



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA

Daniel Volquind

**Efeitos da melatonina sobre a inflamação e o estresse
oxidativo tecidual de pacientes submetidos à laparoscopia cirúrgica**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,
Campus de Botucatu, para obtenção
do título de Doutor em
Anestesiologia.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Antonio Vane

Coorientador: Prof. Dr. Pedro Thadeu Galvão Vianna

Botucatu
2016

Daniel Volquind

**Efeitos da melatonina sobre a inflamação e o estresse
oxidativo tecidual de pacientes submetidos à
laparoscopia cirúrgica**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,
Campus de Botucatu, para obtenção
do título de Doutor em
Anestesiologia.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Antonio Vane

Coorientador: Prof. Dr. Pedro Tadeu Galvão Vianna

Botucatu

2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Volquind, Daniel.

Efeitos da melatonina sobre a inflamação e o estresse oxidativo tecidual de pacientes submetidos à laparoscopia cirúrgica / Daniel Volquind. - Botucatu, 2016

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Luiz Antonio Vane

Coorientador: Pedro Thadeu Galvão Vianna

Capes: 40102130

1. Melatonina. 2. Peritônio. 3. Cirurgia laparoscópica.
4. Stress oxidativo. 5. Colecistectomia.

Palavras-chave: Colecistectomia laparoscópica; Estresse oxidativo; Melatonina; Peritônio .

Dedicatória

Dedico este estudo a todas as pessoas que possam crescer com os conhecimentos adquiridos através da sua leitura.

Agradecimento e Dedicatórias Especiais

Ao agradecer pela compreensão dos inúmeros momentos de ausência e dedicação a este estudo, dedico esta obra àquelas que considero as pessoas mais importantes da minha vida:

Márcia, minha esposa

Thiago, Thais e Lauren meus filhos

Meu muito obrigado pelo incentivo e pelo carinho!

Aos meus Pais

Pai e Mãe

Muito obrigado por me ensinarem os caminhos corretos e me darem os melhores exemplos.

Sem vocês nada disso seria possível.

Meu muito obrigado!

Agradecimento Especial

*Agradeço **Prof. Dr. Luiz Antonio Vane**, pela abertura das portas da Pós-Graduação em Anestesiologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, dando-me a oportunidade de realizar este estudo sob sua orientação, sempre indicando os passos a seguir, confortando nos momentos de angústia, auxiliando no que fora necessário e, acima de tudo, dando seu exemplo durante esta caminhada.*

Meu muito obrigado!

Agradecimentos

*Agradeço primeiramente a **Deus**, por iluminar meu caminho desde a alfabetização até a conclusão deste trabalho.*

Aos pacientes, que aceitaram participar deste estudo de forma voluntária em prol do crescimento da ciência médica.

*Aos médicos cirurgiões **Dr. Freddy Corrales**, **Dr. Walter P. Porto**, **Dra. Luciana T. Porto**, **Dr. Antônio Carlos Zanettini**, **Dr. Ronaldo Mattia**, **Dr. Rafael Lisot**, **Dr. Márcio Festugato**, **Dr. Flávio R. Mendes** e **Dr. Alexandre Cenatti**, que realizaram as cirurgias e as coletas de material necessário para o êxito deste estudo.*

*Ao médico patologista **Dr. Guilherme Portela Coelho** e aos técnicos do Laboratório Diagnóstico, pelo processamento das amostras teciduais utilizadas neste estudo.*

*À Farmacêutica **Flora B. M. Tonioli** e aos técnicos da Farmácia Bellafarma, pela randomização e preparo dos fármacos utilizados neste estudo.*

*Aos colegas anesthesiologistas **Roberto Taboada Fellini** e **Débora Nathalia Smidarle**, pela colaboração durante este estudo.*

*Aos funcionários do Programa de Pós-Graduação em Anestesiologia da Faculdade de Medicina de **Botucatu**, **UNESP**, pelas orientações necessárias.*

*Ao **Dr. Matheus Fachini Vane**, pela contribuição e revisão criteriosa deste estudo.*

À Profa. Dra. Maria Aparecida C. Domingues, pelas análises histopatológicas realizadas neste estudo.

Ao Prof. Dr. Pedro Thadeu Galvão Vianna pela orientação deste estudo.

À CAN - Clínica de Anestesiologia Ltda, pela estrutura disponibilizada para seleção dos pacientes.

*“A única maneira de fazer um ótimo trabalho é amando
aquilo que se faz”*

Steve Jobs

Abreviaturas e Símbolos

AMPC	Monofosfato cíclico de adenosina
ASA	<i>American Society of Anesthesiologists</i>
ATP	Trifosfato de adenosina
bat.min ⁻¹	Batimentos por minuto
Ca ²⁺	Íon calcio
CO ₂	Gás Carbônico
DNA	Ácido desoxiribonucleico
EROS	Espécies reativas de oxigênio
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
IL-1	Interleucina 1
IL- 6	Interleucina 6
I/R	Isquemia e reperfusão
kg	Kilograma
M	Molaridade
MDA	Malondialdeido
mg	Miligrama
mmHg	Milímetros de mercúrio
min	Minuto
MT1	Receptor para melatonina tipo 1
MT2	Receptor para melatonina tipo 2
MT3	Receptor para melatonina tipo 3
MTNR1A	Proteína codificadora do receptor 1 para melatonina
MTNR1B	Proteína codificadora do receptor 2 para melatonina
Na ²⁺	Íon sódio
O ₂ ⁻	Radical superóxido
OH ⁻	Radical hidroxil
ONOO ⁻	Peroxinitrito
pH	Potencial hidrogeniônico
µg	Micrograma
µm	Micrometro

Lista de Figuras

Figura 1	Síntese da Melatonina.....	22
Figura 2	Ações Antioxidantes da Melatonina.....	24
Figura 3	Seleção dos Pacientes.....	41

Lista de Tabelas

Tabela 1	Dados Demográficos e Gênero.....	43
Tabela 2	Intensidade das Variáveis Inflamatórias.....	43
Tabela 3	Tempo de Pneumoperitônio e Grau de Inflamação Tecidual.....	46
Tabela 4	Pressão Intra-abdominal e Grau de Inflamação Tecidual.....	47
Tabela 5	Pressão Arterial Sistólica nos diferentes momentos do estudo.....	50
Tabela 6	Pressão Arterial Diastólica nos diferentes momentos do estudo.....	51
Tabela 7	Pressão Arterial Média nos diferentes momentos do estudo.....	52
Tabela 8	Frequência Cardíaca nos diferentes momentos do estudo.....	53
Tabela 9	Saturação Periférica de Oxigênio nos diferentes momentos do estudo.....	54
Tabela 10	Fração Expirada de CO ₂ nos diferentes momentos do estudo.....	55

Lista de Gráficos

Gráfico 1	Média e desvio padrão da intensidade das variáveis inflamatórias representadas nas amostras de peritônio parietal de pacientes submetidos à laparoscopia cirúrgica em ambos os grupos estudados.....	43
Gráfico 2	Média, menor e maior valor do escore inflamatório representadas nas amostras de peritônio parietal de pacientes submetidos à laparoscopia cirúrgica em ambos os grupos estudados.....	45
Gráfico 3	Média e desvio padrão do tempo de pneumoperitônio e do grau de inflamação tecidual representadas nas amostras de peritônio parietal de pacientes submetidos à laparoscopia cirúrgica em ambos os grupos estudados.....	46
Gráfico 4	Média e desvio padrão da pressão intra-abdominal e do grau de inflamação tecidual representadas nas amostras de peritônio parietal de pacientes submetidos à laparoscopia cirúrgica em ambos os grupos estudados.....	47
Gráfico 5	Expressão de proteínas MTNR1A e MTNR1B representadas nas amostras de peritônio parietal de pacientes submetidos à laparoscopia cirúrgica em ambos os grupos estudados.....	49
Gráfico 6	Média e desvio padrão da pressão arterial sistólica nos diferentes momentos do estudo em ambos os grupos estudados.....	50
Gráfico 7	Média e desvio padrão da pressão arterial diastólica nos diferentes momentos do estudo em ambos os grupos estudados.....	51
Gráfico 8	Média e desvio padrão da pressão arterial média nos diferentes momentos do estudo em ambos os grupos estudados.....	52
Gráfico 9	Média e desvio padrão da frequência cardíaca nos diferentes momentos do estudo em ambos os grupos estudados.....	53

Gráfico 10	Média e desvio padrão da saturação periférica de oxigênio nos diferentes momentos do estudo em ambos os grupos estudados.....	54
Gráfico 11	Média e desvio padrão do CO ₂ expirado nos diferentes momentos do estudo em ambos os grupos estudados.....	55

Volquind D. Efeitos da melatonina sobre a inflamação e o estresse oxidativo tecidual de pacientes submetidos à laparoscopia cirúrgica. Botucatu, 2016. 108p. Tese (Doutorado em Anestesiologia) – Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP.

RESUMO

A melatonina foi isolada em 1958 e múltiplas funções desta molécula passaram a ser esclarecidas. As ações em receptores específicos de membrana, ligados à proteína G são responsáveis pelo controle do ciclo circadiano e do ritmo sazonal, no entanto a atividade como varredor dos radicais livres de oxigênio e outros mediadores do metabolismo oxidativo não são mediadas por receptores. A geração de EROS está diretamente ligada ao dano celular e tecidual, sendo a isquemia e a reperfusão (I/R), os mecanismos fisiopatológicos que mais contribuem para o desequilíbrio entre moléculas oxidantes e antioxidantes, resultando no estresse oxidativo. A insuflação da cavidade peritoneal com gás carbônico promove I/R causando desfechos deletérios ao paciente. Com o objetivo de estudar os efeitos da melatonina sobre a inflamação e o estresse oxidativo peritoneal e a expressão gênica das proteínas MTNR1A e MTNR1B entre os pacientes submetidos à laparoscopia cirúrgica, que receberam ou não a melatonina, foram randomizados 80 pacientes em 2 grupos de 40 pacientes cada para receber melatonina (GMEL) - 20mg via oral 12 horas antes e 1 hora antes do procedimento, respectivamente - e 40 pacientes para receber placebo (GPLA) - 12 horas antes e 1 hora antes do procedimento, respectivamente. Amostras de peritônio parietal foram coletadas 10 minutos após o início do pneumoperitônio e 3 minutos após o final do mesmo. A morfologia tecidual foi avaliada no exame histopatológico de lâminas coradas com hematoxilina-eosina para os parâmetros relacionados à inflamação e por meio de análise imuno-histoquímica para a expressão gênica das proteínas MTNR1A e MTNR1B. O GMEL apresentou redução estatisticamente significativa na intensidade das variáveis inflamatórias (IF, LP, CV e ED) quando comparado com o GPLA ($p = 0,001$). A expressão das proteínas MTNR1A e MTNR1B não mostraram diferenças entre os grupos estudados. O principal achado deste

estudo foi a redução nas variáveis inflamatórias estudadas, induzidas pela melatonina. Observou-se no grupo GMEL uma diminuição no grau de infiltrados inflamatórios nas biópsias peritoneais. Este achado permite inferir que houve também uma diminuição do estresse oxidativo. A administração exógena de melatonina não mostrou influência na expressão gênica das proteínas MTNR1A e MTNR1B. O presente estudo teve como principais limitações o não estudo das citocinas inflamatórias e dos marcadores envolvidos no estresse oxidativo. Entretanto, a atenuação induzida pela melatonina nas reações inflamatórias teciduais, observadas pela análise histopatológica, permite deduzir que a não realização destas análises pouco influenciariam na conclusão do estudo. Em conclusão, nas condições empregadas neste estudo, os resultados demonstram que a melatonina diminui a inflamação peritoneal, e potencialmente, o estresse oxidativo nos pacientes submetidos à laparoscopia cirúrgica, além de atenuar o grau de inflamação, de infiltração de células inflamatórias, de edema endotelial e congestão vascular no peritônio parietal destes pacientes. No entanto, a melatonina não modificou a expressão gênica das proteínas MTNR1A e MTNR1B nos pacientes submetidos à laparoscopia cirúrgica.

Palavras-chave: Melatonina, Estresse Oxidativo, Peritônio, Colectomia Laparoscópica

Volquind D. Effects of melatonin on oxidative stress and inflammation in tissue of patients undergoing surgical laparoscopy. Botucatu, 2016. 108p. Thesis (PhD degree in Anesthesiology) - Botucatu Medical School, UNESP.

ABSTRACT

Melatonin was isolated in 1958 and multiple functions of this molecule have been clarified. The actions on specific receptors of membrane, attached to the G protein-coupled receptors are responsible for the control of circadian and seasonal rhythm cycle, however the activity as free radical oxygen scavenger and other mediators of oxidative metabolism are not mediated by receptors. The generation of EROS is directly linked to cellular damage and tissue ischemia and reperfusion being (I/R), the pathophysiological mechanisms that contribute most to the imbalance between oxidants and antioxidants molecules, resulting in oxidative stress. The peritoneal cavity insufflation with carbon gas promotes I/R causing deleterious outcomes for the patient. In order to study the effects of melatonin on the peritoneal inflammation and oxidative stress and genic expression of the proteins MTNR1A and MTNR1B among patients undergoing surgical laparoscopy who received or not melatonin, 80 patients were randomized into 2 groups of 40 patients each to receive melatonin (GMEL) - 20 mg orally 12 hours before and 1 hour before the procedure, respectively -and 40 patients to receive placebo (GPLA) - 12 hours before and 1 hour before the procedure, respectively. Parietal peritoneum samples were collected 10 minutes after the beginning of the pneumoperitoneum and 3 minutes after the end of it. Tissue morphology was evaluated on histopathological examination of slides stained with hematoxylin-eosin for parameters related to inflammation and through immunohistochemistry analysis for protein expression of MTNR1A and MTNR1B. The presented statistically significant reduction in GMEL intensity of inflammatory variables (IF, LP, HP and ED) when compared with the GPLA ($p = 0.001$). The genic expression of MTNR1A and MTNR1B proteins show no differences between the groups. The main finding of this study was the reduction in inflammatory variables studied, induced by melatonin. It was observed in the GMEL a decrease in degree of

inflammatory infiltrates in peritoneal biopsies. This finding allows us to infer that there was also a decrease in oxidative stress. Exogenous melatonin administration showed no influence on genic expression of MTNR1A and MTNR1B proteins. The present study had as main limitations the study not of inflammatory cytokines and markers involved in oxidative stress. However, the melatonin induced attenuation in inflammatory tissue reactions, observed by histopathological analysis, allows to deduce that the non realization of these analyses little influence at the conclusion of the study. In conclusion, under the conditions employed in this study, the results show that melatonin decreases the peritoneal inflammation, and potentially, the oxidative stress in patients undergoing laparoscopy surgical, as well as mitigate the degree of inflammation, inflammatory cells infiltration, endothelial edema and vascular congestion in the parietal peritoneum of these patients. However, melatonin does not modify the genic expression of MTNR1A and MTNR1B proteins in patients undergoing surgical laparoscopy.

Key Words: Melatonin, Inflammation, Oxidative Stress, Peritoneum, Cholecystectomy laparoscopy

Sumário

LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE TABELAS	
LISTA DE GRÁFICOS	
RESUMO	
ABSTRACT	
1 Introdução.....	20
2 Objetivos.....	29
2.1 Geral.....	29
2.2 Específicos.....	29
3 Método.....	30
3.1 Grupos de Estudo.....	30
3.2 Randomização.....	31
3.3 Monitorização.....	32
3.4 Técnica Anestésica.....	33
3.5 Parametros Estudados.....	34
3.5.1 - Variáveis hemodinâmicas.....	34
3.5.2 - Variáveis ventilatórias.....	35
3.5.3 - Variáveis relacionadas ao pneumoperitônio.....	36
3.6 Coleta de Amostras.....	36
3.7 Análise Histológica.....	38
3.7.1 - Variáveis inflamatórias.....	39
3.7.2 - Variáveis de expressão proteica.....	39
3.8 Análise Estatística.....	40
3.8.1 - Cálculo Amostral.....	40
3.8.2 - Análise Estatística dos Dados.....	40
4. Resultados.....	41
4.1 Análise Morfológica Semi-quantitativa do Peritônio.....	44
4.2 Estudo Imuno-histoquímico para detecção de MTNR1A e MTNR1B.....	48
4.3 Variáveis Hemodinâmicas.....	50
4.4 Saturação Periférica de Oxigênio (SP) e Fração Expirada de Gás Carbônico (ET).....	54
5 Discussão.....	56
6 Conclusão.....	66
7 Referências.....	67
Anexos.....	72
Apêndice.....	89

1 Introdução

A identificação da melatonina no ano de 1958, pelo médico Aaron Lerner, após ser extraída da glândula pineal de bovinos (Lerner, Case e Takahashi et al., 1960) possibilitou o esclarecimento das propriedades desta molécula.

A presença da melatonina envolve mais de 2,5 bilhões de anos, já tendo sido encontrada em fósseis de bactérias como a *Rhodospirillum rubra* (Reiter, Tan e Galano, 2014). Supõe-se que sua função tenha sido a proteção contra agentes oxidantes gerados em um ambiente com concentrações crescentes de oxigênio e seus radicais livres.

A teoria que justifica a sobrevivência destes seres e a subsequente evolução das espécies, baseia-se na hipótese destas bactérias produtoras de melatonina terem sido fagocitadas por eucariotos, em um processo denominado endosimbiose, no qual elas teriam sido envolvidas dentro das mitocôndrias e retido a propriedade de produzir melatonina (Reiter, Tan e Galano, 2014). Isto indica que a melatonina recebeu muitas funções no curso da evolução da vida na Terra (Hardeland et al., 2011).

A melatonina não é uma molécula exclusiva do reino animal, ao contrário é ubíqua e presente em outras bactérias, eucariotos e plantas, nenhum dos quais possui glândula pineal. Alguns destes, por serem unicelulares, não possuem sequer tecido organizado, o que mostra a

capacidade de produção autônoma de melatonina (Reiter, Tan e Galano, 2014).

Após sua identificação estrutural, a melatonina foi relacionada a várias espécies e ligada à regulação do ciclo circadiano e ao ritmo sazonal, à função imune, à fisiologia da retina, à inibição tumoral e à ação antioxidante (Reiter, 2003).

Outros órgãos, também possuem a capacidade de produzir melatonina, uma vez que níveis elevados, mais altos que as concentrações séricas, foram detectados no fluido da câmara anterior do olho, no liquor e no fluido dos folículos ovarianos (Reiter, Tan e Fuentes-Broto, 2010). Isto sugere a produção de melatonina fora da glândula pineal ou o acúmulo contra um gradiente de concentração (Acuna-Castroviejo et al., 2014).

Originada da serotonina, a melatonina (n-acetil-5-metoxitriptamina) é formada após duas reações enzimáticas a partir do triptofano. A primeira, mediada pela N-acetiltransferase resulta na N-acetilserotonina, enquanto o segundo passo é a transferência de um grupo metil da S-adenosilmetionina para o grupo 5-hidroxi da N-acetilserotonina pela ação da hidroxindol-O-metiltransferase (Cardinali e Pevet, 1998) (Figura 1).

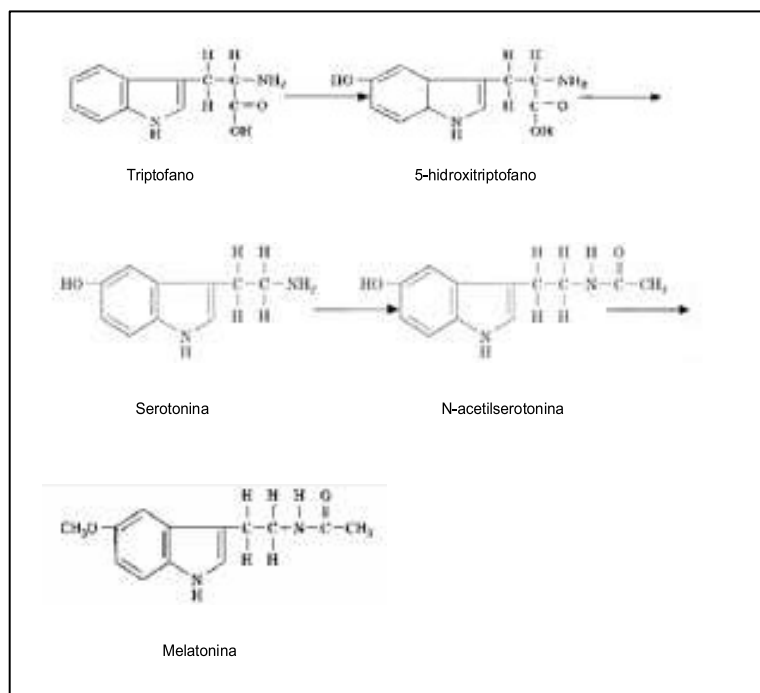


Figura 1 – Síntese da Melatonina (Adaptado de Cardinali e Pevet, 1998).

