve growth factor mRNA expression in carrageenan-induced joint inflammation in adult rats, *Rheumatology (Oxford)* 41 (2002) 787-792.

- [26] A. Merighi, C. Salio, A. Ghirri, L. Lossi, F. Ferrini, C. Betelli, R. Bardoni, BDNF as a pain modulator, *Progress in neurobiology* 85 (2008) 297-317.
- [27] P. Monteleone, P.G. Artini, G. Simi, V. Cela, E. Casarosa, S. Begliuomini, F. Ninni, N. Pluchino, M. Luisi, A.R. Genazzani, Brain derived neurotrophic factor circulating levels in patients undergoing IVF, *Journal of assisted reproduction and genetics* 24 (2007) 477-480.
- [28] G. Naert, G. Ixart, L. Tapia-Arancibia, L. Givalois, Continuous i.c.v. infusion of brain-derived neurotrophic factor modifies hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity, locomotor activity and body temperature rhythms in adult male rats, *Neuroscience* 139 (2006) 779-789.
- [29] L.P. Niles, K.J. Armstrong, L.M. Rincon Castro, C.V. Dao, R. Sharma, C.R. McMillan, L.C. Doering, D.L. Kirkham, Neural stem cells express melatonin receptors and neurotrophic factors: colocalization of the MT1 receptor with neuronal and glial markers, *BMC neuroscience* 5 (2004) 41.
- [30] K. Obata, K. Noguchi, BDNF in sensory neurons and chronic pain, *Neuroscience research* 55 (2006) 1-10.
- [31] C.S. Pang, S.F. Tsang, J.C. Yang, Effects of melatonin, morphine and diazepam on formalin-induced nociception in mice, *Life sciences* 68 (2001) 943-951.
- [32] G. Scarselli, F. Rizzello, F. Cammilli, L. Ginocchini, M.E. Coccia, Diagnosis and treatment of endometriosis. A review, *Minerva ginecologica* 57 (2005) 55-78.
- [33] D.B. Seifer, B. Feng, R.M. Shelden, S. Chen, C.F. Dreyfus, Brain-derived neurotrophic factor: a novel human ovarian follicular protein, *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 87 (2002) 655-659.
- [34] D.B. Seifer, G. Lambert-Messerlian, A.L. Schneyer, Ovarian brain-derived neurotrophic factor is present in follicular fluid from normally cycling women, *Fertility and sterility* 79 (2003) 451-452.
- [35] J.M. Soares, Jr., M.I. Masana, C. Ersahin, M.L. Dubocovich, Functional melatonin receptors in rat ovaries at various stages of the estrous cycle, *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 306 (2003) 694-702.
- [36] H. Tamura, Y. Nakamura, A. Korkmaz, L.C. Manchester, D.X. Tan, N. Sugino, R.J. Reiter, Melatonin and the ovary: physiological and pathophysiological implications, *Fertility and sterility* 92 (2009) 328-343.
- [37] I. Tasset, E. Aguera, R. Olmo-Camacho, B. Escribano, F. Sanchez-Lopez, M.J. Delgado, A.H. Cruz, F. Gascon, E. Luque, J. Pena, I.M. Jimena, I. Tunez, Melatonin improves 3-nitropropionic acid induced behavioral alterations and neurotrophic factors levels, *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* 35 (2011) 1944-1949.
- [38] M.O. Tatsch-Dias, R.M. Levandovski, M.G. Rocha, P.A.C.M. Fernandes, I.S.L. Torres, M.P.L. Hidalgo, R.P. Markus, W. Caumo, The Concept of the Immune-Pineal Axis Tested in Patients Undergoing an Abdominal Hysterectomy, *NeuroImunology [in press]* (2013).
- [39] H. Toma, J.H. Winston, M.A. Micci, H. Li, H.L. Hellmich, P.J. Pasricha, Characterization of the neurotrophic response to acute pancreatitis, *Pancreas* 25 (2002) 31-38.

