



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DO ARAGUAIA
Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Básicas
Aplicadas

**EFEITO DA MELATONINA EM CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE
MATERNO E DA PLACENTA DE MÃES DIABÉTICAS.**

Martino B Pierre Louis

Barra do Garças – MT
2018

**EFEITO IMUNOMODULADORA MELATONINA EM CÉLULAS
MONONUCLEARES DO SANGUE MATERNO E DA PLACENTA DE MÃES
DIABÉTICAS.**

Martino B Pierre Louis

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Básicas e Aplicadas do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde do Campus Universitário do Araguaia/UFMT, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Imunologia e Parasitologia Básicas e Aplicadas.

ORIENTADORA: Prof. Dra. Adenilda Cristina Honorio França

Assinatura do Orientador: -----

Barra do Garças-MT

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Fonte.

P622e Pierre Louis, Martino B.
EFEITO DA MELATONINA EM CÉLULAS
MONONUCLEARES DO SANGUE MATERNO E DA
PLACENTA DE MÃES DIABÉTICAS. / Martino B Pierre Louis. -
- 2018
ix, 43 f. : il. color. ; 30 cm.

Orientadora: Prof. Dra. Adenilda Cristina Honorio França.
Co-orientador: Prof.Dr. Eduardo Luzia França.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Mato Grosso,
Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Programa de Pós-
Graduação em Imunologia e Parasitologia Básicas e Aplicadas,
Barra do Garças, 2018.
Inclui bibliografia.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Permitida a reprodução parcial ou total, desde que citada a fonte.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DO ARAGUAIA
Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Básicas Aplicada

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: EFEITO DA MELATONINA EM CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE MATERNO E DA PLACENTA DE MÃES DIABÉTICAS.

Autor: Martino B Pierre Louis

Orientadora: Prof. Dra. Adenilda Cristina Honorio França

Aprovado em 01 de março, 2018

Comissão examinadora:

Prof. Dra. Adenilda Cristina Honorio França
Orientadora

Prof. Dra. Cristiane de Castro Pernet Hara
Examinadora externa

Prof. Dra. Danny Laura Gomes Fagundes Triches
Examinadora

Barra do Garças – MT
2018

AGRADECIMENTOS

A Deus por minha vida e por ter me dado saúde e forças para superar as dificuldades da Vida.

A toda minha família por todo o incentivo, carinho que me ofereceram durante essa fase da minha vida. Todos são muito especiais.

Ao Programa de Alianças para a Educação e a Capacitação (Bolsas Brasil - PAEC OEA-GCUB) cooperação entre a Organização dos Estados Americanos (OEA), a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS/OMS) e o Grupo Coimbra de Universidades Brasileiras (GCUB) pela oportunidade de entrar nesse programa de pós-graduação.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela ajuda econômica. Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), o Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Básicas e Aplicadas (PPGIP) por todas as ajudas que nos tem proporcionado pelo desenvolvimento do projeto.

A Universidade Federal de Mato Grosso, a todo seu corpo docente, direção e administração que oportunizaram a realização de um sonho, minha pós-graduação em imunologia e parasitologia básica e aplicada. Em especial a todos os professores da pós-graduação por me ensinarem não apenas o conhecimento científico, mas a manifestação de caráter e afetividade durante o processo da minha formação profissional.

A minha professora orientadora Dr^a Adenilda Cristina Honório França, pela paciência, dedicação, incentivo e sabedoria. Obrigado por ter acreditado em mim, compartilhando comigo as suas idéias, conhecimento e experiências. Agradeço também ao professor Dr Eduardo Luzia França por sempre incentivar ao conhecimento e sempre disponível a qualquer hora para ajudar. A Professora Dr^a Iracema de Mattos Paranhos Calderon por todo o apoio e ajuda. Eu expresso minha admiração, meu profundo reconhecimento e minha eterna gratidão, pela suas competências e seus profissionalismos. Vocês são um exemplo de profissional.