As ações da melatonina ocorrem em receptores de membrana largamente distribuídos em diversos tecidos (Pandi-Perumal et al., 2006; Jarratt, 2011).

Os receptores de membrana identificados como MT1 e MT2, são acoplados à proteína G, com sete domínios transmembrana, e o receptor MT3 é localizado no citosol de algumas células (Reiter, Tan e Fuentes-Broto, 2010). O receptor MT1 apresenta 350 aminoácidos, enquanto o MT2 consiste de 362 aminoácidos, apresentando 60% de homologia entre eles. Já o MT3 equivale a enzima quinona redutase 2, a qual é uma enzima de detoxificação (Reiter, Tan e Galano, 2014).

Os receptores apresentam diferenças em termos de afinidade por seu ligante natural, a melatonina. Após ligar-se, ativam os receptores de membrana e uma variedade de diferentes cascatas de segundos mensageiros.

O mecanismo pelo qual regulam os processos intracelulares é estabelecido via inibição da adenilciclase com a redução do AMPc e a modulação da atividade da proteína quinase A (Reiter, Tan e Fuentes-Broto, 2010). Estas ações estão fortemente ligadas a regulação do ciclo circadiano e do ritmo sazonal (Ackermann e Stehle, 2006).

Alguns efeitos da melatonina, no entanto, não podem ser explicados pelos receptores de membrana. Ações intracelulares por meio da interação da melatonina com receptores nucleares e proteínas intracelulares, tais como a calmodulina e as proteínas associadas à tubulina, bem como seus efeitos diretos e indiretos antioxidantes sobre os radicais livres, estão relacionados aos efeitos imunomoduladores deste hormônio (Claustrat, Brun e Chazot, 2005).

Além disso, ocorre a ação direta sobre diversos radicais hidroxil e outros derivados do oxigênio, promovendo a atividade antioxidante por atuar indiretamente em vias enzimáticas específicas (Claustrat, Brun e Chazot, 2005).

A melatonina promove o aumento dos níveis enzimáticos de diversas enzimas antioxidantes, como a superóxido desmutase, a glutathione peroxidase e a glutathione reductase. Outra ação relacionada ao mecanismo antioxidante é a inibição da enzima pró-oxidativa óxido nítrico sintetase (Claustrat, Brun e Chazot, 2005).

Além desta atividade indireta, a melatonina apresenta atuação direta no mecanismo de neutralização de espécies reativas de oxigênio (EROS) (Reiter, Tan e Galano, 2014) (Figura 2).

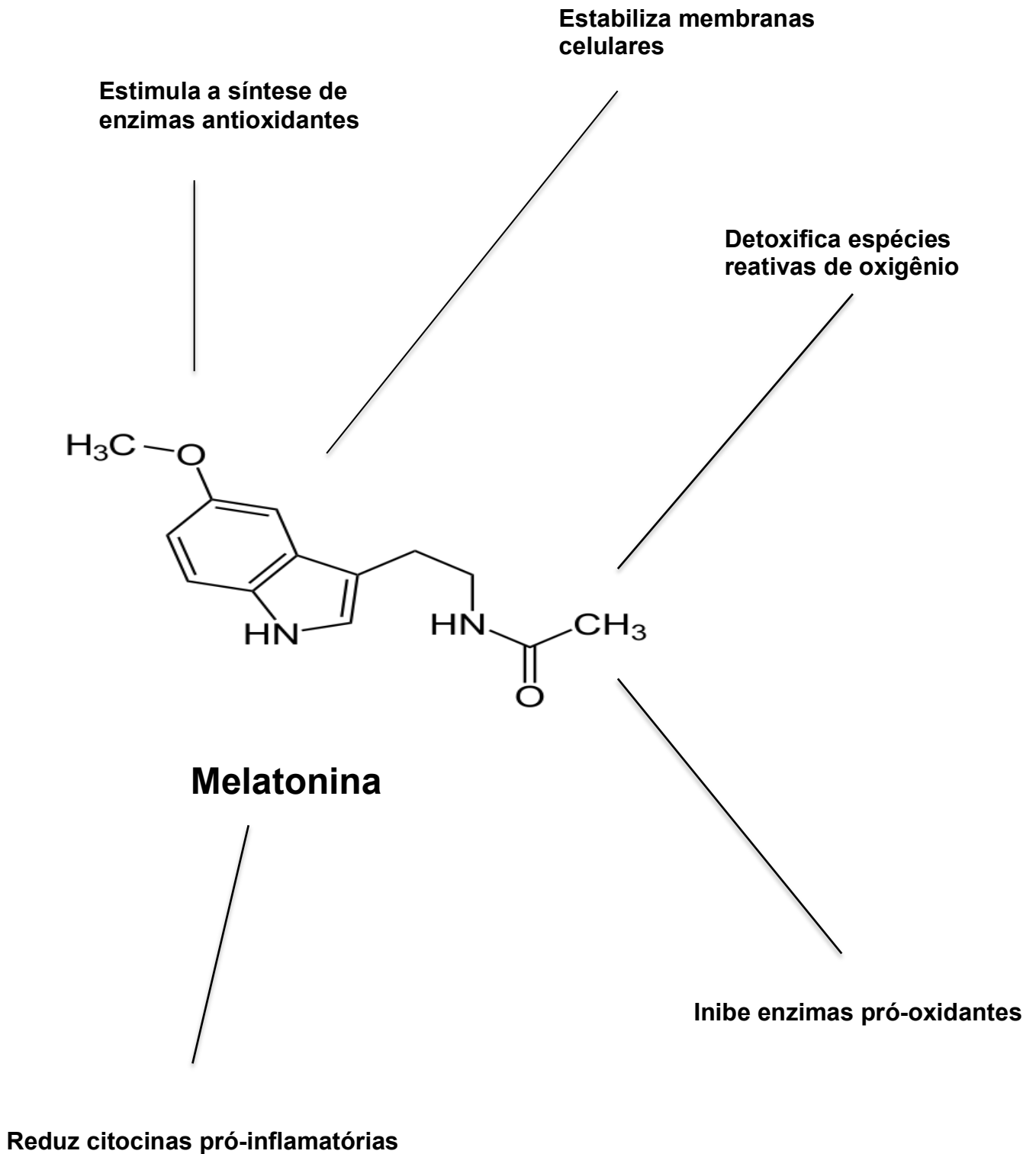


Figura 2 – Ações Antioxidantes da Melatonina

As EROS são moléculas com propriedades oxidativas, as quais em condições fisiológicas estabelecem um mecanismo de defesa para o hospedeiro frente as agressões inflamatórias. Estas espécies reativas são originadas como um produto do metabolismo celular, especificamente a partir de macrófagos e leucócitos polimorfonucleares, primariamente nas mitocôndrias (Chalhoub et al., 2011).

No aspecto bioquímico, as EROS contêm um número não pareado de elétrons na sua valência orbital, tornando-as altamente instáveis e reativas. Quando produzidas em excesso, promovem dano irreversível às moléculas intracelulares, incluindo lipídios, proteínas e DNA (Tomas-Zapico e Coto-Montes, 2005).

Com a função de promover proteção contra as EROS, as células desenvolveram um sistema de defesa antioxidante, o qual inclui mecanismos enzimáticos e não enzimáticos. As enzimas envolvidas na eliminação das EROS incluem aquelas cujos níveis são elevados pela melatonina.

Além deste mecanismo enzimático, a remoção de radicais livres, incluindo as EROS, é realizada diretamente pela melatonina por meio da transferência de elétrons (Hardeland, 2005).

A produção de EROS e as defesas antioxidantes devem estar em perfeito equilíbrio para evitar que a relação entre a formação de espécies reativas de oxigênio sobre a depuração seja desequilibrada.

A geração de EROS está diretamente ligada ao dano celular e tecidual, sendo a isquemia e a reperfusão (I/R), os mecanismos fisiopatológicos

que mais contribuem para o desequilíbrio entre moléculas oxidantes e antioxidantes (Kucukakin et al., 2009).

A isquemia gerada pela privação temporária de oxigênio aos tecidos, promove metabolismo anaeróbico, no qual diversos metabólitos são gerados e mediadores inflamatórios liberados nestes tecidos (Brokelman et al., 2011).

A liberação destes mediadores como as interleucinas, o fator de necrose tumoral alfa (FNT- α), sistema do complemento e EROS, os quais são uma reação fisiológica ao trauma cirúrgico, consiste em uma resposta inata do organismo, na qual, por meio desta ativação de sistemas celulares e humorais ocorre uma tentativa de restaurar os tecidos à condição pré-injúria (Medzhitov, 2008).

A resposta inflamatória, por sua vez, é um complexo processo de eventos que envolve o recrutamento de leucócitos, a ativação de células endoteliais, a interação entre leucócitos e o endotélio vascular, ativação de macrófagos teciduais, do sistema do complemento, da cascata de coagulação e do sistema fibrinolítico, das plaquetas e a liberação de proteases e EROS originados das células fagocíticas (Medzhitov, 2008; Thelen e Stein, 2008; Brokelman et al., 2011).

A intensidade da lesão tecidual determina a magnitude da resposta inflamatória e a repercussão da mesma, podendo inclusive levar à morte celular (Ni Choileain e Redmond, 2006).

No momento em que a circulação é restabelecida, estas substâncias são lançadas na circulação caracterizando o fenômeno de I/R. (Tan et al., 2005; Thelen e Stein, 2008; Sammour et al., 2009).

A I/R promove um aumento da resposta inflamatória ao trauma cirúrgico, recruta leucócitos pró-inflamatórios relacionados à injúria amplificando sua repercussão sistêmica e causando desfechos deletérios ao paciente. Os mediadores liberados passam a lesar células do hospedeiro consequente ao estresse oxidativo (Dalle-Donne, Rossi et al., 2006; Ryter et al., 2007).

Neste cenário tem sido proposta a introdução da melatonina, no período perioperatório, para que sejam estudadas as suas propriedades antioxidantes no estresse oxidativo gerados pelo fenômeno de I/R.

Vários modelos clínicos são propostos para estudar esta síndrome, no entanto, o pneumoperitônio artificial estabelecido com gás carbônico (CO₂) durante os procedimentos laparoscópicos apresenta alterações inflamatórias relacionadas ao trauma cirúrgico, à diminuição do fluxo sanguíneo e, conjuntamente, a síndrome de I/R esplâncnica (Schafer e Krahenbuhl, 2001; Cay et al., 2006).

A cavidade abdominal é delimitada por tecido mesotelial, que cobre a parede da mesma e a superfície visceral, definida como peritônio (Nagy e Jackman, 1998). O peritônio, como um tecido, apresenta múltiplas funções biológicas: regulação da angiogênese, da fibrinólise, da inflamação e o remodelamento tecidual (Brokelman et al., 2011).

O trauma cirúrgico e a exposição do peritônio ao CO₂ promovem lesão mesotelial, na qual ocorre a descamação celular com o surgimento de áreas desnudas e a liberação de mediadores inflamatórios (Volz et al., 1999; van der Wal e Jeekel, 2007). A liberação de prostaglandinas, prostaciclina,

interleucinas, óxido nítrico, EROS (Caumo et al., 2007), fatores de crescimento e moléculas da matriz extracelular, além de produtos da cascata da coagulação demonstram que o peritônio é um tecido metabolicamente ativo e substrato para o estresse oxidativo (Mutsaers, 2002).

Nas cirurgias laparoscópicas, a cavidade peritoneal é insuflada com CO₂, elevando a pressão intra-abdominal e determinando alterações nos sistemas cardiovascular, respiratório, renal, gastrointestinal, neurológico e imunológico (Perrin e Fletcher, 2004). O aumento da pressão intra-abdominal, durante o pneumoperitônio, promove isquemia esplâncnica e após a desinsuflação do mesmo, ocorre a reperfusão deste compartimento anatômico, caracterizando um modelo de I/R (Arsalani-Zadeh et al., 2011).

A maior consequência da I/R esplâncnica é o desequilíbrio entre as moléculas oxidantes (Caumo et al., 2007) e as antioxidantes, gerando o estresse oxidativo. (Ozmen et al., 2009; Sammour et al., 2009; Yiannakopoulou et al., 2013).

As ações da melatonina, como antioxidante sobre as EROS, têm causado muito interesse em diversas áreas da medicina (Altun e Ugur-Altun, 2007). Sobretudo em anestesiologia, estas ações têm sido estudadas principalmente naquelas situações em que se estabelece a situação fisiopatológica de I/R.

Embasado no exposto, hipotetizamos que a melatonina, um varredor de radicais livres, possa atenuar o processo inflamatório e o estresse oxidativo tecidual em pacientes submetidos à laparoscopia cirúrgica.

2 Objetivos

2.1 Primário

Estudar os efeitos da melatonina sobre a inflamação e o estresse oxidativo peritoneal em pacientes submetidos à laparoscopia cirúrgica.

2.2 Secundários

- Comparar o grau de inflamação, infiltração de neutrófilos, linfócitos, edema endotelial e congestão vascular no peritônio parietal nos pacientes que fizeram ou não uso de melatonina.
- Comparar a expressão gênica das proteínas MTNR1A e MTNR1B entre os pacientes que receberam ou não a melatonina.

3 Método

Após a aprovação pela Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital Pompéia em Caxias do Sul (ANEXO 1), Rio Grande do Sul, sob o parecer consubstanciado número 31/2011, juntamente com o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO 2), realizou-se o presente estudo delineado de modo randomizado, duplo cego e placebo controlado. Este estudo foi unicêntrico e realizado no Hospital Pompéia, durante o período compreendido entre março e dezembro de 2013, de forma ininterrupta.

Foram recrutados pacientes candidatos a colecistectomia laparoscópica eletiva e que preenchiam os critérios de inclusão: ASA I ou II, maiores de 18 anos, não obesos, sem doença inflamatória sistêmica em atividade, não imunossuprimidos por fármacos ou por doenças, não gestantes, sem história de alergia prévia aos fármacos utilizados no estudo e que não estivessem na vigência de colecistite aguda ou outra infecção.

3.1 Grupos de Estudo

Foram constituídos dois grupos de estudo a saber:

Grupo Melatonina (GMEL) – 40 pacientes receberam a melatonina na dose de 20 mg via oral 12 horas e 1 hora antes do procedimento cirúrgico, respectivamente.

Grupo Placebo (GPLA) – 40 pacientes receberam o placebo nos mesmos horários descritos.

Os pesquisadores, os pacientes e os cirurgiões foram cegos para os grupos de pacientes e para medicação administrada como pré-anestésico. Os grupos somente foram identificados após a realização da análise estatística.

3.2 Randomização

Os pacientes foram randomizados em 2 grupos para receber melatonina ou placebo. A randomização simples foi realizada por meio do preparo de 80 frascos plásticos, brancos, idênticos, rotulados como melatonina e marcados com etiquetas vermelhas (40 frascos) e etiquetas azuis (40 frascos) nas suas tampas. Os frascos com a etiqueta vermelha receberam 4 cápsulas de placebo, cuja composição foi dióxido de silício 0,5%, celulose mucocristalina 15%, estearato de magnésio 1%, talco 9%, e amido 74% (ANEXO 3). Os frascos com a etiqueta azul receberam 4 cápsulas de melatonina (Melatonin – Nature's Bounty® - USA todos dentro do período de validade) contendo 10 mg cada (ANEXO 4). As cápsulas contendo placebo ou melatonina foram idênticas na sua cor, forma e tamanho (ANEXO 5). Os 80 frascos identificados por cores foram colocados em um recipiente plástico preto e misturados (ANEXO 6). Este processo foi realizado por uma técnica em farmácia. Uma segunda técnica em farmácia, não participante do processo anterior e cega para a codificação de cores, retirou aleatoriamente um frasco de cada vez do recipiente escuro, retirou a etiqueta vermelha ou azul, e colou a mesma ao lado do número contido em uma lista de 1 a 80. Formando assim

uma distribuição aleatória de cores ao lado de cada número (ANEXO 7). Os frascos sem as etiquetas coloridas foram numerados de 1 a 80 (ANEXO 8) e disponibilizados ao pesquisador sem identificação que diferenciasse o conteúdo de cada um. Todos apresentavam o rótulo idêntico. O processo de preparo e randomização foi supervisionado por uma farmacêutica, que manteve sob sua guarda a listagem da distribuição aleatória das cores. Ao final da coleta de dados, a mesma entregou ao pesquisador, em envelope lacrado, a distribuição aleatória com as respectivas cores.

O pesquisador recebeu os 80 frascos numerados e contidos em caixa adequada para armazenamento (ANEXOS 9 e 10).

Os frascos foram entregues aos pacientes de forma consecutiva e sequencial de acordo com a seleção dos mesmos para o estudo. Durante a consulta de avaliação pré-anestésica, o pesquisador verificou se o paciente apresentava os critérios para inclusão no mesmo. Em ato contínuo, foi apresentado o termo de consentimento livre e esclarecido, após consentimento e assinatura do mesmo, foi entregue o frasco numerado, orientando como deveriam ser ingeridas as cápsulas no período pré-operatório (ANEXO 11).

3.3 Monitorização

Os pacientes foram monitorizados com eletrocardiograma contínuo na derivação DII, medida não invasiva da pressão arterial, saturação periférica de oxigênio (S_pO_2), capnografia, capnometria, monitorização do bloqueio neuromuscular, pressão intra-abdominal e tempo do pneumoperitônio.

Após a venóclise com dispositivo intravenoso, todos os pacientes receberam solução fisiológica 0,9% para reposição hídrica perioperatória.

Antes da indução da anestesia, o pesquisador confirmou se o paciente havia feito uso da medicação entregue durante a consulta pré-anestésica. Caso não houvesse sido utilizada a medicação, o paciente seria excluído do estudo.

3.4 Técnica Anestésica

A técnica anestésica foi a anestesia geral balanceada utilizando-se para indução venosa o propofol na dose de $1,5 \text{ mg.kg}^{-1}$. A analgesia foi realizada por via venosa contínua utilizando-se o cloridrato de remifentanila na dose entre $0,2 - 0,25 \text{ } \mu\text{g.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$. O bloqueio neuromuscular foi estabelecido pelo brometo de rocurônio por via venosa na dose $0,6 \text{ mg.kg}^{-1}$ e doses intermitentes de acordo com a necessidade observada por meio de monitorização do bloqueio neuromuscular na dose $0,15 \text{ mg.kg}^{-1}$. A anestesia foi mantida pela via inalatória por meio do anestésico sevoflurano com concentrações entre 2 - 3%, diluídos em oxigênio e ar comprimido à 60% / 40%. Vinte minutos antes do término da cirurgia, os pacientes receberam metadona na dose de $0,1 \text{ mg.kg}^{-1}$ via subcutânea para analgesia de transição antes do término da infusão de remifentanila.