- [40] L.P. Vidor, I.L. Torres, I.C. de Souza, F. Fregni, W. Caumo, Analgesic and Sedative Effects of Melatonin in Temporomandibular Disorders: A Double-Blind, Randomized, Parallel-Group, Placebo-Controlled Study, *J Pain Symptom Manage* (2012).
- [41] Q.Y. Zhang, Q. Guan, Y. Wang, X. Feng, W. Sun, F.Y. Kong, J. Wen, W. Cui, Y. Yu, Z.Y. Chen, BDNF Val66Met polymorphism is associated with Stage III-IV endometriosis and poor in vitro fertilization outcome, *Hum Reprod* 27 (2012) 1668-1675.

Table 1. Characteristics of the sample and biomarkers levels (n = 20).

Characteristics	Mean ± SD or (%)
Age (years)	38.6 ± 6.03
Smoking (n / %)	3 (15%)
Clinical Comorbidity	7 (35%)
Hypertension	2 (10%)
Hypothyroidism	2 (10%)
Asthma	2 (10%)
Other	3 (15%)
Education (years)	10.2 ± 2.5
Endometriosis stage	
I	3 (15%)
II	3 (15%)
III	9 (45%)
IV	5 (25%)
Global pain functional index	10.3 ± 7.3
Pittsburgh Sleep Questionnaire	15.8 ± 8.2
Hamilton Depression Scale	17.9 ± 10.0
Psychiatric disease (SCID-I)	11 (55%)
Depression	7 (35%)
Anxiety	11 (55%)
Daily use of analgesics	17 (85%)
Acetaminophen/Dipirone	12 (60%)
NSAID	9 (45%)
Opioid	2 (10%)
Serum IL-10 (ng/L)	2.98 ± 1.13
Serum IL-6 (ng/L)	1.10 ± 0.43
Serum BDNF (pg/mL)	22.98 ± 8.09
Serum TNF (pg/mL)	11.92 ± 6.86
Salivary cortisol in the morning (ng/mL)	19.22 ± 10.70
Salivary cortisol in the afternoon (ng/mL)	14.00 ± 7.74
Salivary cortisol at night (ng/mL)	13.32 ± 9.34
Urinary 6-sulfatoximelatonin (ng/mg) 2400–0600 h	64.46 ± 44.46

Structured Clinical Interview for DSM-IV Axis I Disorders (SCID-I)

Table 2. Linear mixed-effects model estimates using fixed effects. Comparison between 6-h intervals over 24-h 6-sulfatoxymelatonin (aMT6-s) excretion (ng/mg of creatinine) profiles (n=20).

Fixed effect	Std.				
	Estimate	Error	T	P	95% CI
Intercept	111.56	17.22	6.47	0.001	(76.55 to 146.57)
6-sulfatoxymelatonin (ng/mg)					
06:01–12:00 h	-39.58	11.09	-3.57	0.001	(-62.34 to -16.82)
6-sulfatoxymelatonin (ng/mg)					
12:01–18:00 h	-54.62	10.06	-5.43	0.001	(-75.56 to -33.67)
6-sulfatoxymelatonin (ng/mg)					
18:01–24:00 h	-56.55	9.76	-5.79	0.001	(-77.04 to -36.08)
6-sulfatoxymelatonin (ng/mg)					
24:01–06:00 h	0(a)			.	.
BDNF serum level	-14.34	4.67	-3.07	0.006	(-24.09 to -4.59)
TNF serum level	1.32	0.32	4.18	0.001	(0.65 to 1.98)
Age (years)	-0.37	0.19	-1.94	0.067	(-0.77 to 0.03)

The intercept corresponds to the effect of the aMT6-s (ng/mg) 24:01–06:00-h interval, which is the comparator for all effects. Coefficients in these models are multiplicative rather than additive: e.g., the aMT6-s (ng/mg) coefficient of -56.55 for the interval 18:01–24:00 h corresponds to a decrease in mean aMT6-s compared with the interval 24:01–06:00 h.