A todos do Laboratório de Saúde Materno Infantil e Biomodulação, que de alguma forma contribuíram para a realização desse estudo. Em especial agradeço a Adriele Queiroz Ataides, pela sua ajuda e participação direta nos experimentos desde o começo que sem você este trabalho não teria chegado ao fim, Lucas e Mahmi que participaram diretamente na efetivação desse trabalho e que sempre estão disponíveis para ajudar, muito obrigado.

Aos professores formadores da banca examinadora pela presença e pelo apoio.

A todos que direto ou indiretamente fizeram parte da minha formação, e minha conquista.

RESUMO

Diabetes mellitus é um grupo heterogêneo de distúrbios metabólicos que apresenta em comum a hiperglicemia que quando associada a gestação pode ocasionar diversas complicações, tanto para a mãe quanto ao feto. As gestantes diabéticas têm maior risco de complicações associadas a placenta. Durante a gravidez, a hiperglicemia materna pode alterar o metabolismo oxidativo celular na interface materno-fetal levando ao estresse oxidativo com desequilíbrio na formação de espécies reativas de oxigênio (EROS) e na defesa antioxidante. Estudos relatam efeitos do hormônio melatonina sobre os mecanismos pro e antioxidantes de células, porém os efeitos deste hormônio sobre células mononucleares (MN) do sangue materno e da placenta de mães diabéticas ainda são parcialmente compreendidos. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar em gestações complicadas por *diabetes mellitus*, o estresse oxidativo e a indução de apoptose em células mononucleares do sangue materno e células da placenta modulados por melatonina. Foram avaliadas 40 gestantes distribuídas nos grupos: não-diabético (ND; N = 20) e diabetes mellitus tipo 2 (DMT2; N = 20). As células do sangue e da placenta foram obtidas por gradiente de densidade e mantidas em cultura durante 24 horas em estufa (5% CO₂), na presença ou ausência da melatonina (100 ng/mL). O estresse oxidativo foi avaliado através da liberação do ânion superóxido e pela determinação da enzima CuZn superóxido dismutase (SOD) no sobrenadante de cultura. A apoptose foi avaliada por citometria de fluxo. Observou-se que a hiperglicemia materna aumentou a liberação de superóxido, reduziu a concentração de SOD, a relação SOD/O₂⁻ e aumentou a apoptose em células MN do sangue materno. A melatonina foi capaz de reduzir o estresse oxidativo e os índices de apoptose em células MN do sangue materno de mães diabéticas. Na camada materna da placenta (extravilosa) houve redução de SOD e da relação SOD/O₂⁻. A melatonina restaurou as concentrações desta enzima. Houve maior liberação de superóxido, redução da relação SOD/O₂⁻ e de apoptose em células MN da camada fetal (vilosa) da placenta de mães diabéticas. A melatonina foi capaz de atuar em células do tecido placentário aumentando os índices de apoptose na camada vilosa da placenta de mães diabéticas. Estes dados sugerem que a hiperglicemia foi capaz de alterar o balanço entre a produção de ânion superóxido e a enzima superóxido dismutase (SOD) em sangue materno e na placenta de mães diabéticas. Estas alterações refletiram nos mecanismos de indução de apoptose e foram modulados pela melatonina, o que provavelmente pode estar favorecendo a manutenção e o desenvolvimento do feto em gestações de mães diabéticas.