3.5 Parâmetros Estudados

Os parâmetros clínicos monitorizados foram distribuídos de acordo com a suas classes e registrados em diferentes momentos (M):

3.5.1 - Variáveis hemodinâmicas

- FC0 – Frequência cardíaca na avaliação pré-anestésica
- FC1 - Frequência cardíaca pré-indução anestésica
- FC2 - Frequência cardíaca pós – indução anestésica
- FC3 - Frequência cardíaca 10 minutos após iniciar o pneumoperitônio (isquemia)
- FC4 - Frequência cardíaca após desfazer o pneumoperitônio (reperfusão – 3 minutos após desfazer o pneumoperitônio)
- PAS0- Pressão arterial sistólica na avaliação pré-anestésica
- PAS1- Pressão arterial sistólica pré-indução anestésica
- PAS2- Pressão arterial sistólica pós-indução anestésica
- PAS3- Pressão arterial sistólica 10 minutos após iniciar o pneumoperitônio (isquemia)
- PAS4- Pressão arterial sistólica após o término do pneumoperitônio (reperfusão – 3 minutos após desfazer o pneumoperitônio)

- PAD0- Pressão arterial diastólica na avaliação pré-anestésica
- PAD1- Pressão arterial diastólica pré-indução anestésica
- PAD2- Pressão arterial diastólica pós-indução anestésica
- PAD3- Pressão arterial diastólica 10 minutos após iniciar o pneumoperitônio (isquemia).
- PAD4- Pressão arterial diastólica após o término do pneumoperitônio (reperfusão – 3 minutos após desfazer o pneumoperitônio).
- PAM1- Pressão arterial média pré-indução anestésica
- PAM2- Pressão arterial média pós-indução anestésica
- PAM3- Pressão arterial média 10 minutos após iniciar o pneumoperitônio (isquemia).
- PAM4- Pressão arterial média após o término do pneumoperitônio (reperfusão – 3 minutos após desfazer o pneumoperitônio).

3.5.2 - Variáveis Ventilatórias

- ET2- CO₂ expirado pós-indução anestésica
- ET3- CO₂ expirado 10 minutos após iniciar o pneumoperitônio (isquemia).

- ET4- CO₂ expirado após o término do pneumoperitônio (reperfusão – 3 minutos após desfazer o pneumoperitônio).
- SP1- Saturação periférica de oxigênio pré-indução anestésica
- SP2- Saturação periférica de oxigênio pós-indução anestésica
- SP3- Saturação periférica de oxigênio 10 minutos após iniciar o pneumoperitônio (isquemia).
- SP4- Saturação periférica de oxigênio após o término do pneumoperitônio (reperfusão – 3 minutos após desfazer o pneumoperitônio).

3.5.3 - Variáveis relacionadas ao pneumoperitônio

- PP3 – pressão intra-abdominal 10 minutos após iniciar o pneumoperitônio medida em mmHg representa a fase de isquemia.
- TP – tempo de pneumoperitônio medido em minutos (duração da isquemia)

Estes parâmetros foram registrados em formulários padronizados individuais para todos os pacientes (ANEXO 12).

3.6 Coleta de Amostras

As coletas de amostras do peritônio ocorreram em duas fases distintas: dez minutos após o início do pneumoperitônio e 3 minutos após o

final do mesmo. Os dois fragmentos de peritônio parietal coletados pelo cirurgião, por meio de corte a frio, foram imediatamente armazenados em frascos transparentes, individuais, contendo formol a 10% tamponado, num volume de pelo menos nove vezes superior ao tamanho do fragmento, identificados com o nome do paciente.

As amostras de peritônio, devidamente acondicionadas, foram encaminhadas para o laboratório anátomo-patológico, onde foram processadas. Este processo foi realizado por técnicos do laboratório e supervisionado por um médico patologista. Para cada amostra foi emitido um código e anotado ao lado do número correspondente ao do frasco que o paciente recebeu com a medicação (ANEXOS 13 e 14).

O material após processado (confecção de blocos em parafina e lâminas coradas pela técnica de hematoxilina-eosina) foi encaminhado para o Departamento de Patologia, Hospital das Clínicas, UNESP, Botucatu, onde foram obtidas secções de 3µm de espessura montadas em lâminas adesivas (Instrumedics Inc ®, Hackensack, NJ). Em seguida, as lâminas passaram por processo de desparafinização em xilol, seguido por etanol absoluto, como preparo para a hidratação em água corrente. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado em solução de peróxido de hidrogênio a 3%, durante 10 min, em temperatura ambiente. Para a etapa de recuperação antigênica, as lâminas foram imersas em tampão citrato 0,01M, pH 6,0 e colocadas em câmara pressurizada (Pascal, DakoCytomation, Dinamarca) por 3 min. As lâminas foram dispostas em bandejas especiais e receberam os anticorpos primários diluídos em albumina bovina sérica 1%, permanecendo incubados *overnight*.

As reações foram realizadas utilizando o anticorpo MTNR1A (Rabbit Polyclonal - Abnova) e MTNR1B (Rabbit Polyclonal - Abnova). Em seguida, foram aplicados os anticorpos secundários, seguidos do polímero de detecção, por 30 min cada um (HiDef Detection TM, HRP System, 954D-30, Cell Marque, Rocklin, CA, USA). Para a etapa de revelação, foi utilizada solução de 3,3 diaminobenzidina (DAB Dako Cytomation, K3468) por 5 min, e a contra coloração foi feita com hematoxilina de Harris. Os cortes foram desidratados em etanol com graduações crescentes (60%, 65%, 95% e 100%) e diafanizados em xilol, sendo as lâminas, por fim, montadas em resina sintética (Permount, FISHER SP, 15-500) (ANEXO 15). Na leitura das reações foram considerados os critérios de intensidade e extensão da imunomarcação, da seguinte maneira: A) intensidade, variando de 0 a 3 (onde 0 = marcação nula, 1 = fraca, 2 = moderada, 3 = forte), e B) extensão, variando de 0 a 3 (onde 1 = até 1/3 do core, 2 = de 1/3 a 2/3 do core, 3 = acima de 2/3 do core).

3.7 Análise Histológica

A morfologia tecidual foi avaliada no exame histopatológico de lâminas coradas com hematoxilina-eosina.

Os parâmetros da análise histopatológica foram descritos como:

3.7.1 - Variáveis inflamatórias

- IF - Reação inflamatória apresentada no fragmento de tecido (peritônio parietal), na qual 0 = marcação nula, 1 = fraca, 2 = moderada, 3 = forte
- LP - Infiltração celular linfocítica e plasmocitária graduada em 0 = marcação nula, 1 = fraca, 2 = moderada, 3 = forte
- N - Infiltração de neutrófilos graduada em 0 = marcação nula, 1 = fraca, 2 = moderada, 3 = forte
- CV - Congestão Vascular graduada em 0 = marcação nula, 1 = fraca, 2 = moderada, 3 = forte
- ED – Edema endotelial graduado em 0 = marcação nula, 1 = fraco, 2 = moderado, 3 = forte

3.7.2 - Variáveis de expressão proteica

- MR1A – Expressão gênica da proteína MTNR1A graduada em 1 = até 1/3 do core, 2 = de 1/3 a 2/3 do core, 3 = acima de 2/3 do core
- MR1B – Expressão gênica da proteína MTNR1B graduada em 1 = até 1/3 do core, 2 = de 1/3 a 2/3 do core, 3 = acima de 2/3 do core

A descrição e contagem das alterações teciduais foram consideradas como sendo consequentes ao estresse oxidativo.

3.8 Análise Estatística

3.8.1 Cálculo Amostral

Devido à escassez de estudos em humanos que avaliam a lesão morfológica decorrente do pneumoperitônio, principalmente no que diz a respeito a incidência de inflamação peritoneal, optou-se pela realização de um estudo piloto com 10 indivíduos submetidos à colecistectomia videolaparoscópica e coleta de biopsia peritoneal. Destes indivíduos, 9 apresentaram alguma evidência de inflamação peritoneal pela histologia ao término do procedimento. Presumindo uma melhora de 30% na incidência de inflamação peritoneal pelo uso de melatonina, utilizando um poder de 80% e limite aceitável de 5% de erro tipo 1 (p) chegou-se ao cálculo amostral de 38 pacientes por grupo. Assim, optou-se por iniciar o estudo com 40 pacientes por grupo, considerando possíveis perdas no transcorrer do estudo.

3.8.2 – Análise Estatística dos Dados

A análise estatística para os dados de escores inflamatórios foram analisados usando a Distribuição de Poisson (para dados de contagem) em um modelo linear generalizado. Os dados não paramétricos foram analisados usando o teste de Mann-Whitney. As análises dos dados, nos diferentes momentos do estudo, foram realizadas usando o teste ANOVA para sua comparação entre os grupos. Valores com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

O *software* utilizado para a análise estatística foi o SPSS versão 22.0.

4 Resultados

Nenhum paciente apresentou complicações perioperatórias relacionadas à cirurgia ou à anestesia, obtendo alta hospitalar de acordo com as diretrizes descritas para o procedimento cirúrgico realizado.

Foram recrutados para serem incluídos no estudo noventa e dois pacientes, no entanto, doze pacientes foram excluídos devido a um paciente apresentar lúpus eritematoso sistêmico, três pacientes apresentarem artrite reumatoide, seis pacientes serem usuários crônicos de corticoide, uma paciente ser gestante e uma paciente não aceitar ser incluída no estudo (Figura 3).

As amostras de peritônio parietal foram impróprias para a análise em 6 pacientes, 3 em cada grupo, restando 74 pacientes no total.

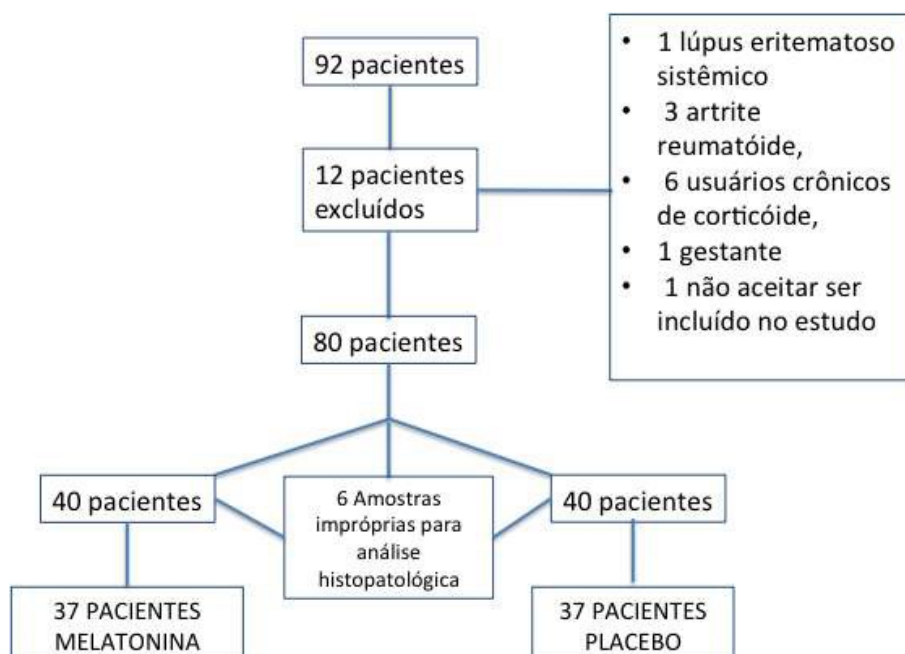


Figura 3 – Seleção dos pacientes.

Analisamos os dados de 74 pacientes, sendo 37 do grupo placebo (GPLA) e 37 do grupo melatonina (GMEL), onde 32% (n = 23) dos pacientes foram do sexo masculino e 68% (n = 51) dos pacientes foram do sexo feminino. Não houve diferenças demográficas entre os grupos estudados (Tabela 1).

Tabela 1 – Dados Demográficos e Sexo

	GPLA (n = 37)	GMEL (n = 37)	p
Idade (anos)*	46,2 ± 7,8	44,4 ± 15,3	0,545
Sexo**			
Masc	13	10	0,454
Fem	24	27	
Peso (kg)*	78,0 ± 12,3	74,0 ± 12,0	0,108
ASA**			
I	15	18	0,486
II	22	19	

* Valores expressos em media e desvio padrão

** Valores expressos em distribuição de frequência

O GMEL apresentou redução estatisticamente significativa na intensidade das variáveis inflamatórias (IF, LP, CV e ED) quando comparado com o GPLA ($p = 0,001$) (Tabela 2, Gráfico 1).

Tabela 2 – Intensidade das Variáveis Inflamatórias

	IF	LP	CV	ED	p
GPLA	1,3 ± 0,6	1,3 ± 0,6	1,9 ± 0,6	1,8 ± 0,5	0,001
GMEL	0,5 ± 0,3	0,5 ± 0,3	1,0 ± 0,4	0,8 ± 0,5	

IF- Reação inflamatória apresentada no fragmento de tecido (peritônio parietal)

LP- Infiltração celular linfocítica e plasmocitária

CV- Congestão vascular

ED- Edema endotelial

Valores expressos em media e desvio padrão

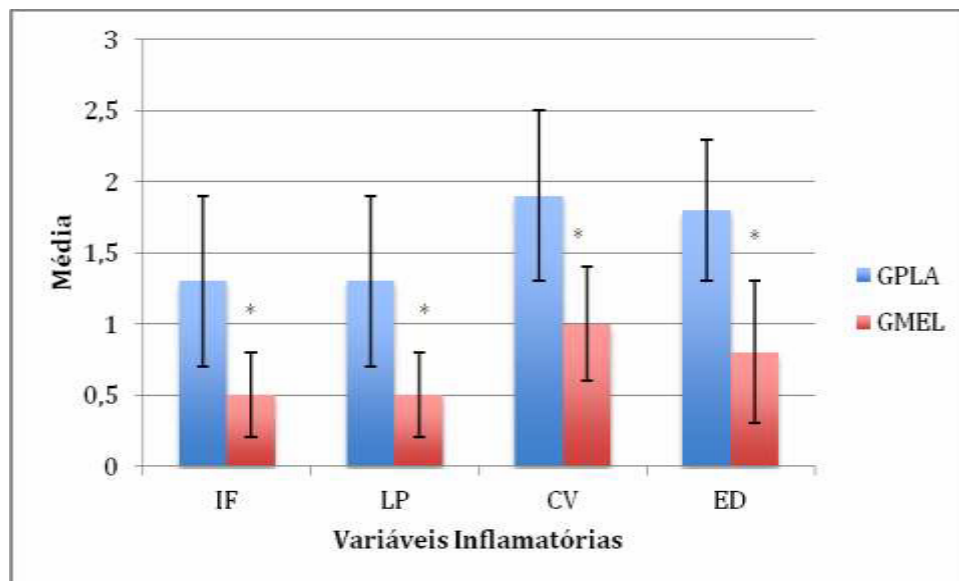
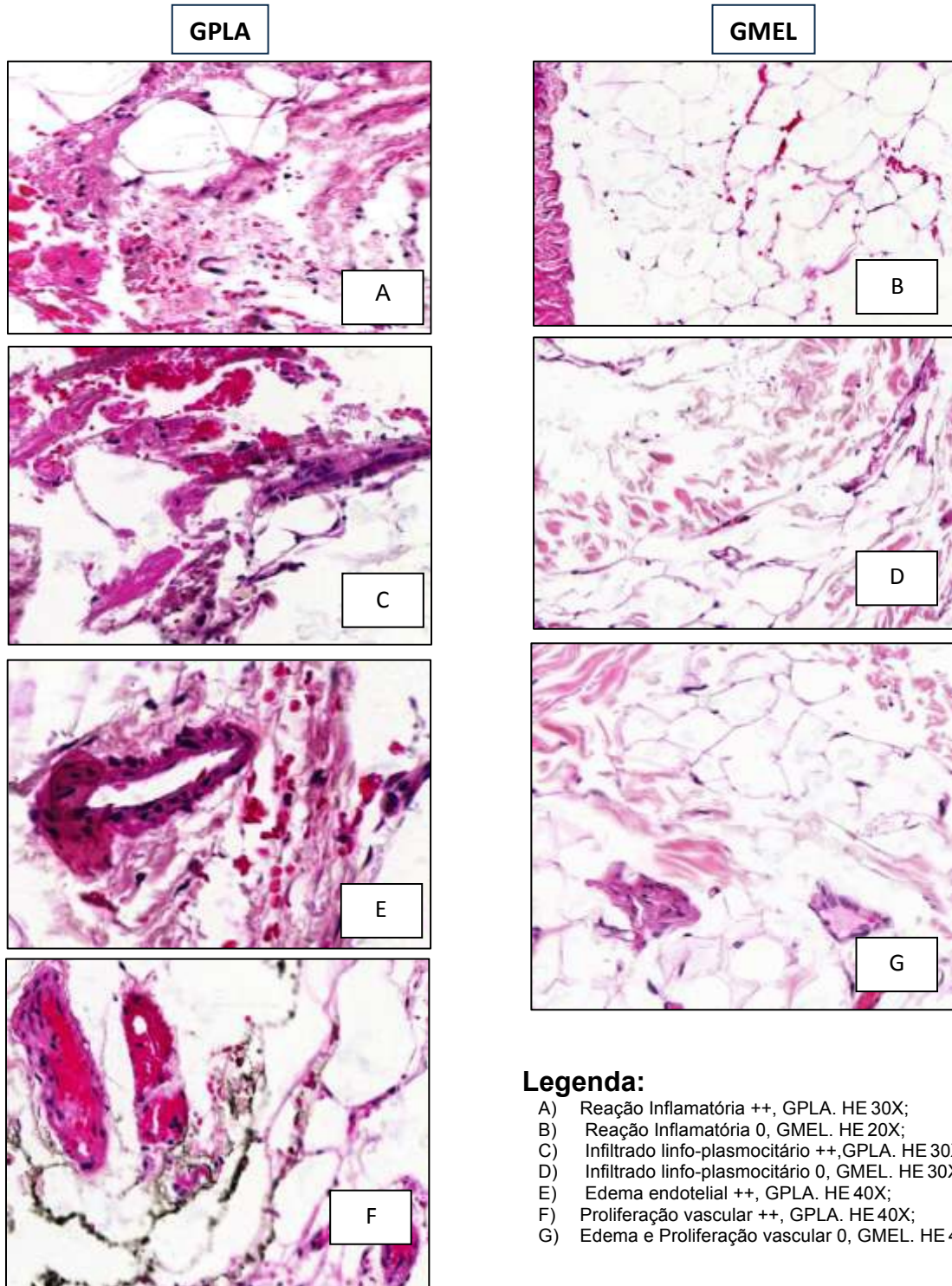


Gráfico 1 - Média e desvio padrão da intensidade das variáveis inflamatórias representadas nas amostras de peritônio parietal de pacientes submetidos à laparoscopia cirúrgica em ambos os grupos estudados. IF- Reação inflamatória apresentada no fragmento de tecido; LP- Infiltração celular linfocítica e plasmocitária; CV- Congestão vascular; ED- Edema endotelial. * $p=0,001$

4.1 Análise Morfológica Semi-quantitativa do Peritônio



Legenda:

- A) Reação Inflamatória ++, GPLA. HE 30X;
- B) Reação Inflamatória 0, GMEL. HE 20X;
- C) Infiltrado linfo-plasmocitário ++,GPLA. HE 30X;
- D) Infiltrado linfo-plasmocitário 0, GMEL. HE 30X;
- E) Edema endotelial ++, GPLA. HE 40X;
- F) Proliferação vascular ++, GPLA. HE 40X;
- G) Edema e Proliferação vascular 0, GMEL. HE 40X.

A análise do escore inflamatório mostrou diferença estatisticamente significativa quando se comparou o GPLA e o GMEL para o efeito na redução deste escore ($p = 0,001$) (Gráfico 2).