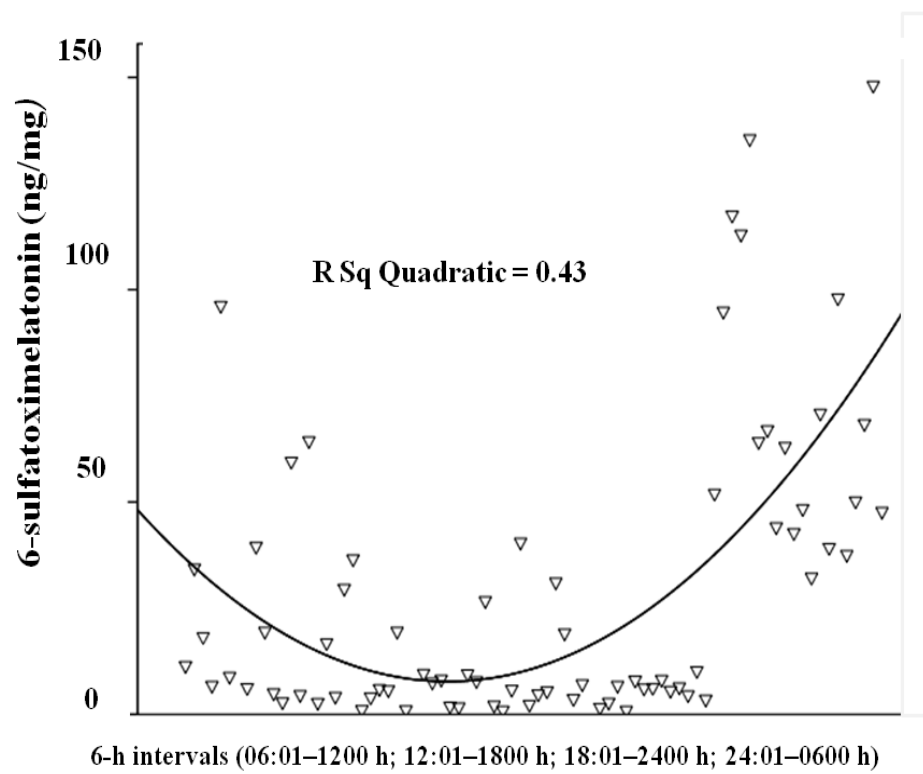


Figure 1. Quadratic curve from polynomial regression of 24-h 6-sulfatoxymelatonin (aMT6-s) excretion (ng/mg of creatinine) profiles to each 6-h interval ($n = 20$).

8. CONCLUSÕES

Este estudo transversal demonstrou que os níveis séricos de BDNF estão inversamente correlacionados com a secreção de melatonina, enquanto este metabólito está positivamente correlacionado com TNF sérico. Os níveis de aMT6 não estavam associados com as citocinas avaliadas ou com a intensidade da dor. Entretanto, a diferença no padrão temporal de variação em 24 horas de aMT6s e cortisol salivar de acordo com o período do dia sugere que ambos os eixos apresentaram um padrão fisiológico de flutuação. Esses achados demonstram que a interação entre BDNF e melatonina na endometriose é complexa e que estudos longitudinais posteriores são necessários para elucidar a interação entre esses sistemas em longo prazo. Estes dados nos permitem um avanço no conhecimento dos mecanismos fisiopatológicos da endometriose para investigar novas abordagens terapêuticas.

9. PERSPECTIVAS FUTURAS

A partir das evidências deste trabalho, o assunto nos instiga a maiores esclarecimentos do funcionamento dos sistemas envolvidos na fisiopatogenia da endometriose. Do mesmo modo, este estudo é um seguimento de pesquisas feitas anteriormente no grupo de pesquisa de Dor e Neuromodulação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Espera-se solidificar uma linha de pesquisa interdisciplinar que integre o estudo da cronopatologia de condições crônicas à resposta imunoinflamatória, possibilitando base teórica para futuros estudos. Além disso, contribuir com a pesquisa brasileira a fim de obter resultados significativos na formação de novos acadêmicos, mestres, doutores e pós-doutores.

ANEXOS

Anexo A – Consentimento Livre Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Título: CORRELAÇÃO ENTRE OS NÍVEIS DE 6-SULFATOXI-MELATONINA URINÁRIA E A GRAVIDADE DOS SINTOMAS NA ENDOMETRIOSE.

Número do protocolo: _____

Instituição: Hospital de Clínicas de Porto Alegre- HCPA

Pesquisador Responsável: Dr. Wolnei Caumo - 9981-3977 (Coordenador do grupo de cronofarmacologia, Dor e neuromodulação).

Comitê de pesquisa e Ética em saúde do HCPA: (51) 3359-8304

Nome da Paciente: _____

Responsável pela aplicação do TCLE: _____

Você está sendo convidado (a) a participar, se quiser, de um estudo denominado de:

Correlação entre os Níveis de 6-Sulfatoxi-Melatonina Urinária e a Gravidade dos Sintomas na Endometriose.