Palavras-Chave: Apoptose, Células Mononucleares, Diabetes, Melatonina, Placenta, Sangue

ABSTRACT

Diabetes mellitus is a heterogeneous group of metabolic disorders that presents in common the hyperglycemia that when associated with gestation can cause several complications for both mother and fetus. Diabetic pregnant women are at higher risk of complications associated with placenta. During pregnancy, maternal hyperglycemia can alter cellular oxidative metabolism at the maternal-fetal interface leading to oxidative stress with imbalance in the formation of reactive oxygen species (ROS) and antioxidant defense. Studies report the effects of the hormone melatonin on the pro and antioxidant mechanisms of cells, but the effects of this hormone on mononuclear (MN) cells of maternal blood and placenta of diabetic mothers are still partially understood. Thus, the objective of this study was to evaluate in pregnancies complicated by diabetes mellitus, oxidative stress and the induction of apoptosis in maternal blood mononuclear cells and placental cells modulated by melatonin. A total of 40 pregnant women were included in the groups: non-diabetic (ND, N = 20) and type 2 diabetes mellitus (DM2, N = 20). Blood and placenta cells were obtained by density gradient and maintained in culture for 24 hours in a hothouse (5% CO₂), in the presence or absence of melatonin (100 ng / mL). Oxidative stress was evaluated by the release of the superoxide anion and by the determination of CuZn superoxide dismutase (SOD) in the culture supernatant. Apoptosis was assessed by flow cytometry. Maternal hyperglycemia was observed to increase superoxide release, reduced SOD concentration and SOD / O₂⁻ ratio and increased apoptosis in MN cells from maternal blood. Melatonin was able to reduce oxidative stress and apoptosis rates in MN cells in the maternal blood of diabetic mothers. In the maternal layer of placenta (extravillosa) there was reduction of SOD and SOD / O₂⁻ ratio and melatonin restored the concentrations of this enzyme. There was greater release of superoxide, reduction of the SOD / O₂ ratio, and apoptosis in MN cells of the fetal (villous) layer of the placenta of hyperglycemic mothers. Melatonin was able to act on placental tissue cells by increasing apoptosis rates in the villous layer of the placenta of hyperglycemic mothers. These data suggest that hyperglycemia was able to alter the balance between superoxide anion production and the enzyme superoxide dismutase (SOD) in maternal blood and in the placenta of diabetic mothers. These changes reflected in the mechanisms of induction of apoptosis and were modulated by the melatonin hormone. It is possible that this hormone acts in this process favoring the maintenance and development of the fetus in pregnancies of diabetic mothers.

Key Words: Apoptosis, Mononuclear Cells, Diabetes, Melatonin, Placenta and Blood.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Liberação de superóxido pelas células MN tratadas ou não pela melatonina do sangue materno de mães diabéticas.....	25
Figura 2- Liberação de superóxido pelas células MN da camada vilosa da placenta.....	26
Figura 3- Liberação do ânion superóxido pelas células MN da camada extravilosa da placenta.....	27
Figura 4- Relação de liberação de superóxido pelas células MN entre placenta vilosa/placenta extravilosa.....	29
Figura 5- Relação da enzima superóxido dismutase entre a camada vilosa e camada extravilosa da placenta.....	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados clínicos maternos e dos recém-nascidos do grupo não-diabético (ND) e Diabetes Mellitus tipo II (DMT2)	24
Tabela 2 -Concentração de Superoxide dismutase (SOD) no sobrenadante de cultura de células MN tratadas ou não pela melatonina de sangue e de placenta de mães diabéticas.....	28
Tabela 3 - Relação entre Superoxido dismutase (SOD) e liberação de ânion superóxido(O_2^-) no sobrenadante de cultura de células MN tratadas ou não pela melatonina de sangue e de placenta de mães diabéticas	31
Tabela 4 - Índice de viabilidade (%) e deapoptose (%) de células MNtratadas por melatonina do sangue materno e da placenta dos grupos não-diabético (ND) e Diabetes Mellitus tipo II (DMT2).....	32