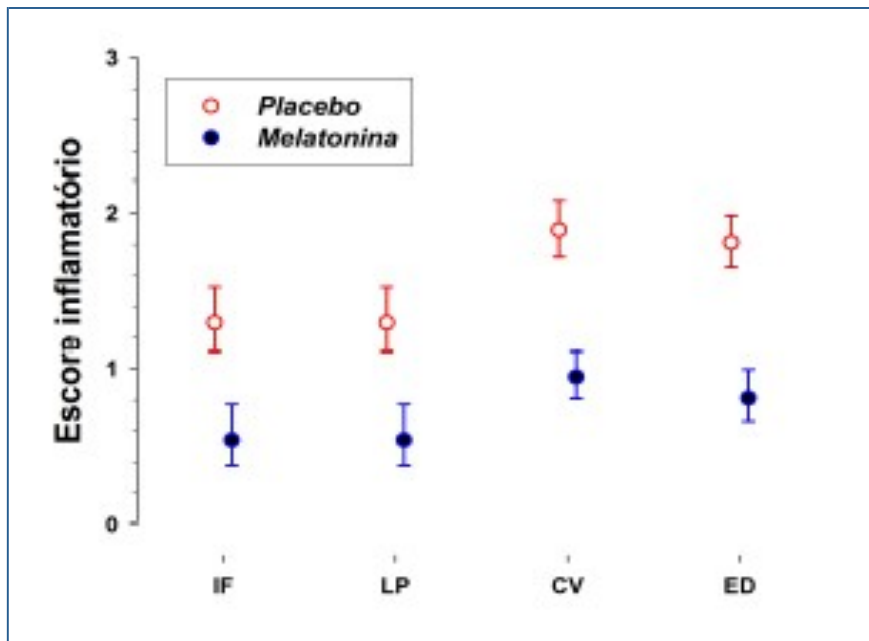


Gráfico 2 – Média, menor e maior valor do escore inflamatório representadas nas amostras de peritônio parietal de pacientes submetidos à laparoscopia cirúrgica em ambos os grupos estudados. IF- Reação inflamatória apresentada no fragmento de tecido; LP- Infiltração celular linfocítica e plasmocitária; CV- Congestão vascular; ED- Edema endotelial * $p=0,001$

O tempo de pneumoperitônio não apresentou diferença entre os grupos estudados, quando o quesito comparado foi o grau de inflamação tecidual ($p= 0,145$). (Tabela 3) (Gráfico 3)

Tabela 3 – Tempo de Pneumoperitônio e Grau de Inflamação Tecidual

GRUPOS	TP	IF	p
GPLA	33,1 ± 8,0	1,2 ± 0,1	0,145
GMEL	38,2 ± 16,9	0,6 ± 0,5	

TP - Tempo de pneumoperitônio

IF- Reação inflamatória apresentada no fragmento de tecido (peritônio parietal)

Valores expressos em média e desvio padrão

Valores expressos em min

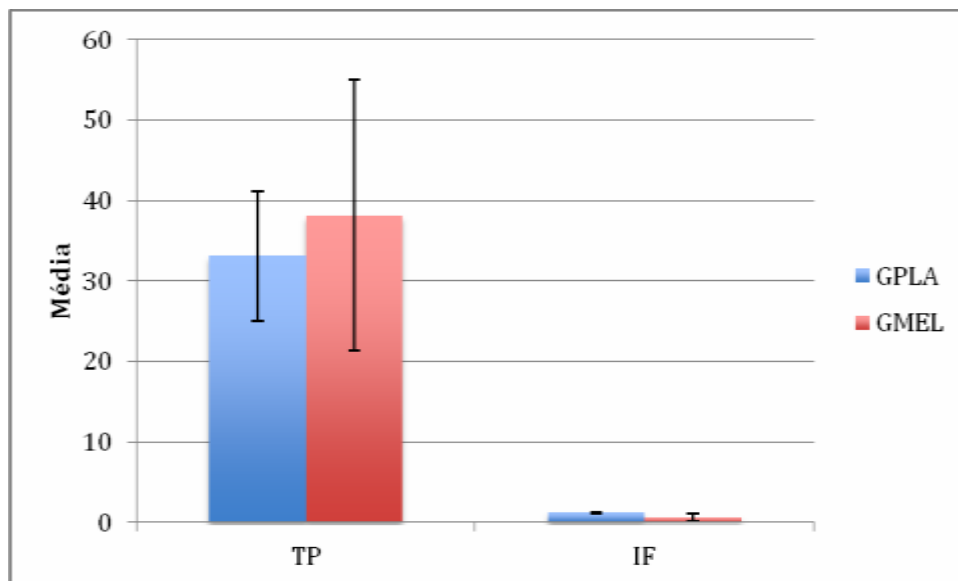


Gráfico 3 - Média e desvio padrão do tempo de pneumoperitônio (TP) e do grau de inflamação tecidual (IF) representadas nas amostras de peritônio parietal de pacientes submetidos à laparoscopia cirúrgica em ambos os grupos estudados. IF- Reação inflamatória apresentada no fragmento de tecido. $p=0,145$

A pressão intra-abdominal estabelecida não mostrou diferença entre os grupos em relação ao grau de inflamação tecidual ($p= 0,926$) (Tabela 4 e Gráfico 4).

Tabela 4 – Pressão Intra-abdominal e Grau de Inflamação Tecidual

GRUPOS	PP3	IF	P
GPLA	13,4 ± 1,6	1,3 ± 0,1	0,926
GMEL	12,7 ± 1,8	0,5 ± 0,1	

P3 - pressão intra-abdominal

IF- Reação inflamatória apresentada no fragmento de tecido (peritônio parietal)

Valores expressos em média e desvio padrão

Valores expressos em min

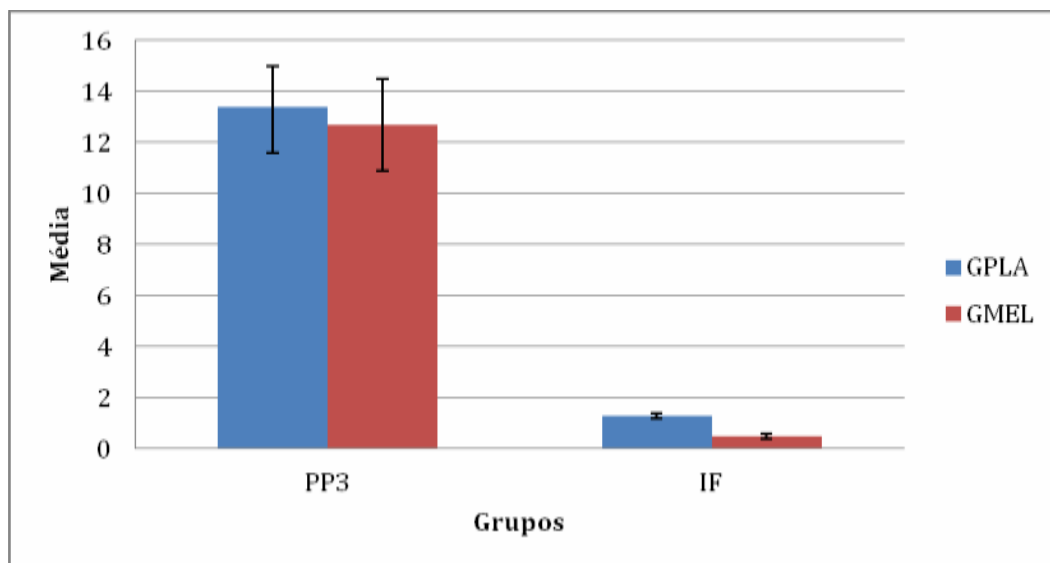
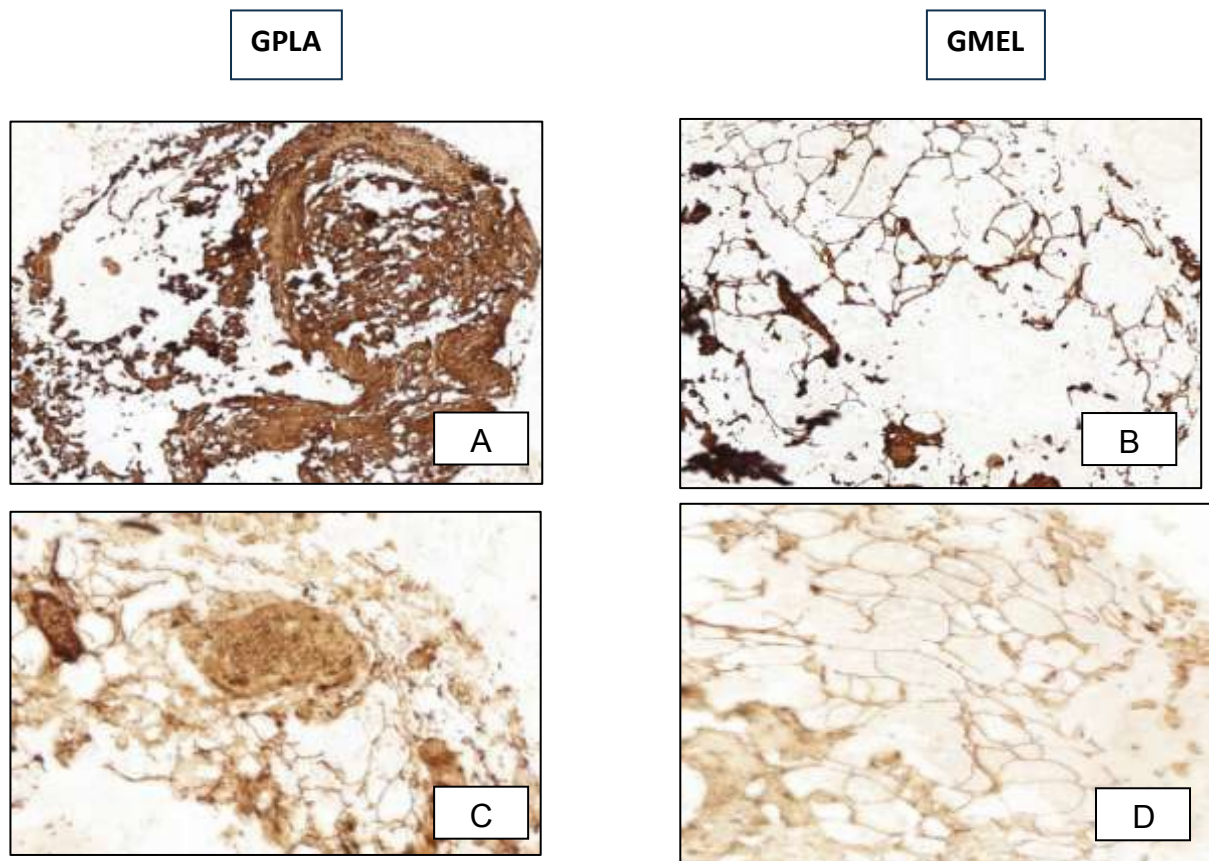


Gráfico 4 - Média e desvio padrão da pressão intra-abdominal (PP3) e do grau de inflamação tecidual (IF) representadas nas amostras de peritônio parietal de pacientes submetidos à laparoscopia cirúrgica em ambos os grupos estudados. IF- Reação inflamatória apresentada no fragmento de tecido. $p = 0,926$.

4.2 Estudo Imuno-histoquímico para Detecção de MTNR1A e MTNR1B



Legenda:

A / B - Imunocoloração intensa (++) para MTNR1A no GPLA e GMEL, respectivamente.

IMH 20X

C / D - Imunocoloração fraca (+) para MTNR1B no GPLA e GMEL, respectivamente. IMH 30X

A expressão das proteínas MTNR1A e MTNR1B não mostram diferenças entre os grupos estudados (Gráfico 5).

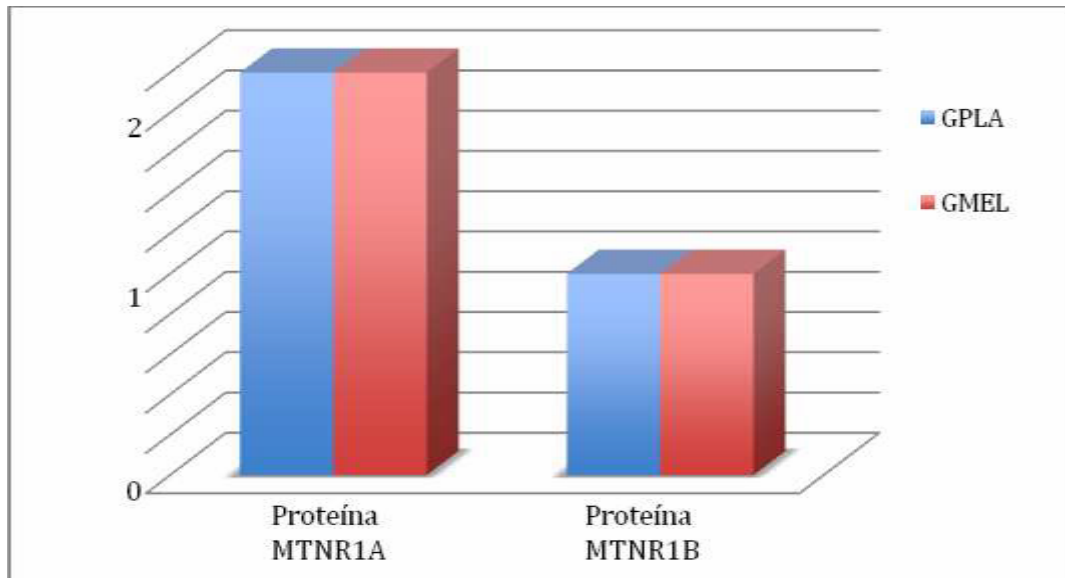


Gráfico 5 - Expressão de proteínas MTNR1A e MTNR1B representadas nas amostras de peritônio parietal de pacientes submetidos à laparoscopia cirúrgica em ambos os grupos estudados.

4.3 Variáveis Hemodinâmicas (FC, PAS, PAD e PAM)

As variáveis hemodinâmicas FC, PAS, PAD e PAM não mostraram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos nos diferentes momentos do estudo ($p=0,882$; $p=0,918$; $p=0,826$; $p=0,323$ (Tabelas 5, 6, 7 e 8) (Gráficos 6,7,8 e 9).

Tabela 5 – Pressão Arterial Sistólica nos diferentes momentos do estudo

GRUPOS	PAS0	PAS1	PAS2	PAS3	PAS4	p
GPLA	126,8 ± 6,8	134,2 ± 15,2	97,8 ± 14,2	102,8 ± 17,0	98,1 ± 13,8	0,882
GMEL	122,5 ± 14,6	128,9 ± 14,2	100,4 ± 14,1	98,9 ± 14,1	101,4 ± 10,6	

PAS0- Pressão arterial sistólica na avaliação pré-anestésica

PAS1- Pressão arterial sistólica pré-indução anestésica

PAS2- Pressão arterial sistólica pós-indução anestésica

PAS3- Pressão arterial sistólica 10 minutos após iniciar o pneumoperitônio

PAS4- Pressão arterial sistólica após desfazer o pneumoperitônio

Valores expressos em média e desvio padrão

Valores expressos em mmHg

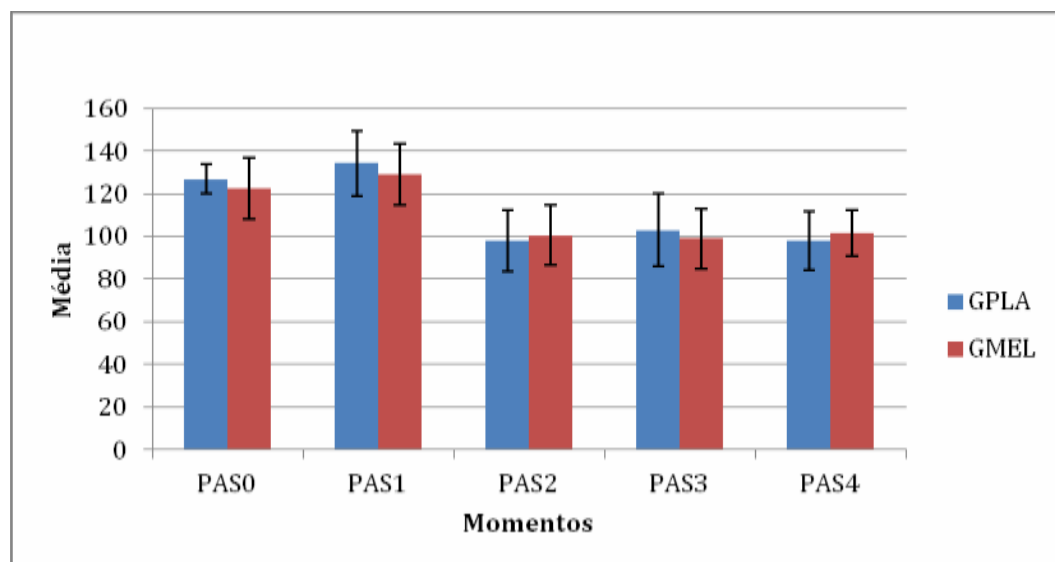


Gráfico 6 - Média e desvio padrão da pressão arterial sistólica nos diferentes momentos do estudo em ambos os grupos estudados. PAS0- Pressão arterial sistólica na avaliação pré-anestésica; PAS1- Pressão arterial sistólica pré-indução anestésica; PAS2- Pressão arterial sistólica pós-indução anestésica; PAS3- Pressão arterial sistólica 10 minutos após iniciar o pneumoperitônio (Isquemia); PAS4- Pressão arterial sistólica após o término do pneumoperitônio (reperfusão – 3 minutos após desfazer o pneumoperitônio). $p=0,882$.

Tabela 6 – Pressão Arterial Diastólica nos diferentes momentos do estudo

GRUPOS	PAD0	PAD1	PAD2	PAD3	PAD4	p
GPLA	78,2 ± 10,2	80,9 ± 10,5	59,8 ± 10,3	63,3 ± 11,1	58,1 ± 9,2	0,918
GMEL	77,7 ± 8,9	77,7 ± 7,0	61,6 ± 11,0	61,7 ± 10,6	59,1 ± 7,3	

PAD0- Pressão arterial diastólica na avaliação pré-anestésica

PAD1- Pressão arterial diastólica pré-indução anestésica

PAD2- Pressão arterial diastólica pós-indução anestésica

PAD3- Pressão arterial diastólica 10 minutos após iniciar o pneumoperitônio

PAD4- Pressão arterial diastólica após desfazer o pneumoperitônio

Valores expressos em media e desvio padrão

Valores expressos em mmHg

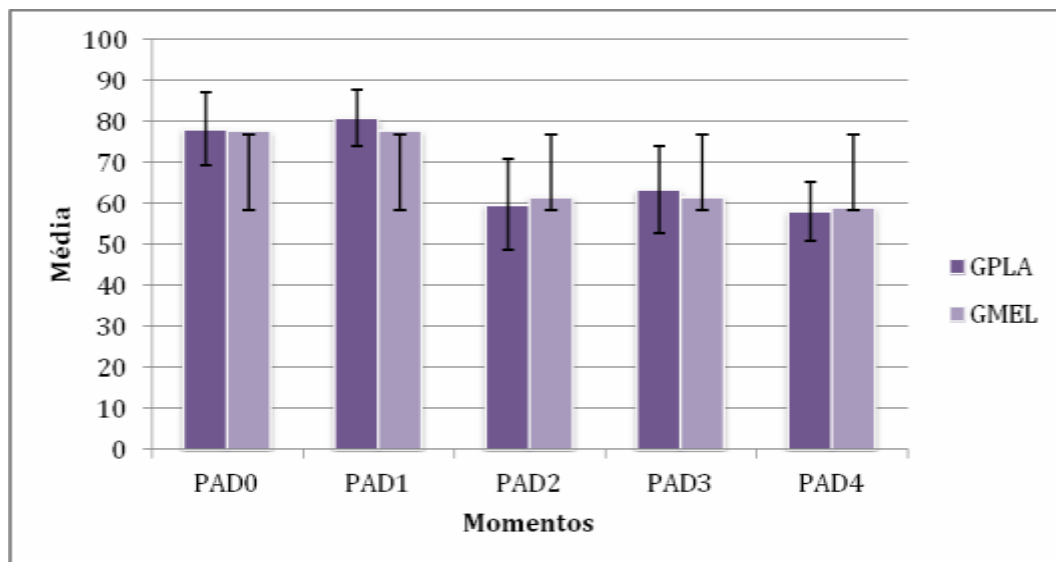


Gráfico 7 - Média e desvio padrão da pressão arterial diastólica nos diferentes momentos do estudo em ambos os grupos estudados. PAD0- Pressão arterial sistólica na avaliação pré-anestésica; PAD1- Pressão arterial sistólica pré-indução anestésica; PAD2- Pressão arterial sistólica pós-indução anestésica; PAD3- Pressão arterial sistólica 10 minutos após iniciar o pneumoperitônio (Isquemia); PAD4- Pressão arterial sistólica após o término do pneumoperitônio (reperfusão – 3 minutos após desfazer o pneumoperitônio). p=0,918

Tabela 7 – Pressão Arterial Média nos diferentes momentos do estudo

GRUPOS	PAM1	PAM2	PAM3	PAM4	p
GPLA	99,5 ± 12,6	72,5 ± 11,4	77,1 ± 13,4	72,8 ± 11,6	0,826
GMEL	93,3 ± 9,4	75,4 ± 12,5	74,8 ± 11,9	73,8 ± 7,1	

PAM1- Pressão arterial média pré-indução anestésica

PAM2- Pressão arterial média pós-indução anestésica

PAM3- Pressão arterial média 10 minutos após iniciar o pneumoperitônio

PAM4- Pressão arterial média após desfazer o pneumoperitônio

Valores expressos em media e desvio padrão

Valores expressos em mmHg

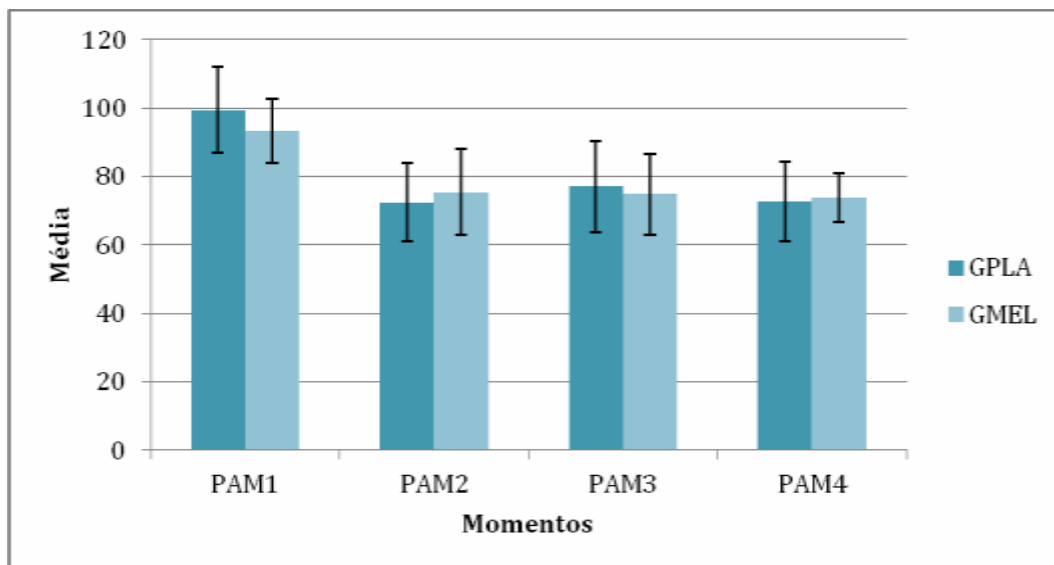


Gráfico 8 - Média e desvio padrão da pressão arterial média nos diferentes momentos do estudo em ambos os grupos estudados. PAM1- Pressão arterial sistólica pré-indução anestésica; PAM2- Pressão arterial sistólica pós-indução anestésica; PAM3- Pressão arterial sistólica 10 minutos após iniciar o pneumoperitônio (Isquemia); PAM4- Pressão arterial sistólica após o término do pneumoperitônio (reperfusão – 3 minutos após desfazer o pneumoperitônio). p=0,826.