A sua participação é voluntária e caso decida não participar deste estudo, o seu atendimento clínico não será prejudicado.

Este Termo de Consentimento é elaborado em duas vias, sendo que uma ficará com a senhora.

1. OBJETIVOS DESSE ESTUDO

Correlacionar os Níveis de 6-Sulfatoxi-Melatonina Urinária e a Gravidade dos Sintomas na Endometriose.

2. EXPLICAÇÃO DOS PROCEDIMENTOS

A senhora participou do estudo Função do eixo imune-pineal na Endometriose e suas amostras de sangue, urina e saliva foram armazenadas e serão utilizadas neste projeto de pesquisa de dor por endometriose. Solicitamos a sua autorização para que essas amostras sejam armazenadas e para utilizá-las, posteriormente, em outros estudos aprovados pelo Comitê de Ética.

3. POSSÍVEIS RISCOS E DESCONFORTOS

A senhora terá o desconforto de vir assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

4. POSSÍVEIS BENEFÍCIOS DESTES ESTUDOS

Com esse estudo espera-se solidificar uma linha de pesquisa entre várias áreas que integre o estudo da cronopatologia de condições dolorosas crônicas e o eixo imune-pineal, avaliado por meio dos níveis urinários de 6-sulfatoximelatonina com os níveis de dor.

5. DIREITO DE DESISTÊNCIA

A Sr^a pode desistir de participar a qualquer momento. Suas decisões de não participar ou de deixar a pesquisa, depois de iniciada, não afetará seu atendimento posterior.

6. PRIVACIDADE

Todas as informações obtidas deste estudo poderão ser públicas com finalidades científicas, preservando os dados de identificação.

7. RESSARCIMENTO

A senhora não terá custos ao participar desta pesquisa.

8. 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.

() Sim, autorizo o armazenamento e a utilização das amostras de sangue, urina e saliva.

() Não, solicito que as amostras sejam descartadas.

Assinatura do paciente

Assinatura do pesquisador

Porto Alegre, de de 20__.

HCPA / GPPG
VERSÃO APROVADA
24 / JAN / 2011
100294 FRV

Anexo B – Questionário demográfico

CRONOFARMACOLOGIA E DOR – HCPA/CNPq (subárea 2.10.08.00-0)

Nome: _____ No banco: _____
 Data: _____ Entrevistador: _____ Testagem: _____



QUESTIONÁRIO DEMOGRÁFICO

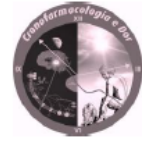
Fone Residencial: _____		Celular: _____		CEP: _____	
Profissão: _____		Situação funcional: <input type="checkbox"/> Ativa <input type="checkbox"/> Desempregada <input type="checkbox"/> Em benefício			
End.Comercial: _____		Fone Comercial: _____			
Caso não possa ser encontrado falar com (recado):					
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	Frequência de uso		Duração do uso:	
	Maconha				
	Haxixe				
	Cocaína				
	Crack				
	Alucinógenos (LSD, chá de cogumelo)				
	Solventes voláteis (Cola, Loló, Lança-perfume)				
	Anfetaminas (Hipofagin, Inibex, Ecstasy, Ritalina, Outras (especificar)				
12	Você tem alguma doença diagnosticada?	(1) Sim	(2) Não		
	Doença	(1) Sim	(2) Não		
	Hipertensão				
	Infarto				
	Insuficiência cardíaca				
	Diabetes				
	Doença da tireóide				
	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 valpróico	
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	(5) 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	

Anexo C – Diário de sono e de dor

CRONOFARMACOLOGIA E DOR – HCPA/CNPq (subárea 2.10.08.00-0)

Nome: _____ No banco: _____
 Data: _____ Entrevistador: _____ Testagem: _____



DIÁRIO DE SONO E DOR

Avalie o grau da dor **MAIS INTENSA QUE SENTIU NAS ÚLTIMAS 24h.**
 Marque claramente na linha com um traço vertical.

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

- Em que hora do dia a sua dor é pior? _____
- Tomou medicação analgésica para dor?
 Sim Não, 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.