Tabela 8 – Frequência Cardíaca nos diferentes momentos do estudo

GRUPOS	FC0	FC1	FC2	FC3	FC4	p
GPLA	70,9±9,7	70,2±13,0	66,0±10,2	65,3±10,5	64,6±11,0	0,323
GMEL	75,0±10,2	74,1±13,9	68,1±11,0	66,4±10,0	66,5±10,7	

FC0 – Frequência cardíaca na avaliação pré-anestésica

FC1 - Frequência cardíaca pré-indução anestésica

FC2 - Frequência cardíaca pós – indução anestésica

FC3 - Frequência cardíaca 10 minutos após iniciar o pneumoperitônio

FC4 - Frequência cardíaca após desfazer o pneumoperitônio

Valores expressos em media e desvio padrão

Valores expressos em bat.min⁻¹

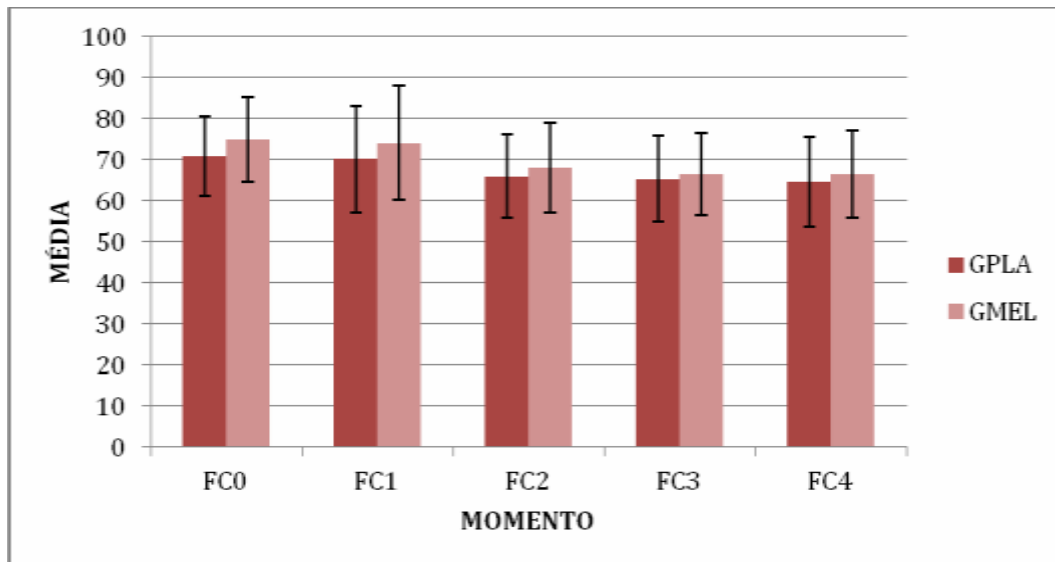


Gráfico 9 - Média e desvio padrão da frequência cardíaca nos diferentes momentos do estudo em ambos os grupos estudados. FC0 – Frequência cardíaca na avaliação pré-anestésica; FC1 - Frequência cardíaca pré-indução anestésica; FC2 - Frequência cardíaca pós – indução anestésica; FC3 - Frequência cardíaca 10 minutos após iniciar o pneumoperitônio (Isquemia); FC4 - Frequência cardíaca após desfazer o pneumoperitônio (reperfusão – 3 minutos após desfazer o pneumoperitônio). p=0,323

4.4 Saturação Periférica de Oxigênio (SP) a Fração Expirada de CO₂ (ET)

As variáveis relacionadas SP e ET, ao serem comparadas entre os grupos nos diferentes momentos do estudo, não mostraram diferenças estatisticamente significativas ($p=0,418$; $p=0,925$) (Tabelas 9 e 10) (Gráficos 10 e 11).

Tabela 9 – Saturação Periférica de Oxigênio nos diferentes momentos do estudo

GRUPOS	SP1	SP2	SP3	SP4	p
GPLA	96,9 ± 1,8	98,6 ± 0,7	98,0 ± 1,1	98,0 ± 1,0	0,418
GMEL	97,5 ± 1,6	98,8 ± 0,8	98,5 ± 0,1	98,3 ± 0,8	

SP1- Saturação periférica de oxigênio pré-indução anestésica
 SP2- Saturação periférica de oxigênio pós-indução anestésica
 SP3- Saturação periférica de oxigênio 10 minutos após iniciar o pneumoperitônio
 SP4- Saturação periférica de oxigênio após desfazer o pneumoperitônio

Valores expressos em média e desvio padrão
 Valores expressos em percentual (%)

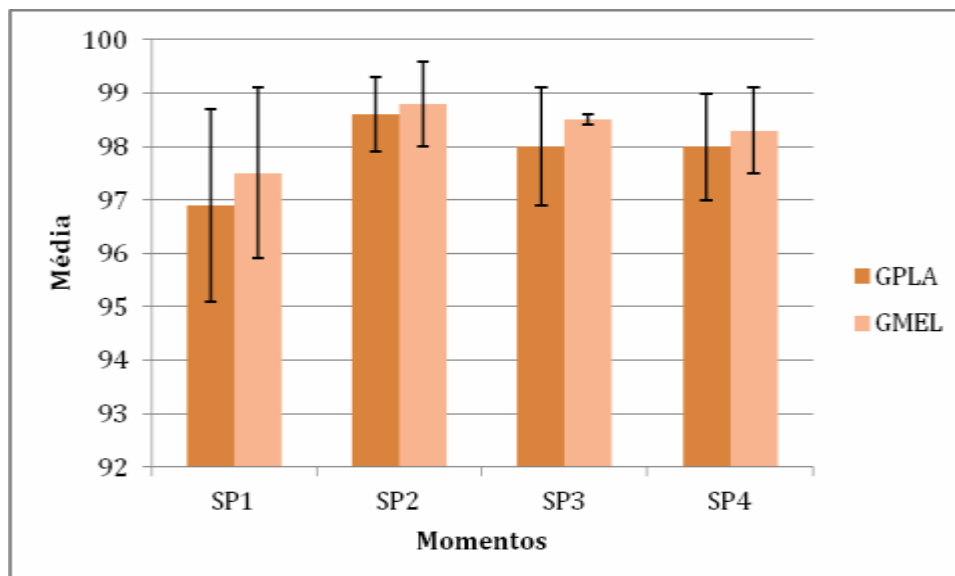


Gráfico 10 - Média e desvio padrão da saturação periférica de oxigênio nos diferentes momentos do estudo em ambos os grupos estudados. SP1- Saturação periférica de oxigênio pré-indução anestésica; SP2- Saturação periférica de oxigênio pós-indução anestésica; SP3- Saturação periférica de oxigênio 10 minutos após iniciar o pneumoperitônio (Isquemia); SP4- Saturação periférica de oxigênio após o término do pneumoperitônio (reperfusão – 3 minutos após desfazer o pneumoperitônio). $p=0,418$

Tabela 10 – Fração Expirada de CO₂ nos diferentes momentos do estudo

GRUPOS	ET2	ET3	ET4	P
GPLA	31,9±2,8	37,1±4,3	37,2±4,3	0,925
GMEL	32,0±3,2	36,5±4,0	36,8±4,6	

ET2- CO₂ expirado pós-indução anestésica
 ET3- CO₂ expirado 10 minutos após iniciar o pneumoperitônio
 ET4- CO₂ expirado após desfazer o pneumoperitônio
 Valores expressos em média e desvio padrão

Valores expressos em mmHg

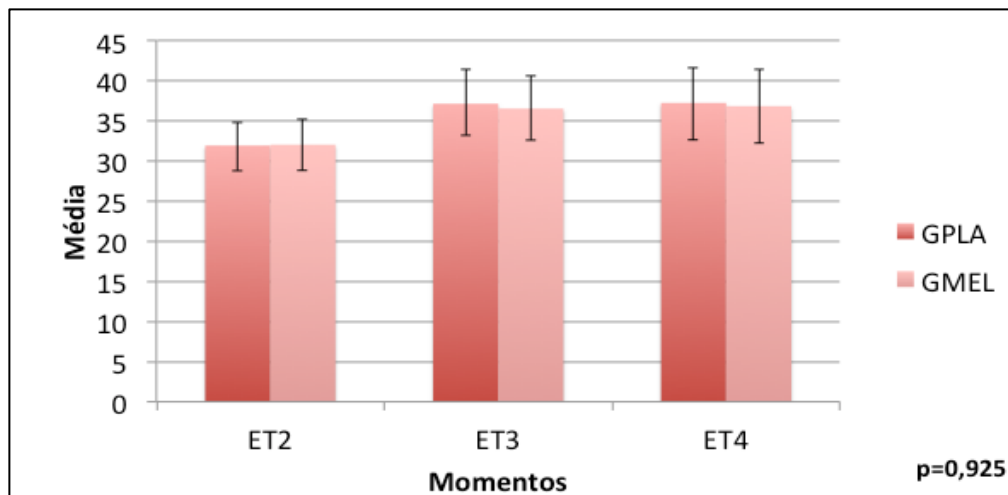


Gráfico 11 - Média e desvio padrão do CO₂ expirado nos diferentes momentos do estudo em ambos os grupos estudados. ET2- CO₂ expirado pós-indução anestésica; ET3- CO₂ expirado 10 minutos após iniciar o pneumoperitônio (Isquemia); ET4- CO₂ expirado após o término do pneumoperitônio (reperfusão – 3 minutos após desfazer o pneumoperitônio). p=0,925

5 Discussão

O principal achado deste estudo foi a redução nas variáveis inflamatórias estudadas, induzidas pela melatonina. Até o momento atual, este é primeiro estudo clínico randomizado, duplo cego, placebo controlado com poder adequado, em humanos, que demonstra os efeitos anti-inflamatórios da melatonina para pacientes submetidos ao pneumoperitônio. Além disto, são raros os estudos que avaliam os efeitos do pneumoperitônio em amostras deste tecido em humanos, sendo que em sua maioria, provém de estudos em animais. Apenas Liu e Hou (2006) realizaram um estudo com amostras peritoneais, porém, sem quantificar efeitos terapêuticos.

Este modelo, o pneumoperitônio, é utilizado clinicamente em procedimentos cirúrgicos laparoscópicos, os quais têm se tornado o padrão ouro para colecistectomias, mas apesar de ser considerado minimamente invasivo, apresenta importantes repercussões inflamatórias, mesmo que de menor magnitude em relação às laparotomias convencionais (Novitsky, Litwin e Callery, 2004).

Diversos estudos, ao longo dos últimos 20 anos, têm sido conduzidos para comparar se a cirurgia laparoscópica, com o estabelecimento do pneumoperitônio, utilizando o CO₂, estimula os mecanismos inflamatórios e oxidativos da mesma forma que os procedimentos realizados pela via convencional aberta (O'Malley e Cunningham, 2001).

No seu estudo, Bukan et al. (2004), comparando a expressão oxidativa, por meio da dosagem do marcador oxidativo MDA e dos níveis de nitrito e nitrato plasmáticos, demonstraram que nos procedimentos laparoscópicos os níveis destes marcadores foram menores, quando comparados com os procedimentos abertos, para a mesma cirurgia de colecistectomia. No entanto, nota-se que a resposta inflamatória e o consequente estresse oxidativo, embora de menor intensidade, ocorrem nas cirurgias laparoscópicas.

O advento destas cirurgias possibilitou estudar e conhecer melhor a fisiologia e as respostas do peritônio com a introdução de novos fatores com esta técnica cirúrgica. A insuflação abdominal com CO₂ promoveu alterações das funções biológicas e da integridade do peritônio demonstrando que este tecido é uma entidade ativa, com respostas imunológicas e inflamatórias, extensamente integradas com as repercussões sistêmicas do procedimento cirúrgico (Brokelman et al., 2011).

O peritônio compõe uma das estruturas mesoteliais do organismo, juntamente com o pericárdio e a pleura (Mutsaers, 2002). Sua estrutura celular apresenta intensa atividade inflamatória com a liberação de mediadores inflamatórios e produtos do metabolismo oxidativo. Moléculas como EROS, H₂O₂, O₂⁻, ONOO⁻ são produzidas pelas células mesoteliais em resposta às citocinas, as quais atuam também como quimiotáxico em relação às células da linhagem inflamatória (Sheeran e Hall, 1997).

A inflamação, como entidade fisiológica, é necessária para a restauração dos tecidos após a injúria cirúrgica, no entanto, uma resposta

exagerada torna-se deletéria para o paciente (Kohl e Deutschman, 2006). A ativação da resposta inflamatória humoral e celular, no peritônio, conduz à imunossupressão local, a qual resulta em diminuição da capacidade de defesa deste tecido à exposição bacteriana e às células neoplásicas (Novitsky, Litwin e Callery, 2004).

Neste estudo, foi demonstrada a ativação das defesas celulares peritoneais, muito provavelmente secundárias à sinalização humoral representada pela produção tecidual de IL-1, IL-6 e FNT- α , quando do estabelecimento do pneumoperitônio com CO₂ (Ure et al., 2002), sem correlação com a pressão abdominal estabelecida ou a duração temporal do mesmo.

A insuflação da cavidade abdominal com CO₂ preserva os mecanismos de defesa imunológica do peritônio, tanto humorais quanto celulares, quando comparada à laparotomia aberta, para um mesmo procedimento (Buunen et al., 2004). Embora o dióxido de carbono apresente efeitos secundários no pH da cavidade abdominal, ao se combinar com o componente aquoso do líquido peritoneal e formar ácido carbônico (Chekan, 1999), o componente isquêmico e a posterior reperfusão, são fatores importantes que consideramos na amplificação da resposta inflamatória tecidual e estresse oxidativo.

O estabelecimento do pneumoperitônio com CO₂ resulta na I/R, uma vez que a pressão abdominal estabelecida promove isquemia esplâncnica e redução do fluxo sanguíneo na veia cava inferior (Lindberg et al., 1997; Zulfikaroglu et al., 2002). Como resultado desta pressão elevada, ocorre

isquemia tissular em órgãos como rins, fígado, intestino delgado e no tecido peritoneal (Schilling et al., 1997).

Segundo Taskin et al. (1998), as pressões intra-abdominais estabelecidas durante o pneumoperitônio, estão acima da pressão da circulação porta hepática, o que causa isquemia tissular. Este processo fisiopatológico é responsável pela produção de EROS tecidual o que contribui para a lesão celular em resposta a privação temporária de circulação.

Com o término do procedimento laparoscópico e a consequente desinsuflação da cavidade abdominal, ocorre a reperfusão destes tecidos isquêmicos. A principal consequência é o desequilíbrio entre as moléculas oxidantes e antioxidantes em favor das oxidantes, o que conduz à lesão celular e disfunção orgânica, resultantes do estresse oxidativo.

No seu estudo sobre o efeito oxidativo do pneumoperitônio com CO₂, relacionando pressão abdominal e tempo de duração do mesmo em ratos, Kontoulis et al. (2012) demonstraram a elevação tecidual do MDA, IL-6 e FNT- α , como referido acima quando do estabelecimento da I/R.

Em nosso trabalho, a duração do pneumoperitônio não foi significativa para influenciar a resposta inflamatória tecidual nos grupos estudados. Os tempos médios estabelecidos em ambos os grupos foi inferior a 60 minutos, o que vem de encontro com a literatura (Taskin et al., 1998).

A isquemia tecidual induz um estado pró-inflamatório que torna o tecido mais vulnerável a I/R. O dano celular ocorre devido ao catabolismo proteico da adenina nucleotídeo durante a isquemia, o que resulta em acúmulo intracelular de hipoxantina. Esta representa o substrato para a formação dos

EROS com a reperfusão e reintrodução molecular do oxigênio (Collard e Gelman, 2001).

As moléculas de EROS são caracterizadas pela sua potente ação oxidante, reduzindo os agentes que diretamente danificam as membranas celulares pela peroxidação lipídica. Adicionalmente, ocorre a atração quimiotáxica de leucócitos, resultante da I/R, com a transmigração e adesão endotelial leucocitária.

As consequências deste processo são as alterações relacionadas ao metabolismo e à ultraestrutura celulares. Ocorrem alterações no potencial de membrana com repercussão nos fluxos iônicos de Na^{2+} e Ca^{2+} , aumento destes íons no intracelular resultando em edema celular e desorganização do citoesqueleto. O acúmulo da hipoxantina, a diminuição do ATP, da fosfocreatina e da glutathione diminuem os mecanismos antioxidantes propiciando os efeitos oxidativos (Collard, Gelman, 2001).

O fator que regula a patogênese da I/R está relacionado às alterações vasculares decorrentes das alterações celulares descritas acima. As alterações morfológicas vasculares que acompanham a I/R incluem o edema celular, a perda de vesículas picnóticas, o descolamento das células endoteliais da membrana basal, a aderência leucocitária ao endotélio, todas decorrentes da intensa reação inflamatória e da ação das moléculas de EROS (Carden e Granger, 2000).

No presente estudo, estas alterações celulares foram bem caracterizadas no grupo PLA. Os estudos de histologia patológica, em

hematoxilina-eosina, mostram a presença de infiltração celular linfocítica e plasmocitária, congestão vascular e edema endotelial.