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

PÉSSIMO **ÓTIMO**

- Comparando seu sono desta noite com o seu habitual, o desta noite foi:

PIOR **IGUAL** **MELHOR**

- A que horas você acordou hoje _____
- Como você se sentiu ao acordar?

MUITO BEM **MUITO MAL**

- Você dormiu a sesta ou cochilou durante o dia de ontem?

1. Sim 2. Não

Quantas vezes? _____ de que horas a que horas? _____

Anexo D – Diário de dor

CRONOFARMACOLOGIA E DOR – HCPA/CNPq (subárea 2.10.08.00-0)

Nome: _____ No banco: _____
 Data: _____ Entrevistador: _____ Testagem: _____



DIÁRIO DE DOR

Marque claramente na linha com um traço vertical.

O grau da dor **MAIS INTENSA QUE SENTIU NO DIA DE HOJE**

SEM DOR 0 _____ 10 PIOR DOR POSSÍVEL

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

Avalie o grau da dor **MAIS INTENSA nas seguintes situações:**

AO URINAR

Sem dor 0 _____ 10 Pior dor possível

AO EVACUAR?

Sem dor 0 _____ 10 Pior dor possível

DURANTE A RELAÇÃO SEXUAL

Sem dor 0 _____ 10 Pior dor possível

Durante o PERÍODO MENSTRUAL do último mês.

Sem dor 0 _____ 10 Pior dor possível

Anexo E – Escala de Pittsburg

CRONOFARMACOLOGIA E DOR – HCPA/CNPq (subárea 2.10.08.00-0)

Nome: _____ No banco: _____
 Data: _____ Entrevistador: _____ Testagem: _____



Questionário sobre Qualidade de Sono

As seguintes questões são relacionadas ao seu hábito de sono na maioria dos dias e noites do **último mês**. Suas respostas devem indicar o mais fielmente o que ocorreu na maioria dos dias e noites do último mês.

1. Durante o último mês, quantas vezes você teve problemas com seu sono, por que...	Nenhum episódio no último mês	Menos do que 1 vez na semana	1 ou 2 vezes na semana	3 ou mais vezes na semana
(a) ... não conseguiu pegar no sono durante 30 min	0	1	2	3
(b) ... acordou no meio da noite ou muito cedo pela manhã	0	1	2	3
(c) ... teve de ir ao banheiro	0	1	2	3
(d) ... Não conseguiu respirar direito	0	1	2	3
(e) ... Tosse ou ronco alto	0	1	2	3
(f) ... Sentiu muito frio	0	1	2	3
(g) ... sentiu muito calor	0	1	2	3
(h) ... Teve pesadelos	0	1	2	3
(i) ... Sentiu dor	0	1	2	3
(j) ... outro motivo Por favor descreva o motivo _____	0	1	2	3
2. Durante o mês passado, como você classificaria a qualidade do seu sono?	Não tem sido um grande problema = 0	Às vezes tem sido um problema pequeno = 1	Na maioria das vezes tem sido um problema = 2	Tem sido um grande problema = 3
3. Durante o mês passado, quantas vezes você...	Nenhum episódio no último mês	Menos do que 1 vez na semana	1 ou 2 vezes na semana	3 ou 4 vezes na semana
(a) ... Tomou remédio, chá devido ao seu problema de sono? Descrever o que tomou: _____	0	1	2	3
(b) ... Teve problema para ficar acordado enquanto dirigia, comia ou estava envolvido com atividades sociais?	0	1	2	3
4. Durante o último mês, quanto o seu problema de sono atrapalhou, diminuindo seu entusiasmo para fazer coisas?	Não tem sido um grande problema = 0	Às vezes tem sido um problema pequeno = 1	Na maioria das vezes tem sido um problema = 2	Tem sido um grande problema = 3

NUMERO: _____

Anexo F – Escala de Hamilton

CRONOFARMACOLOGIA E DOR – HCPA/CNPq (subárea 2.10.08.00-0)