Estas alterações demonstram a repercussão tecidual do estresse oxidativo, na estrutura da parede dos vasos, caracterizando uma disfunção celular endotelial, relacionada à inflamação e a I/R (Maxwell e Lip, 1997). As moléculas de EROS, promovem alterações proteicas, lipídicas e no DNA celular causando danos, muitas vezes, irreversíveis às células e aos tecidos (Tan et al., 2005).

Ao observar que estas alterações demonstravam o efeito oxidativo em pacientes após a cirurgia e traduziam o desequilíbrio entre as moléculas oxidantes e antioxidantes, Nathens et al. (2002) propuseram a administração de fármacos ou a suplementação de antioxidantes naturalmente produzidos pelo organismo, como uma estratégia para modificar os efeitos do estresse oxidativo.

Outros autores, identificaram que a melatonina apresentava um potente efeito antioxidante ao ter sua produção aumentada frente a situações de estresse oxidativo fisiológico (Tan et al., 2005). Situações, como a asfixia neonatal, foram modelos de estudo que evidenciaram a ação da melatonina exógena como potente antioxidante (Fulia et al., 2001).

Estudos relacionando a I/R miocárdica também mostraram que a melatonina exógena possui atividade antioxidante, diminuindo a lesão de I/R, por meio da sua ação direta em radicais EROS, OH^- e O_2^- , promovendo a inativação destes radicais oxidantes no tecido miocárdico (Reiter e Tan, 2003).

A administração exógena de melatonina atenuou as alterações histológicas determinadas pelo estresse oxidativo em testículos de ratos Wistar, submetidos a I/R, devido a sua capacidade de diminuir a atividade oxidante tecidual neste modelo (Koksal et al., 2012).

No presente estudo, observou-se no grupo GMEL uma diminuição no grau de infiltrados inflamatórios nas biópsias peritoneais. Este achado permite inferir que houve também uma diminuição do estresse oxidativo. A administração de melatonina pode ter promovido a inativação dos radicais oxidantes por meio de ações: (1) direta pela remoção dos EROS, OH^- , O_2^- e (2) indireta por meio da estimulação das enzimas antioxidantes superóxido desmutase, a glutaciona peroxidase e a glutaciona redutase, como observado pela atenuação do estresse oxidativo tecidual, o que coloca a melatonina como um fármaco a ser utilizado no período pré-operatório dos pacientes que serão submetidos à laparoscopia cirúrgica.

A utilização de melatonina no período perioperatório tem sido objeto de muitos estudos devido as suas propriedades ansiolíticas comparadas ao midazolam, mas sem as repercussões psicomotoras pós-operatórias do benzodizepínico (Acil et al., 2004). O efeito aditivo da melatonina na diminuição das doses de propofol para obter a hipnose tem sido uma indicação do uso deste fármaco como pré-anestésico, embora no presente estudo não tenha sido avaliado este efeito (Turkistani et al., 2007). A administração da melatonina como fármaco pré-anestésico tem encontrado indicações também devido a sua propriedade antioxidante (Cay et al., 2006; Maitra, Baidya e Khanna, 2013).

A farmacologia da melatonina é complexa, envolvendo extenso metabolismo de primeira passagem com variável biodisponibilidade, o que promove grande variação de doses dependendo da via de administração (Waldhauser et al., 1984). Não há uma dose estabelecida para cada efeito da melatonina (ansiólise, analgesia ou antioxidante), mas sabe-se que para obter os efeitos antioxidantes as doses devem ser superiores às que promovem ansiólise.

A melatonina é uma substância altamente lipossolúvel com um elevado volume de distribuição e ligação às proteínas plasmáticas (albumina) na ordem de 70% (Pardridge, Mietus, 1980). Apresenta metabolização hepática pelo citocromo CYP1A2 a 6-hidroximelatonina e conjugação para as formas sulfato e glucoronídeo, sendo que 1% é excretada na urina na forma original (Vakkuri, Leppaluoto e Kaupila, 1985).

Neste estudo propomos a administração de melatonina em 2 momentos (12 horas e 1 h antes da indução anestésica) para que seu efeito ansiolítico, com os benefícios relacionados ao sono na noite anterior à cirurgia, fossem estabelecidos e para que antes da indução anestésica, os pacientes apresentassem níveis plasmáticos de melatonina adequados para estabelecer as propriedades antioxidantes estudadas.

A dose foi determinada pela análise da literatura, uma vez que existe ampla variação da mesma para diferentes objetivos terapêuticos e vias de administração. Foi estabelecida a dose de 20 mg para cada tomada totalizando 40 mg nos pacientes do grupo GMEL. A dose total média utilizada neste grupo

foi de $0,54 \text{ mg.kg}^{-1}$, estando entre as faixas terapêuticas listadas na literatura (Maitra, Baidya e Khanna, 2013).

Nas doses utilizadas, os pacientes que receberam a melatonina não apresentaram alterações significativas nas medidas de pressão arterial (PAS, PAD e PAM), frequência cardíaca, saturação periférica de oxigênio e fração expirada de CO_2 , nos diferentes momentos do estudo. Isto mostra a segurança do uso da melatonina nestas doses estudadas.

A escolha da técnica anestésica realizada no estudo foi fundamentada em alguns aspectos: (1) promover adequada anestesia para a realização do procedimento cirúrgico; (2) utilizar fármacos anestésicos que não apresentassem interações medicamentosas com a melatonina e (3) utilizar fármacos anestésicos que não promovessem interações com a resposta inflamatória e com o estresse oxidativo.

O propofol embora apresente atividade antioxidante, nas doses utilizadas no estudo ($1,5 \text{ mg.kg}^{-1}$) em dose única, não apresenta interferência no estresse oxidativo, bem como o remifentanil e o sevoflurano na resposta inflamatória (Orosz et al., 2012). Em seu estudo sobre os efeitos da melatonina no estresse oxidativo, após colecistectomia laparoscópica, Küçükakin et al. (2010) não evidenciaram a redução dos marcadores MDA, utilizando propofol em infusão contínua para manutenção anestésica, devido aos efeitos antioxidantes deste hipnótico.

A administração exógena de melatonina não mostrou influência na expressão gênica das proteínas MTNR1A e MTNR1B, as quais codificam em humanos os receptores (MT1 e MT2) para melatonina. Este resultado

surpreendeu devido à expressão gênica destas proteínas terem sido idênticas em ambos os grupos estudados, uma vez que se esperava menor expressão no grupo que recebera melatonina, devido ao fenômeno de *down regulation* destes receptores (Morgan et al., 1994).

O mecanismo bioquímico, relacionado aos resultados obtidos neste estudo, confirma o que está proposto como efeito farmacodinâmico da melatonina, enquanto anti-inflamatório e como potencial agente antioxidante.

O presente estudo tem como principais limitações o não estudo das citocinas inflamatórias e dos marcadores envolvidos no estresse oxidativo. Entretanto, a atenuação induzida pela melatonina nas reações inflamatórias teciduais, observadas pela análise histopatológica, permite deduzir que a não realização destas análises pouco influenciariam na conclusão do estudo.

Este estudo foi realizado em pacientes ASA I e II, tendo resultado positivo com relação à diminuição da reação inflamatória no peritônio. Entretanto, em pacientes ASA III ou IV, que possuem maior morbidade, estes resultados podem não ser estendidos, deste modo novos estudos serão necessários.

6 Conclusão

Em conclusão, nas condições empregadas neste estudo, os resultados demonstraram que a melatonina diminuiu a inflamação peritoneal, e potencialmente, o estresse oxidativo nos pacientes submetidos à laparoscopia cirúrgica.

A melatonina atenuou o grau de inflamação, infiltração linfocitária e plasmocitária, edema endotelial e congestão vascular no peritônio parietal destes pacientes.

No entanto, a melatonina não modificou a expressão gênica das proteínas MTNR1A e MTNR1B nos pacientes submetidos à laparoscopia cirúrgica.

7 Referências

- Acil M, Basgul E, Celiker V, Karagoz AH, Demir B, Aypar U. Perioperative effects of melatonin and midazolam premedication on sedation, orientation, anxiety scores and psychomotor performance. *Eur J Anaesthesiol.* 2004; 21:553-7.
- Ackermann K, Stehle JH.. Melatonin synthesis in the human pineal gland: advantages, implications, and difficulties. *Chronobiol Int.* 2006;23:369-79.
- Acuna-Castroviejo D, Escames G, Venegas C, Diaz-Casado ME, Lima-Cabello E, Lopez LC et al. Extrapineal melatonin: sources, regulation, and potential functions. *Cell Mol Life Sci.* 2014; 71:2997-3025.
- Altun A, Ugur-Altun B. Melatonin: therapeutic and clinical utilization. *Int J Clin Pract.* 2007; 61:835-45.
- Arsalani-Zadeh R, Ullah S, Khan S, MacFie J. Oxidative stress in laparoscopic versus open abdominal surgery: a systematic review. *J Surg Res.* 2011; 169:e59-68.
- Brokelman WJ, Lensvelt M, Borel Rinkes IH, Klinkenbijn JH, Reijnen MM. Peritoneal changes due to laparoscopic surgery. *Surg Endosc.* 2011;25:1-9.
- Bukan MH, Bukan N, Kaymakcioglu N, Tufan T. Effects of open vs. laparoscopic cholecystectomy on oxidative stress. *Tohoku J Exp Med.* 2004; 202:51-6.
- Buunen M, Gholghesaei M, Veldkamp R, Meijer DW, Bonjer HJ, Bouvy ND. Stress response to laparoscopic surgery: a review. *Surg Endosc.* 2004; 18:1022-8.
- Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. *J Pathol.* 2000; 190:255-66.
- Cardinali DP, Pevet P. Basic aspects of melatonin action. *Sleep Med Rev.* 1998; 2:175-90.
- Caumo W, Torres F, Moreira Jr NL, Auzani JA, Monteiro CA, Londero G et al. The clinical impact of preoperative melatonin on postoperative outcomes in patients undergoing abdominal hysterectomy. *Anesth Analg.* 2007; 105:1263-71.

- Cay A, Imamoglu M, Unsal MA, Aydin S, Alver A, Akyol A et al. Does anti-oxidant prophylaxis with melatonin prevent adverse outcomes related to increased oxidative stress caused by laparoscopy in experimental rat model? *J Surg Res.* 2006; 135:2-8.
- Chalhoub V, Pottecher J, Asehnoune K, Mazoit JX, Duranteau J, Benhamou D. Cytokine response and reactive oxygen species production after low- and intermediate-risk surgery. *Acta Anaesthesiol Scand.* 2011; 55:549-57.
- Chekan EG, Nataraj C, Clary EM, Hayward TZ, Brody FJ, Stamat JC et al. Intraperitoneal immunity and pneumoperitoneum. *Surg Endosc.* 1999;13:1135-8.
- Claustrat B, Brun J, Chazot G. The basic physiology and pathophysiology of melatonin. *Sleep Med Rev.* 2005; 9:11-24.
- Collard CD, Gelman S. Pathophysiology, clinical manifestations, and prevention of ischemia-reperfusion injury. *Anesthesiology.* 2001; 94:1133-8.
- Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo R, Giustarini D, Milzani A. Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clin Chem.* 2006; 52:601-23.
- Fulia F, Gitto E, Cuzzocrea S, Reiter RJ, Dugo L, Gitto P et al. Increased levels of malondialdehyde and nitrite/nitrate in the blood of asphyxiated newborns: reduction by melatonin. *J Pineal Res.* 2001; 31:343-9.
- Hardeland R. Antioxidative protection by melatonin: multiplicity of mechanisms from radical detoxification to radical avoidance. *Endocrine.* 2005; 27:119-30.
- Hardeland R, Cardinali DP, Srinivasan V, Spence DW, Brown GM, Pandi-Perumal SR. Melatonin--a pleiotropic, orchestrating regulator molecule. *Prog Neurobiol.* 2011; 93:350-84.
- Jarratt J. Perioperative melatonin use. *Anaesth Intensive Care.* 2011;39:171-81.
- Kohl BA, Deutschman CS. The inflammatory response to surgery and trauma. *Curr Opin Crit Care.* 2006; 12:325-32.
- Koksal M, Oguz E, Baba F, Eren MA, Ciftci H, Demir ME et al. Effects of melatonin on testis histology, oxidative stress and spermatogenesis after experimental testis ischemia-reperfusion in rats. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2012; 16:582-8.
- Kontoulis TM, Pissas DG, Pavlidis TE, Pissas GG, Lalountas MA, Koliakos G et al. The oxidative effect of prolonged CO(2) pneumoperitoneum a comparative study in rats. *J Surg Res.* 2012; 175:259-64.
- Kucukakin B, Gogenur I, Reiter RJ, Rosenberg J. Oxidative stress in relation to surgery: is there a role for the antioxidant melatonin? *J Surg Res.* 2009; 152:338-47.

Kucukakin B, Klein M, Lykkesfeldt J, Reiter RJ, Rosenberg J, Gogenur I. No effect of melatonin on oxidative stress after laparoscopic cholecystectomy: a randomized placebo-controlled trial. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2010; 54:1121-7.

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

Lindberg F, Bergqvist D, Rasmussen I, Haglund U. Hemodynamic changes in the inferior caval vein during pneumoperitoneum. An experimental study in pigs. *Surg Endosc*. 1997; 11:431-7.

Liu Y, Hou QX. [Effect of carbon dioxide pneumoperitoneum during laparoscopic surgery on morphology of peritoneum]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 2006; 86:164-6.

Maitra S, Baidya DK, Khanna P. Melatonin in perioperative medicine: Current perspective. *Saudi J Anaesth*. 2013; 7:315-21.

Maxwell SR, Lip GY. Reperfusion injury: a review of the pathophysiology, clinical manifestations and therapeutic options. *Int J Cardiol*. 1997; 58:95-117.

Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*. 2008; 454:428-35.

Morgan PJ, Barrett P, Howell HE, Helliwell R. Melatonin receptors: localization, molecular pharmacology and physiological significance. *Neurochem Int*. 1994; 24:101-46.

Mutsaers SE. Mesothelial cells: their structure, function and role in serosal repair. *Respirology*. 2002; 7:171-91.

Nagy JA, Jackman RW. Anatomy and Physiology of the Peritoneal Membrane. *Seminars in Dialysis*. 1998; 11(1):49-56.

Nathens AB, Neff MJ, Jurkovich GJ, Klotz P, Farver K, Ruzinski JT et al. Randomized, prospective trial of antioxidant supplementation in critically ill surgical patients. *Ann Surg*. 2002; 236:814-22.

Ni Choileain N, Redmond HP. Cell response to surgery. *Arch Surg*. 2006; 141:1132-40.

Novitsky YW, Litwin DE, Callery MP. The net immunologic advantage of laparoscopic surgery. *Surg Endosc*. 2004; 18:1411-9.

O'Malley C, Cunningham AJ. Physiologic changes during laparoscopy. *Anesthesiol Clin North America*. 2001; 19:1-19.

Orosz JE, Braz MG, Golim MA, Barreira MA, Fecchio D, Braz LG et al. Cytokine profile in patients undergoing minimally invasive surgery with balanced anesthesia. *Inflammation*. 2012; 35:1807-13.

Ozmen MM, Zulfikaroglu B, Besler TH, Col C, Cinel L, Cinel I. The correlation between reactive oxygen species and histopathology of the liver, gut, and kidneys in animals with elevated intra-abdominal pressure. *J Laparoendosc Adv Surg Tech A*. 2009; 19:339-43.

Pandi-Perumal SR, Srinivasan V, Maestroni GJ, Cardinali DP, Poeggeler B, Hardeland R. Melatonin: Nature's most versatile biological signal? *FEBS J*. 2006; 273:2813-38.

Pardridge WM, Mietus LJ. Transport of albumin-bound melatonin through the blood-brain barrier. *J Neurochem*. 1980; 34:1761-3.

Perrin M, Fletcher A. Laparoscopic abdominal surgery. *Contin Educ Anaesth Crit Care Pain*. 2004; 4:107-104.

Reiter RJ. Melatonin: clinical relevance. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2003; 17:273-85.

Reiter RJ, Tan DX, Fuentes-Broto L. Melatonin: A Multitasking Molecule. *Prog Brain Res*. 2010; 181:127-51.

Reiter RJ, Tan DX. Melatonin: a novel protective agent against oxidative injury of the ischemic/reperfused heart. *Cardiovasc Res*. 2003; 58:10-9.

Reiter RJ, Tan DX, Galano A. Melatonin: exceeding expectations. *Physiology (Bethesda)*. 2014; 29:325-33.

Ryter SW, Kim HP, Hoetzel A, Park JW, Nakahira K, Wang X et al. Mechanisms of cell death in oxidative stress. *Antioxid Redox Signal*. 2007; 9:49-89.

Sammour T, Mittal A, Loveday BP, Kahokehr A, Phillips AR, Windsor JA et al. Systematic review of oxidative stress associated with pneumoperitoneum. *Br J Surg*. 2009; 96:836-50.

Schafer M, Krahenbuhl L. Effect of laparoscopy on intra-abdominal blood flow. *Surgery*. 2001; 129:385-9.

Schilling MK, Redaelli C, Krahenbuhl L, Signer C, Buchler MW. Splanchnic microcirculatory changes during CO2 laparoscopy. *J Am Coll Surg*. 1997; 184:378-82.

Sheeran P, Hall GM. Cytokines in anaesthesia. *Br J Anaesth*. 1997; 78:201-19.

Tan DX, Manchester LC, Sainz RM, Mayo JC, Leon J, Reiter RJ. Physiological ischemia/reperfusion phenomena and their relation to endogenous melatonin production: a hypothesis. *Endocrine*. 2005; 27:149-58.

Taskin O, Buhur A, Birincioglu M, Burak F, Atmaca R, Yilmaz I et al. The effects of duration of CO₂ insufflation and irrigation on peritoneal microcirculation assessed by free radical scavengers and total glutathion levels during operative laparoscopy. *J Am Assoc Gynecol Laparosc.* 1998; 5:129-33.

Thelen M, Stein JV. How chemokines invite leukocytes to dance. *Nat Immunol.* 2008; 9:953-9.

Tomas-Zapico C, Coto-Montes A. A proposed mechanism to explain the stimulatory effect of melatonin on antioxidative enzymes. *J Pineal Res.* 2005; 39:99-104.

Turkistani A, Abdullah KM, Al-Shaer AA, Mazen KF, Alkatheri K. Melatonin premedication and the induction dose of propofol. *Eur J Anaesthesiol.* 2007; 24:399-402.

Ure BM, Niewold TA, Bax NM, Ham M, van der Zee DC, Essen GJ. Peritoneal, systemic, and distant organ inflammatory responses are reduced by a laparoscopic approach and carbon dioxide versus air. *Surg Endosc.* 2002; 16:836-42.

Vakkuri O, Leppaluoto J, Kauppila A. Oral administration and distribution of melatonin in human serum, saliva and urine. *Life Sci.* 1985; 37:489-95.

van der Wal JB, Jeekel J. Biology of the peritoneum in normal homeostasis and after surgical trauma. *Colorectal Dis.* 2007; 9 Suppl 2:9-13.

Volz J, Koster S, Spacek Z, Paweletz N. Characteristic alterations of the peritoneum after carbon dioxide pneumoperitoneum. *Surg Endosc.* 1999; 13:611-4.

Waldhauser F, Waldhauser M, Lieberman HR, Deng MH, Lynch HJ, Wurtman RJ. Bioavailability of oral melatonin in humans. *Neuroendocrinology.* 1984; 39:307-13.

Yiannakopoulou E, Nikiteas N, Perrea D, Tsigris C. Effect of laparoscopic surgery on oxidative stress response: systematic review. *Surg Laparosc Endosc Percutan Tech.* 2013; 23:101-8.

Zulfikaroglu B, Koc M, Soran A, Isman FK, Cinel I. Evaluation of oxidative stress in laparoscopic cholecystectomy. *Surg Today.* 2002; 32:869-74.

ANEXO 1 – Parecer consubstanciado do CEP**PARECER CONSUBSTANCIADO CEP/HP 2015**

Caxias do Sul, 18 de novembro de 2015.