Nome: _____ No banco: _____
 Data: _____ Entrevistador: _____ Testagem: _____



Escala de Depressão de Hamilton

Todos os itens devem ser preenchidos. Assinalar o número apropriado

<p>1. HUMOR DEPRIMIDO (Tristeza, desesperança, desamparo, inutilidade).</p> <p>0. Ausente</p> <p>1. Sentimentos relatados apenas ao ser inquirido.</p> <p>2. Sentimentos relatados espontaneamente com palavras.</p> <p>3. Comunica os sentimentos não com palavras, isto é, com a expressão facial, a postura, a voz e a tendência ao choro.</p> <p>4. Sentimentos deduzidos da comunicação verbal e não-verbal do paciente.</p> <p>2. SENTIMENTOS DE CULPA</p> <p>0. Ausente</p> <p>1. Auto-recriminação; sente que decepcionou os outros.</p> <p>2. Idéias de culpa ou ruminção sobre erros passados ou más ações.</p> <p>3. A doença atual é um castigo.</p> <p>4. Ouve vozes de acusação ou denúncia e/ou tem alucinações visuais ameaçadoras.</p> <p>3. SUICÍDIO</p> <p>0. Ausente.</p> <p>1. Sente que a vida não vale a pena.</p> <p>2. Desejaria estar morto ou pensa na probabilidade de sua própria morte.</p> <p>3. Idéias ou gestos suicidas.</p> <p>4. Tentativa de suicídio (qualquer tentativa séria, marcar 4).</p> <p>4. INSÔNIA INICIAL</p> <p>0. Sem dificuldades para conciliar o sono.</p> <p>1. Queixa-se de dificuldade ocasional para conciliar o sono, isto é, mais de meia hora.</p> <p>2. Queixa-se de dificuldade para conciliar o sono todas as noites.</p> <p>5. INSÔNIA INTERMEDIÁRIA</p> <p>0. Sem dificuldades.</p> <p>1. O paciente se queixa de inquietude e perturbação durante a noite.</p> <p>2. Acorda à noite - qualquer saída da cama marcar 2 (exceto para urinar).</p> <p>6. INSÔNIA TARDIA</p> <p>0. Sem dificuldades.</p> <p>1. Acorda de madrugada, mas volta a dormir</p> <p>2. Incapaz de voltar a conciliar o sono se deixar a cama.</p>	<p>12. SINTOMAS SOMÁTICOS GASTROINTESTINAIS.</p> <p>0. Nenhum</p> <p>1. Perda de apetite, mas alimenta-se voluntariamente. Sensações de peso no abdômen</p> <p>2. Dificuldade de comer se não insistirem. Solicita ou exige laxativos ou medicações para os intestinos ou para sintomas digestivos.</p> <p>13. SINTOMAS SOMÁTICOS EM GERAL</p> <p>0. Nenhum</p> <p>1. Peso nos membros, nas costas ou na cabeça. Dores nas costas, cefaléia, mialgias. Perda de energia e cansaço.</p> <p>2. Qualquer sintoma bem caracterizado e nítido, marcar 2.</p> <p>14. SINTOMAS GENITAIS</p> <p>Sintomas como: perda da libido, distúrbios menstruais</p> <p>0. Ausentes</p> <p>1. Leves</p> <p>2. Intensos</p> <p>15. HIPOCONDRIA</p> <p>0. Ausente</p> <p>1. Auto-observação aumentada (com relação ao corpo)</p> <p>2. Preocupação com a saúde</p> <p>3. Queixas freqüentes, pedidos de ajuda, etc.</p> <p>4. Idéias delirantes hipocondríacas.</p> <p>16. PERDA DE PESO (Marcar A ou B)</p> <p>A. Quando avaliada pela história clínica</p> <p>0. Sem perda de peso.</p> <p>1. Provável perda de peso associada à moléstia atual.</p> <p>2. Perda de peso definida (de acordo com o paciente)</p> <p>3. Não avaliada.</p> <p>B. Avaliada semanalmente pelo psiquiatra responsável, quando são medidas alterações reais de peso</p> <p>0. Menos de 0,5 Kg de perda por semana.</p> <p>1. Mais de 0,5 Kg de perda por semana.</p> <p>2. Mais de 1 Kg de perda por semana.</p> <p>3. Não avaliada.</p> <p>17. CONSCIÊNCIA</p> <p>0. Reconhece que está deprimido e doente.</p> <p>1. Reconhece a doença, mas atribui-lhe a causa à má alimentação, ao clima, ao excesso de trabalho, a vírus, à necessidade de repouso, etc.</p> <p>2. Nega estar doente.</p>
--	--