Retificação de parecer 31/2011 para alteração de título de projeto

Prezado Pesquisador **Daniel Volquind**

Apresentamos o parecer consubstanciado definitivo referente à análise do projeto de pesquisa, **CAAE: 00613812.7.0000.5331** anteriormente a Plataforma Brasil intitulado **“Ação da melatonina em anestesia para cirurgia de vesícula”** teve seu título modificado para **“Efeitos da melatonina sobre a inflamação e o estresse oxidativo tecidual de pacientes submetidos à laparoscopia cirúrgica”**.

O projeto de pesquisa “Efeitos da melatonina sobre a inflamação e o estresse oxidativo tecidual de pacientes submetidos à laparoscopia cirúrgica”, da área de conhecimento da Medicina/Anestesia, do pesquisador principal Daniel Volquind, pertencente à instituição Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP (tese de doutorado), oriundo do CEP de origem Hospital Pompéia e que será desenvolvido na instituição Hospital Pompéia; tem por objetivo testar se a melatonina em relação ao placebo reduz a resposta inflamatória nos pacientes submetidos à laparoscopia cirúrgica.

Trata-se de um estudo quantitativo, exploratório e descritivo, que constará de um total de 80 pacientes, divididos em 2 grupos de 40 pacientes que serão submetidos à laparoscopia cirúrgica para realização de colecistectomia.

A pesquisa apresenta critérios de inclusão e exclusão, como também os benefícios e os riscos aos sujeitos da pesquisa e os motivos caso seja necessário interrompê-la.

A metodologia proposta está coerente, os procedimentos, tipo de estudo, análise dos resultados e duração da pesquisa estão descritos detalhadamente.

Os sujeitos da pesquisa não denotam grau de vulnerabilidade.

Em relação aos requisitos exigidos nas resoluções do Conselho Nacional de Saúde a respeito da pesquisa com seres humanos, o presente protocolo de pesquisa está instruído de forma adequada e completa, relacionadas com a folha de rosto, título do projeto, nome, número da carteira de identidade, CPF, telefone, email e endereço para

correspondência do pesquisador responsável, nome e assinaturas dos dirigentes da instituição e/ou organização.

O projeto de pesquisa deixa claros os propósitos e hipóteses a serem testados, além de apresentar embasamento teórico científico que o justifique.

A descrição do projeto de pesquisa é detalhada e ordenada. Possui apresentação de introdução (justificativa), material e métodos, casuística e bibliografia.

Estão informadas a análise crítica de riscos e benefícios e a duração total da pesquisa.

O orçamento está detalhado, com definição da fonte e destinação dos recursos, pois possui financiamento da FAPESP.

Há declaração no TCLE de que os resultados da pesquisa serão tomados públicos, sejam eles favoráveis ou não; e há definição sobre o uso e destinação do material e/ou dados coletados.

O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido é específico para esta pesquisa. Há informações claras sobre as circunstâncias sob as quais o consentimento será obtido e quem irá tratar de obtê-lo, assim como a natureza das informações que serão fornecidas aos sujeitos da pesquisa.

Os riscos ao qual a população pesquisada está sujeita são definidos (mesmo o risco sendo mínimo).

Os procedimentos para a segurança da coleta de dados e dos indivíduos, as medidas de proteção à confidencialidade estão descritos de forma completa.

O pesquisador é qualificado, conforme seu currículo. Há documentação de compromisso do pesquisador e da instituição em cumprir os termos das resoluções do Conselho Nacional de Saúde (assinados na Folha de Rosto).

Está definido o responsável pelo atendimento, acompanhamento e recebimento dos sujeitos de pesquisa. Os direitos fundamentais do sujeito de pesquisa (informação, privacidade, recusa inócua, desistência, acesso ao pesquisador e CEP, etc), estão garantidos.

O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido é conciso e objetivo. Sua linguagem é adequada ao nível sociocultural dos sujeitos de pesquisa.

Resultado:

APROVADO

Dr. Osvaldo Simões Pires von Eye
Coordenador do CEP/Hospital Pompéia



ANEXO 2 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

I **Identificação do paciente (RG hospitalar: _____)**

Nome: _____

Endereço: _____

Cidade : _____ **Bairro :** _____

CEP : _____ **Estado :** _____ **Telefone :** _____

E-mail: _____

I **Título da Pesquisa:** Efeitos da melatonina sobre a inflamação e o estresse oxidativo tecidual de pacientes submetidos à laparoscopia cirúrgica

I Explicações do pesquisador ao paciente

O (a) senhor (a) está sendo convidado (a) a participar de uma pesquisa. Toda a cirurgia desenvolve no organismo uma resposta que envolve as defesas do ser humano em relação à cirurgia que está sendo submetido. Esta resposta varia de uma cirurgia para outra e também de um paciente para outro.

Esta pesquisa tem o objetivo de estudar esta resposta do organismo e também a função de um hormônio, que naturalmente é produzido pelo cérebro, chamado melatonina. No entanto, a melatonina quando tomada na forma de cápsulas apresenta um efeito na resposta do organismo frente a uma cirurgia. E é esta resposta que a pesquisa quer verificar.

A melatonina já é aprovada para uso em outras situações clínicas sem causar problemas aos seres humanos.

Para realizar esta pesquisa, antes da anestesia o(a) Sr.(a) receberá 4 (quatro) cápsulas de melatonina. 2 (duas) delas serão tomadas 12 h antes e as outras duas 1h antes da cirurgia. Durante a anestesia, serão coletados exames(biópsia de peritônio parietal) para medir a resposta do seu organismo à cirurgia que estará sendo feita. O estudo não trará danos a você e serão utilizados anestésicos e aparelhos normalmente utilizados em anestesia geral. O médico anestesiológico ficará todo o tempo ao seu lado até o final da cirurgia.

Serão anotados apenas os dados referentes à pesquisa, durante a anestesia; todas as informações obtidas serão mantidas em caráter confidencial e sua identidade será preservada. O pesquisador responsável por este estudo, sempre que solicitado, estará à disposição para esclarecer qualquer questão relacionada à pesquisa. Além disso, você a qualquer

momento, terá total liberdade de recusar ou retirar seu consentimento a sair desta pesquisa, sem que isso lhe traga qualquer tipo de prejuízo.

Os resultados do estudo serão divulgados em congressos científicos e publicados em revistas especializadas, mas sempre preservando a identidade do paciente. Ressaltamos, também, que nem os pesquisadores e nem o paciente receberão qualquer remuneração financeira por participar desta pesquisa.

Consentimento pós-informado

Eu, _____ abaixo assinado, declaro que fui esclarecido sobre o objetivo do presente estudo, sobre eventuais desconfortos que poderei sofrer, assim como sobre os benefícios que podem resultar do estudo. Concordo, portanto, em participar, na qualidade de paciente, do referido Projeto em Pesquisa, sob livre e espontânea vontade.

_____, _____ de _____ de _____.

Assinatura do paciente

Assinatura do pesquisador

Este documento recebeu aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Hospital Pompéia e, foi elaborado em duas vias, sendo que a primeira via será entregue ao paciente e a segunda via será mantida em arquivo pelo pesquisador.

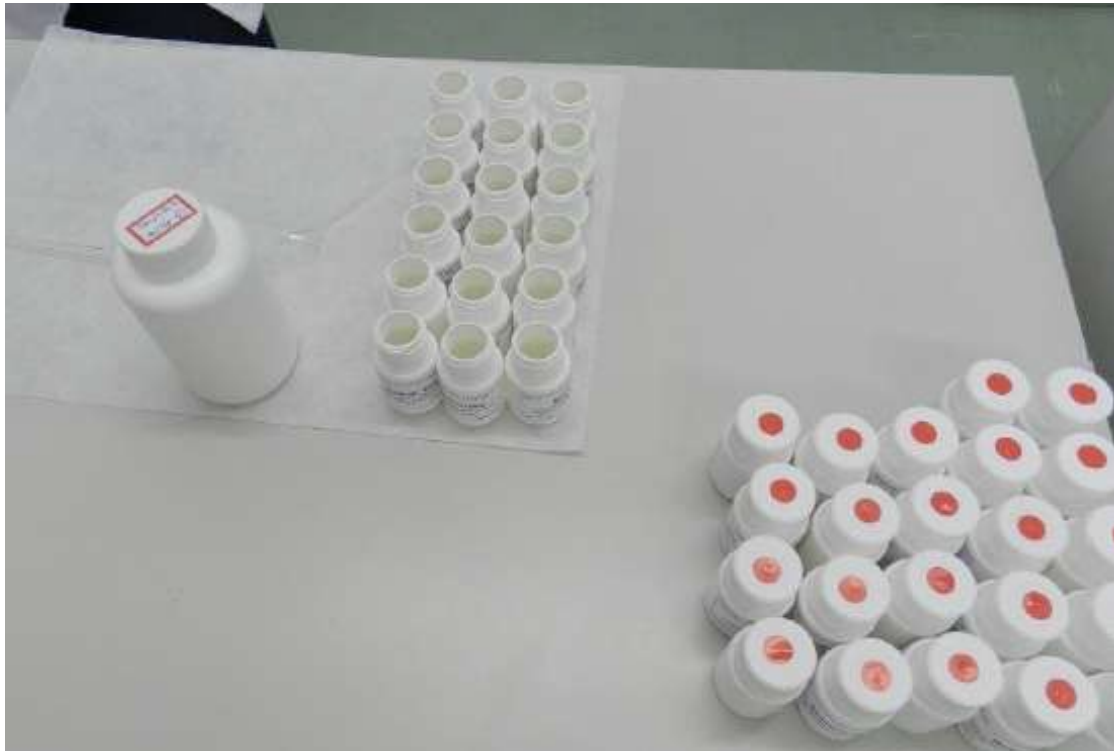
Pesquisador Responsável: Pós-Graduando Daniel Volquind

Pesquisador Orientador: Luiz Antônio Vane, Professor titular do Departamento de Anestesiologia da Faculdade de Medicina, UNESP, Botucatu- SP.

Endereço residencial: Rua Doutor José Aloysio Brugger, 992 apto. 402, Jardim América, Caxias do Sul, Rio Grande do Sul. Telefone: 54-81113072

ANEXO 3 - Randomização do Estudo

Preparo do Frasco com Placebo



ANEXO 4 - Randomização do Estudo

Preparo do Frasco com Melatonina



ANEXO 5 - Randomização do Estudo

Cápsulas de placebo e melatonina



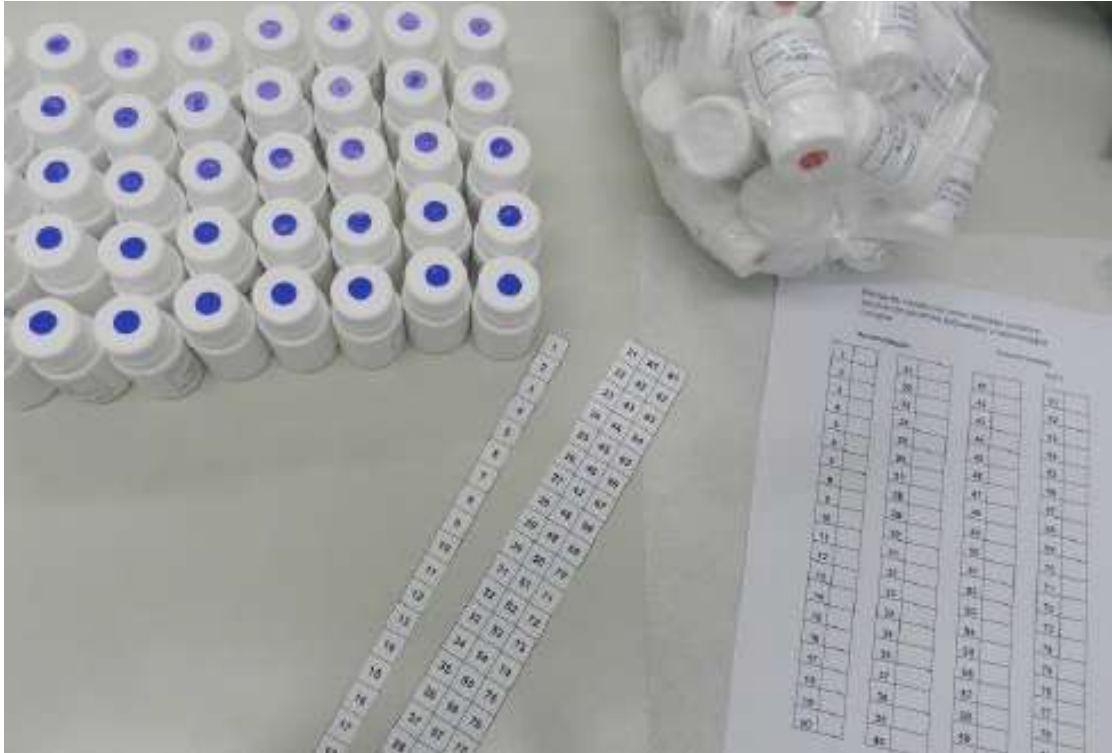
placebo



melatonina

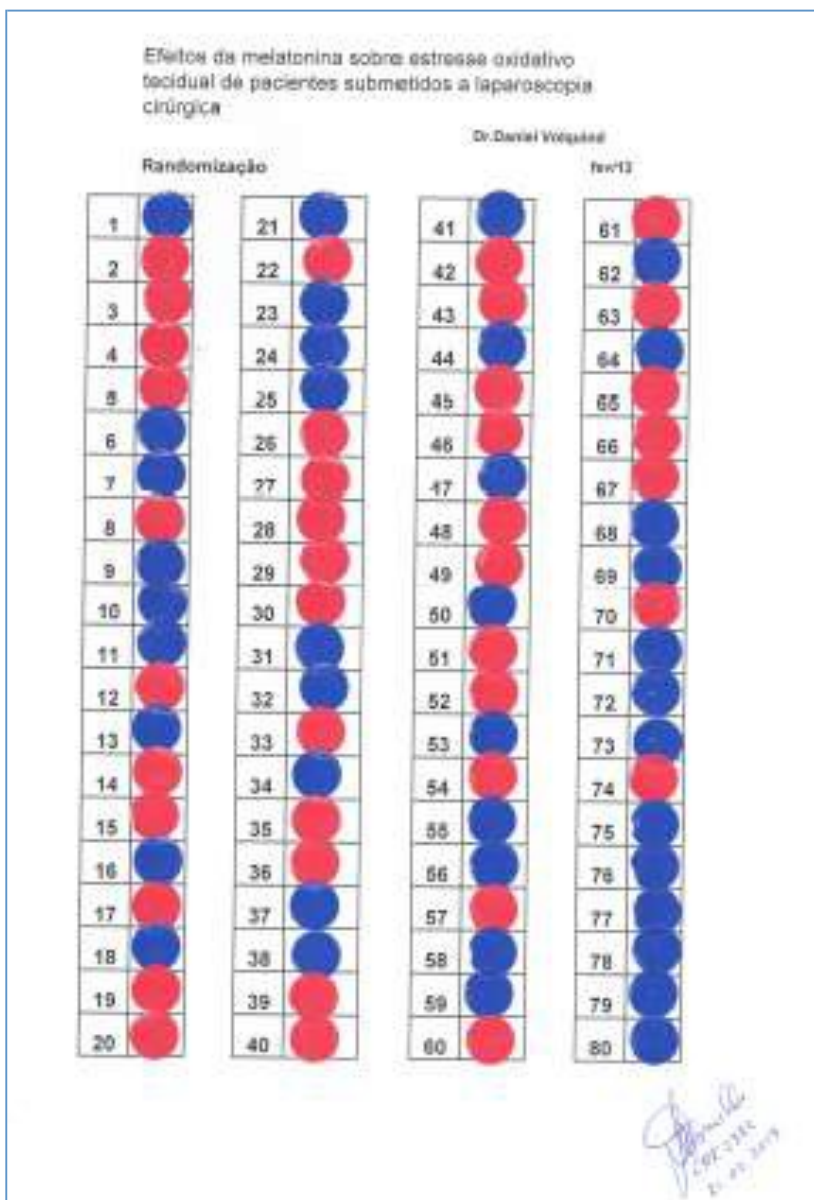
ANEXO 6 - Randomização do Estudo

Mistura dos frascos em saco plástico preto



ANEXO 7 - Randomização do Estudo

Distribuição aleatória dos frascos



ANEXO 8 - Randomização do Estudo

Distribuição dos frascos sem as etiquetas e numerados de 1 a 80



ANEXO 9 - Frascos numerados (1 - 80) entregues ao pesquisador



ANEXO 10 -Frascos com rótulos idênticos entregues ao pesquisador



ANEXO 11 -Frasco com Melatonina ou placebo entregue ao paciente



ANEXO 13 - Lista de randomização

Efeitos da melatonina sobre estresse oxidativo tecidual de pacientes submetidos a laparoscopia cirúrgica

Dr.Daniel Volquind

fev/13

Resultado da Randomização

?	Pote	Id. Paciente	?	Pote	Id. Paciente
	1			41	
	2			42	
	3			43	
	4			44	
	5			45	
	6			46	
	7			47	
	8			48	
	9			49	
	10			50	
	11			51	
	12			52	
	13			53	
	14			54	
	15			55	
	16			56	
	17			57	
	18			58	
	19			59	
	20			60	
	21			61	
	22			62	
	23			63	
	24			64	
	25			65	
	26			66	
	27			67	
	28			68	
	29			69	
	30			70	
	31			71	
	32			72	
	33			73	
	34			74	
	35			75	
	36			76	
	37			77	
	38			78	
	39			79	
	40			80	

ANEXO 14 - Lista de randomização com códigos da patologia

Efeitos da melatonina sobre estresse oxidativo tecidual de pacientes submetidos a laparoscopia cirúrgica		
Resultado da Randomização		
?	Pote	Código
	1	D013614/13
	2	D016253/13
	3	D022195/13
	4	D024071/13
	5	D019133/13
	6	D026416/13
	7	D016251/13
	8	D017391/13
	9	D017751/13
	10	D029306/13
	11	D024070/13
	12	D021543/13
	13	D021229/13
	14	D021228/13
	15	D022193/13
	16	D021140/13
	17	D021400/13
	18	D026417/13
	19	D022194/13
	20	D029305/13
	21	D024830/13
	22	D033415/13
	23	D025169/13
	24	D052429/13
	25	D029750/13
	26	D036829/13
	27	D036827/13
	28	D033416/13
	29	D032700/13
	30	D038410/13
	31	D043759/13
	32	D041160/13
	33	D033412/13
	34	D033414/13
	35	D036826/13
	36	D038424/13
	37	D041164/13
	38	D042800/13
	39	D041163/13
	40	D045743/13
	41	D041165/13
	42	D049754/13
	43	D043288/13
	44	D064597/13
	45	D043760/13
	46	D047933/13
	47	D048741/13
	48	D045744/13
	49	D047934/13
	50	D047932/13
	51	D048748/13
	52	D052350/13
	53	D047931/13
	54	D082685/13
	55	D052351/13
	56	D064598/13
	57	D052431/13
	58	D052430/13
	59	D055507/13
	60	D052432/13
	61	D082413/13
	62	D055162/13
	63	D069097/13
	64	D082417/13
	65	D064600/13
	66	D064599/13
	67	D082684/13
	68	D064589/13
	69	D066311/13
	70	D082416/13
	71	D066290/13
	72	D069090/13
	73	D073089/13
	74	D066314/13
	75	D069098/13
	76	D069089/13
	77	D073093/13
	78	D073095/13
	79	D073094/13
	80	D073090/13

ANEXO 15 – Lâminas preparadas para leitura imuno-histoquímica



Apêndice

Dados Hemodinâmicos

Observação: como informado no texto, em seis pacientes, a análise histopatológica não foi possível ser realizada. Desta forma, as tabelas de dados apresentadas a seguir, estão com setenta e quatro pacientes, sendo trinta e sete em cada grupo.