<p>7. TRABALHO E ATIVIDADES</p> <p>0. Sem dificuldades.</p> <p>1. Pensamento e sentimentos de incapacidade, fadiga ou fraqueza relacionada a atividades, trabalho ou passatempos.</p> <p>2. Perda de interesse por atividades (passatempos ou trabalho) quer diretamente relatada pelo paciente, quer indiretamente por desatenção, indecisão e vacilação (sente que precisa esforçar-se para o trabalho ou atividade).</p> <p>3. Diminuição do tempo gasto em atividades ou queda de produtividade. No hospital, marcar 3 se o paciente não passar ao menos 3 horas por dia em atividades externas (trabalho hospitalar ou passatempo).</p> <p>4. Parou de trabalhar devido à doença atual. No hospital, marcar 4 se o paciente não se ocupar com outras atividades, além de pequenas tarefas do leito, ou for incapaz de realizá-las sem ajuda.</p> <p>8. RETARDO (lentidão de idéias e fala; dificuldade de concentração; atividade motora diminuída)</p> <p>0. Pensamento e fala normais.</p> <p>1. Leve retardo a entrevista.</p> <p>2. Retardo óbvio à entrevista.</p> <p>3. Entrevista difícil.</p> <p>4. Estupor completo.</p> <p>9. AGITAÇÃO</p> <p>0. Nenhuma.</p> <p>1. Inquietude.</p> <p>2. Brinca com as mãos, com os cabelos, etc.</p> <p>3. Mexe-se, não consegue sentar quieto.</p> <p>4. Torce as mãos, rói as unhas, puxa os cabelos, morde os lábios.</p> <p>10. ANSIEDADE PSÍQUICA</p> <p>0. Sem dificuldade.</p> <p>1. Tensão e irritabilidade subjetivas.</p> <p>2. Preocupação com trivialidades.</p> <p>3. Atitude apreensiva aparente no rosto ou na fala.</p> <p>4. Medos expressos sem serem inquiridos.</p> <p>11. ANSIEDADE SOMÁTICA</p> <p>Concomitantes fisiológicos de ansiedade, tais como:</p> <p>Gastrointestinais: boca seca, flatulência, indigestão, diarreia, cólicas, eructação;</p> <p>Cardiovasculares: palpitações, cefaléia;</p> <p>Respiratórios: hiperventilação, suspiros;</p> <p>Frequência urinária;</p> <p>Sudorese</p> <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 33%;">0. Ausente</td> <td style="width: 33%;">1. Leve</td> <td style="width: 33%;">2. Moderada</td> </tr> <tr> <td>3. Grave</td> <td>4. Incapacitante</td> <td></td> </tr> </table>	0. Ausente	1. Leve	2. Moderada	3. Grave	4. Incapacitante		<p>18. VARIAÇÃO DIURNA</p> <p>A. Observar se os sintomas são piores pela manhã ou à tarde. Caso NÃO haja variação, marcar "nenhuma".</p> <p>0. Nenhuma</p> <p>1. Pior de manhã.</p> <p>2. Pior à tarde.</p> <p>B. Quando presente, marcar a gravidade da variação. Marcar "nenhuma" caso NÃO haja variação.</p> <p>0. Nenhuma.</p> <p>1. Leve</p> <p>2. Grave</p> <p>NOTA: Caso haja variação diurna, só a contagem referente à sua gravidade (1 ou 2 pontos no item 18B) é que deve ser incluída na contagem final. O item 18 A não deve ser computado.</p> <p>19. DESPERSONALIZAÇÃO E PERDA DE NOÇÃO DE REALIDADE</p> <p>Tais como: sensações de irrealidade, idéias niilistas</p> <p>0. Ausente</p> <p>1. Leve.</p> <p>2. Moderadas.</p> <p>3. Graves.</p> <p>4. Incapacitantes.</p> <p>20. SINTOMAS PARANÓIDES</p> <p>0. Nenhum.</p> <p>1. Desconfiança.</p> <p>2. Idéias de referência.</p> <p>3. Delírio de referência e perseguição.</p> <p>21. SINTOMAS OBSESSIVOS E COMPULSIVOS</p> <p>0. Nenhum.</p> <p>1. Leves.</p> <p>2. Graves.</p>
0. Ausente	1. Leve	2. Moderada					
3. Grave	4. Incapacitante						