APÊNDICE 1 - Frequência Cardíaca (bat.min⁻¹) – GRUPO PLA

PACIENTES	FC0	FC1	FC2	FC3	FC4
1	60	59	62	56	58
2	60	56	56	55	69
3	60	63	48	66	65
4	80	66	67	66	59
5	64	64	72	58	85
6	80	82	69	75	69
7	60	72	74	86	92
8	80	73	67	59	58
9	60	66	54	64	60
10	86	95	76	75	74
11	58	64	62	59	56
12	80	77	68	67	65
13	60	81	73	63	64
14	80	95	87	57	67
15	80	108	78	75	75
16	80	73	51	54	57
17	80	61	79	75	65
18	72	56	60	57	58
19	60	63	50	59	54
20	60	57	60	66	63
21	80	78	63	73	70
22	64	71	62	56	58
23	80	66	58	63	53
24	80	88	81	81	79
25	80	81	70	66	69
26	80	84	85	70	64
27	72	65	62	65	60
28	80	63	60	69	63
29	55	48	55	48	56
30	72	66	71	72	71
31	60	71	56	56	51
32	80	88	91	98	99
33	64	53	68	62	55
34	80	59	63	79	70
35	60	60	63	63	52
36	76	65	64	61	61
37	60	61	58	44	46
MÉDIA	70,89189189	70,21621622	66,02702703	65,35135135	64,59459459
DESVIO PADRÃO	9,658447594	12,97635091	10,23371874	10,47059258	10,92841439

APÊNDICE 2 - Frequência Cardíaca (bat.min⁻¹) – GRUPO MEL

PACIENTES	FC0	FC1	FC2	FC3	FC4
1	72	55	59	59	58
2	60	68	65	65	66
3	60	51	48	48	50
4	60	60	59	59	84
5	78	70	67	67	67
6	80	77	75	75	81
7	64	56	49	49	52
8	68	72	69	69	68
9	72	65	61	61	72
10	72	86	71	71	61
11	80	80	68	68	55
12	72	76	69	69	82
13	80	72	54	54	50
14	80	61	61	61	60
15	80	77	75	75	86
16	80	85	78	78	59
17	64	76	71	71	72
18	80	71	71	71	68
19	60	97	89	89	82
20	80	54	58	58	53
21	68	67	66	66	72
22	80	105	80	80	68
23	84	93	73	73	54
24	100	105	89	89	81
25	60	72	58	58	60
26	72	76	54	54	56
27	80	70	72	72	74
28	80	83	76	76	70
29	80	58	60	60	68
30	80	81	91	91	54
31	80	61	54	54	68
32	60	67	57	57	69
33	84	94	85	85	85
34	80	66	72	72	56
35	100	85	82	82	78
36	84	92	75	75	65
37	60	57	60	60	55
MÉDIA	74,97297297	74,08108108	68,13513514	68,13513514	66,45945946
DESVIO PADRÃO	10,18341653	13,89415272	11,03841489	11,03841489	10,67858325

APÊNDICE 3 - Pressão Arterial Sistólica (mmHg) - GRUPO PLA

PACIENTES	PAS0	PAS1	PAS2	PAS3	PAS4
1	140	141	96	96	97
2	140	121	84	94	87
3	110	131	72	88	85
4	160	168	103	81	132
5	140	141	109	113	132
6	110	126	95	103	91
7	140	170	89	104	140
8	130	129	114	84	95
9	130	118	61	99	96
10	142	149	104	110	93
11	120	136	104	113	93
12	130	128	68	85	86
13	130	139	126	113	89
14	110	135	117	105	95
15	120	143	126	101	105
16	180	150	90	100	94
17	110	127	83	120	108
18	120	107	94	136	88
19	140	129	103	108	95
20	120	122	107	123	103
21	110	129	94	95	89
22	130	140	113	95	107
23	140	135	102	99	96
24	150	160	82	148	107
25	120	124	114	91	93
26	110	133	93	90	88
27	110	144	91	82	91
28	110	123	90	90	102
29	140	158	94	148	119
30	110	119	88	90	86
31	120	124	91	125	96
32	100	123	99	115	113
33	140	114	107	90	84
34	110	111	110	82	92
35	120	158	98	81	95
36	110	118	102	105	74
37	140	141	107	101	96
MÉDIA	126,8108108	134,1621622	97,83783784	102,7837838	98,16216216
DESVIO PADRÃO	16,81993322	15,19159354	14,1831905	17,02483898	13,83593737

APÊNDICE 4 - Pressão Arterial Sistólica (mmHg) - GRUPO MEL

PACIENTES	PAS0	PAS1	PAS2	PAS3	PAS4
1	110	114	84	100	104
2	120	134	130	94	105
3	150	162	89	123	92
4	142	137	95	124	95
5	120	124	92	83	109
6	130	123	86	124	108
7	150	163	119	124	109
8	120	129	80	110	104
9	150	152	132	100	126
10	120	146	92	112	99
11	130	124	86	91	122
12	110	131	85	93	98
13	130	126	87	95	80
14	100	96	112	110	97
15	110	111	84	112	87
16	100	147	93	120	95
17	120	115	93	88	105
18	120	135	107	98	106
19	100	121	136	111	102
20	110	139	123	73	110
21	140	132	102	97	101
22	120	114	100	81	97
23	120	135	102	90	104
24	140	135	109	108	96
25	120	127	91	81	86
26	120	139	88	111	114
27	110	111	95	89	102
28	120	102	89	83	130
29	110	137	117	114	114
30	120	129	115	80	93
31	120	122	95	82	104
32	120	125	101	98	90
33	130	133	98	87	91
34	160	137	117	83	100
35	100	115	117	95	90
36	120	117	94	99	96
37	120	129	82	96	92
MÉDIA	122,4864865	128,8648649	100,4594595	98,89189189	101,4324324
DESVIO PADRÃO	14,66310247	14,35112231	14,98394563	14,16845332	10,64041388

APÊNDICE 5 – Pressão Arterial Diastólica (PAD) (mmHg) – GRUPO PLA

PACIENTES	PAD0	PAD1	PAD2	PAD3	PAD4
1	80	82	58	68	55
2	80	67	64	44	63
3	70	82	41	49	51
4	100	106	63	52	75
5	80	86	68	72	80
6	70	78	53	68	54
7	80	109	62	76	87
8	80	81	64	46	52
9	100	72	39	59	56
10	80	94	64	63	55
11	70	84	73	78	61
12	80	76	42	56	55
13	80	78	82	74	54
14	60	93	80	71	52
15	70	85	71	63	66
16	100	85	54	57	59
17	70	73	48	66	50
18	80	66	53	87	46
19	80	77	60	68	56
20	80	77	74	83	64
21	70	78	53	55	45
22	80	101	71	52	67
23	80	83	55	63	60
24	90	87	51	88	60
25	80	75	73	59	54
26	80	81	58	61	61
27	80	71	52	58	63
28	60	77	65	62	57
29	80	84	56	91	70
30	70	79	52	50	47
31	80	77	48	71	57
32	60	75	56	67	72
33	100	69	65	54	49
34	70	63	74	52	62
35	80	99	60	44	57
36	64	68	52	57	64
37	80	75	58	57	46
MÉDIA	78,21621622	80,89189189	59,78378378	63,27027027	58,97297297
DESVIO PADRÃO	10,18513791	10,51841059	10,35618404	11,97891988	9,240002593

APÊNDICE 6 – Pressão Arterial Diastólica (PAD) (mmHg) – GRUPO MEL

PACIENTES	PAD0	PAD1	PAD2	PAD3	PAD4
1	80	72	54	62	66
2	70	75	79	56	66
3	90	94	56	81	62
4	85	81	58	88	63
5	80	72	51	58	50
6	70	76	52	72	62
7	80	79	59	60	54
8	80	75	49	65	60
9	80	88	80	63	70
10	80	85	54	68	58
11	80	70	52	57	60
12	80	80	51	53	54
13	80	90	47	65	40
14	60	66	79	76	60
15	70	88	55	74	56
16	60	82	56	79	58
17	80	81	57	60	63
18	80	87	65	63	64
19	60	73	89	73	64
20	80	67	70	46	59
21	90	76	76	56	59
22	70	67	59	51	56
23	70	78	60	51	65
24	90	84	64	60	56
25	80	78	58	52	50
26	80	80	50	67	68
27	70	67	53	48	64
28	80	71	74	54	74
29	80	81	77	82	73
30	80	83	68	46	58
31	80	80	67	49	53
32	70	75	57	58	48
33	90	83	59	48	42
34	100	78	82	52	62
35	60	69	64	67	54
36	80	69	52	64	57
37	80	74	48	60	58
MÉDIA	77,7027027	77,67567568	61,64864865	61,72972973	59,08108108
DESVIO PADRÃO	8,898420342	6,971191895	10,96977719	10,65338076	7,30190045

APÊNDICE 7 - Pressão Arterial Média (PAM) (mmHg) – GRUPO PLA

PACIENTES	PAM1	PAM2	PAM3	PAM4
1	108	65	71	69
2	82	78	62	73
3	103	50	64	62
4	126	79	63	101
5	109	82	87	98
6	95	70	77	66
7	130	70	85	107
8	97	80	59	67
9	89	44	71	48
10	116	78	76	71
11	102	83	99	72
12	92	51	70	69
13	98	97	87	66
14	112	92	83	68
15	104	90	76	79
16	107	66	72	71
17	99	62	89	77
18	80	67	104	60
19	94	74	81	69
20	92	85	96	77
21	95	67	68	60
22	118	83	72	80
23	103	69	76	72
24	105	65	109	76
25	91	86	69	67
26	98	69	71	70
27	84	64	67	75
28	92	72	75	72
29	121	68	110	90
30	92	64	64	60
31	94	60	87	72
32	91	71	83	86
33	84	79	66	61
34	79	86	62	72
35	118	72	56	70
36	85	69	73	79
37	97	74	72	62
MÉDIA	99,51351351	72,45945946	77,08108108	72,81081081
DESVIO PADRÃO	12,63119609	11,39367913	13,40911021	11,60111327

APÊNDICE 8 - Pressão Arterial Média (PAM) (mmHg) – GRUPO MEL

PACIENTES	PAM1	PAM2	PAM3	PAM4
1	87	66	77	80
2	94	96	69	79
3	120	70	101	78
4	99	70	99	74
5	87	70	69	73
6	92	63	89	77
7	107	79	81	72
8	95	59	76	74
9	109	97	75	83
10	105	67	83	72
11	88	63	68	81
12	97	62	67	68
13	72	63	77	60
14	76	88	89	71
15	97	65	94	78
16	104	69	92	70
17	93	71	71	71
18	103	107	79	80
19	89	105	86	76
20	91	88	55	76
21	95	75	69	73
22	83	73	61	70
23	97	74	64	78
24	82	79	76	69
25	94	69	62	62
26	99	61	85	85
27	81	67	62	77
28	81	79	64	93
29	94	89	92	84
30	98	84	57	70
31	94	78	60	79
32	91	72	73	62
33	100	72	61	58
34	97	94	62	75
35	84	82	76	66
36	85	66	75	70
37	93	59	72	69
MÉDIA	93,32432432	75,43243243	74,81081081	73,86486486
DESVIO PADRÃO	9,401132922	12,53005153	11,93413872	7,147716181

Dados de Ventilação

APÊNDICE 9 – Fração expirada de oxigênio (ETCO₂) (mmHg) – GRUPO PLA

PACIENTES	ET2	ET3	ET4
1	34	35	32
2	29	32	39
3	30	37	36
4	29	37	33
5	34	39	33
6	35	40	34
7	34	44	43
8	35	40	40
9	35	38	44
10	34	38	40
11	31	34	32
12	28	30	35
13	36	37	40
14	29	34	35
15	32	42	35
16	36	37	40
17	34	36	32
18	34	32	39
19	26	40	44
20	29	44	36
21	29	41	41
22	32	34	36
23	32	34	32
24	27	40	34
25	30	42	46
26	32	28	40
27	35	43	38
28	29	31	38
29	34	41	38
30	30	33	30
31	32	42	37
32	33	35	35
33	31	43	40
34	36	42	49
35	32	35	32
36	35	32	35
37	26	30	34
MÉDIA	31,86486486	37,08108108	37,21621622
DESVIO PADRÃO	2,858483459	4,345724077	4,33175038

APÊNDICE 9 – Fração expirada de oxigênio (ETCO₂) (mmHg) – GRUPO MEL

PACIENTES	ET2	ET3	ET4
1	39	36	34
2	30	31	36
3	34	35	37
4	36	43	35
5	29	32	37
6	30	36	39
7	35	40	38
8	32	34	38
9	28	39	45
10	32	41	37
11	29	35	38
12	32	42	44
13	33	29	29
14	31	37	37
15	32	38	31
16	31	31	30
17	35	35	35
18	35	40	44
19	31	45	30
20	30	36	42
21	30	33	45
22	33	36	31
23	35	34	41
24	36	34	37
25	27	36	30
26	37	43	33
27	35	34	35
28	36	39	43
29	36	38	38
30	31	36	35
31	29	35	39
32	25	47	40
33	33	38	29
34	31	37	43
35	28	32	34
36	26	30	41
37	34	35	34
MÉDIA	32,05405405	36,54054054	36,86486486
DESVIO PADRÃO	3,221095549	4,064311348	4,598249738

APÊNDICE 10 – Saturação periférica de oxigênio (SPO₂) (%) – GRUPO PLA

PACIENTES	SP1	SP2	SP3	SP4
1	97	98	98	98
2	97	97	93	94
3	96	99	97	98
4	99	99	98	99
5	95	98	98	98
6	99	98	99	99
7	94	99	97	99
8	97	98	97	96
9	100	100	98	99
10	97	99	99	99
11	96	98	98	98
12	94	98	99	99
13	97	98	98	98
14	96	99	98	98
15	96	99	98	98
16	90	98	97	97
17	97	99	100	99
18	94	98	99	97
19	98	97	97	97
20	98	98	98	97
21	96	98	98	97
22	97	99	98	99
23	97	99	99	99
24	97	99	99	99
25	97	100	99	99
26	97	98	99	98
27	97	98	98	98
28	98	99	99	99
29	98	99	99	99
30	99	100	98	98
31	97	99	98	98
32	99	99	99	99
33	96	99	98	98
34	98	99	98	98
35	98	99	97	98
36	97	98	98	98
37	98	98	98	97
MÉDIA	96,83783784	98,56756757	98,05405405	98,05405405
DESVIO PADRÃO	1,778452311	0,71812596	1,113697177	1,038344471

APÊNDICE 10 – Saturação periférica de oxigênio (SPO₂) (%) – GRUPO MEL

PACIENTES	SP1	SP2	SP3	SP4
1	99	99	99	99
2	99	97	97	97
3	98	99	99	99
4	98	100	100	100
5	97	98	96	97
6	94	98	98	98
7	96	99	98	98
8	99	99	99	99
9	98	100	99	98
10	97	100	100	100
11	98	98	97	97
12	97	99	99	98
13	100	100	99	99
14	95	99	99	98
15	99	100	100	99
16	97	100	99	99
17	97	99	98	98
18	97	99	98	98
19	98	99	99	98
20	98	99	97	98
21	97	98	98	98
22	96	97	97	97
23	97	99	98	98
24	99	98	99	98
25	99	98	98	98
26	98	99	99	99
27	99	99	99	99
28	99	97	98	98
29	95	99	99	99
30	99	99	99	98
31	95	98	97	97
32	94	99	98	98
33	98	100	98	99
34	97	98	98	98
35	99	100	99	99
36	100	100	100	100
37	95	98	100	98
MÉDIA	97,48648649	98,83783784	98,48648649	98,32432432
DESVIO PADRÃO	1,587478395	0,885728087	0,975971356	0,807199163

Dados do Pneumoperitônio

APÊNDICE 11 - Pressão intra-abdominal (mmHg)

PACIENTES	Grupo PLA PP3	Grupo MEL PP3
1	12	15
2	11	12
3	14	11
4	14	13
5	9	15
6	14	12
7	14	13
8	13	14
9	12	11
10	14	9
11	15	11
12	14	10
13	12	14
14	14	12
15	13	9
16	14	15
17	10	12
18	14	14
19	15	15
20	15	16
21	11	14
22	12	11
23	14	12
24	16	14
25	12	10
26	14	12
27	15	13
28	12	14
29	14	16
30	14	14
31	15	12
32	16	11
33	14	13
34	15	12
35	13	13
36	14	15
37	11	12
MÉDIA	13,37837838	12,72972973
DESVIO PADRÃO	1,599853901	1,810609105

APÊNDICE 12 - Tempo de pneumoperitônio (min)

PACIENTES	Grupo PLA	Grupo MEL
	TP	TP
1	30	35
2	50	25
3	30	30
4	50	35
5	45	30
6	35	35
7	40	120
8	45	20
9	40	55
10	20	30
11	40	55
12	40	25
13	25	35
14	30	30
15	35	30
16	25	25
17	30	40
18	30	30
19	30	40
20	25	40
21	30	25
22	30	40
23	25	45
24	30	50
25	25	35
26	25	30
27	25	60
28	40	30
29	50	35
30	30	30
31	40	60
32	25	35
33	30	40
34	30	20
35	25	40
36	40	30
37	30	45
MÉDIA	33,10810811	38,24324324
DESVIO PADRÃO	7,999269506	16,89459438

Dados das Análises Teciduais

APÊNDICE 13 - GPLA (n=37)

Caso	Inflama	Linfo- plasm	Neutro	Vasos	Edema endot	MelatonR1A intensidade	MelatR1B intensidade
38410	0	0	0	+/4+	++/+4	++	+
38424	+	+	0	++	++	++	+
36829	+	+	0	+++	++	++	+
36827	0	0	0	+	++	++	+
36826	+	+	0	++	++	++	+
33416	+	+	0	++	++	++	+
33415	+	+	0	++	++	++	+
33412	+	+	0	++	++	++	+
32700	+	+	0	++	++	++	+
22195	+	+	0	++	++	++	+
22194	+	+	0	++	++	++	+
21543	++	++	0	++	++	++	+
21228	++	++	0	++	++	++	+
22193	+	+	0	++	++	++	+
29305	++	++	0	++	++	++	+
24071	+	+	0	++	++	++	+
19133	++	++	0	++	++	++	+
21400	++	++	0	++	++	++	+
52350	++	++	0	++	+	++	+
52431	0	0	0	0	0	++	+
52432	++	++	0	++	++	++	+
41163	+	+	0	++	++	++	+
45744	+	+	0	+++	++	++	+
49754	++	++	0	++	++	++	+
43760	++	++	0	++	++	++	+
48748	0	0	0	0	0	++	+
45743	++	++	0	++	++	++	+
43288	+	+	0	++	++	++	+
82684	++	++	0	++	++	++	+
82416	+	+	0	++	++	++	+
82413	++	++	0	++	++	++	+
69097	+	+	0	++	+	++	+
64599	+	+	0	++	+	++	+
66314	++	++	0	++	++	++	+
64600	++	++	0	++	++	++	+
82685	++	++	0	++	++	++	+
17391	+	+	0	++	++	++	+

APÊNDICE 14 - GMEL (n=37)

Caso	Inflama	Linfo- plasm	Neutro	Vasos	Edema endot	MelatonR1A intensidade	MelatR1B intensidade
33414	0	0	0	+	0	++	+
17751	+	+	0	+	+	++	+
16251	+	+	0	+	+	++	+
13614	+	+	0	+	+	++	+
25169	0	0	0	+	+	++	+
26416	++	++	0	+	+	++	+
21229	0	0	0	+	+	++	+
24830	+	+	0	+	+	++	+
24070	+	+	0	+	+	++	+
26417	+	+	0	+	+	++	+
29750	+	+	0	++	+	++	+
21140	0	0	0	0	0	++	+
52429	+	+	0	+	+	++	+
52351	0	0	0	+	+	++	+
52430	0	0	0	+	+	++	+
43759	+	+	0	++	+	++	+
41164	0	0	0	+	+	++	+
48741	0	0	0	+	+	++	+
41160	0	0	0	+	+	++	+
47931	+	+	0	+	+	++	+
41165	+	+	0	+	+	++	+
47932	+	+	0	+	+	++	+
73094	0	0	0	0	0	++	+
64597	0	0	0	+	0	++	+
55162	0	0	0	0	0	++	+
73095	++	++	0	++	++	++	+
73089	0	0	0	+	+	++	+
69098	0	0	0	+	0	++	+
82417	0	0	0	+	0	++	+
69090	+	+	0	+	+	++	+
69089	0	0	0	0	0	++	+
55507	0	0	0	+	+	++	+
66311	+	+	0	+	+	++	+
64589	0	0	0	+	+	++	+
64598	0	0	0	+	+	++	+
73090	+	+	0	+	+	++	+
73093	+	+	0	0	0	++	+