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADA	Associação Americana de Diabetes
CONEP	Conselho Nacional de ética em Pesquisa
DM	<i>Diabetes Mellitus</i>
DMT1	<i>Diabetes Mellitus</i> do tipo 1
DMT2	<i>Diabetes Mellitus</i> do tipo 2
DMG	<i>Diabetes Mellitus</i> Gestacional
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EROS	Espéciesreativasdeoxigênio
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
IDF	Federação Internacional de Diabetes
FMB	Faculdade de Medicina de Botucatu
Hb A1C	Hemoglobina Glicada
HGL	Hiperglicemia Gestacional Leve
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IMC	Índice de massa corporal
MLT	Melatonina
MN	Mononuclear
MG	Média glicêmica
NBT	Nitro Blue Tetrazolium
ND	. Não diabéticas
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Solução Salina Tamponada
PG	Perfil Glicêmico
Rpm	Rotações por minuto
SDB	Sociedade Brasileira de Diabetes
SOD	Enzima Superóxido Dismutase
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TOTG	Teste Oral de Tolerância a Glicose

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO	10
2- OBJETIVOS	17
2.1 Objetivo geral.....	17
2.2 Objetivos específicos.....	17
3. METODOLOGIA	18
3.1 Desenho do estudo	18
3.2 Amostras.....	18
3.3 Critérios de inclusão, exclusão e descontinuidade.	18
3.3.1 Critérios de inclusão	18
3.3.2 Critérios de exclusão	19
3.3.3 Critérios de descontinuidade	19
3.4 Definição das variáveis.....	19
3.4.1 Variáveis de controle	19
3.4.2 Variáveis independentes	19
3.4.3 Variáveis dependentes	19
3.5.2 Obtenção de células MN do sangue materno	20
3.5.3 Obtenção de células MN da Placenta	20
3.5.4 Incubação das células MN com melatonina exogena	21
3.5.5 Dosagem de ânion superóxido	21
3.5.6 Enzima Superóxido Dismutase (Cu-Zn-SOD).....	22
3.5.8 Análise Estatística	23
3.5.9 Aspectos Éticos	23
4 RESULTADOS	24
5- DISCUSSÃO	33
6- CONCLUSÕES	38
7- REFERÊNCIAS	39

1- INTRODUÇÃO

Diabetes mellitus (DM) é um grupo heterogêneo de distúrbios metabólicos que apresenta em comum a hiperglicemia, resultante de defeitos na ação da insulina, na secreção de insulina ou em ambas (ADA, 2012). Quando se apresenta em um estado grave expõe sintomas clássicos como, poliúria, polifagia, polidipsia, perda de peso e visão turva ou pode ter algumas complicações como a cetoacidose diabética, e em estados crônicos pode levar a danos e disfunção de alguns tecidos e órgãos como, olhos, rins, nervos, vasos sanguíneos e coração (GROSS *et al.*, 2002).

Uma epidemia de diabetes mellitus (DM) está em curso. Atualmente, estima-se que a população mundial com diabetes seja da ordem de 387 milhões e que alcance 471 milhões em 2035. Cerca de 80% desses indivíduos vivem em países em desenvolvimento, onde a epidemia tem maior intensidade e há uma crescente proporção de pessoas acometidas em grupos etários mais jovens (IDF, 2014). O número de diabéticos está aumentando em virtude do crescimento e do envelhecimento populacional, da urbanização, da progressiva prevalência de obesidade e sedentarismo, bem como da maior sobrevida de pacientes com DM.

Estudo recente realizado em 2014 pela federação internacional de diabetes (IDF) em seis capitais brasileiras, com servidores de universidades públicas, na faixa etária de 35 a 74 anos, encontrou uma prevalência de cerca de 20%, e aproximadamente metade dos casos sem diagnóstico prévio e estimou-se que existiriam 11,9 milhões de pessoas, na faixa etária de 20 a 79 anos, com diabetes no Brasil (IDF, 2014). Segundo Franco (2008) o diabetes gestacional incide de forma global 5% a 10% das gestações, e de acordo com a (OMS) Organização Mundial da Saúde corresponde a 7,6% das gestações. No Brasil representa 37% das mortes maternas, e sua prevalência depende da etnia.

O diagnóstico da diabetes basicamente se baseia em alterações de glicose plasmática em jejum, glicemia pós-prandial ou após 2 horas de sobrecarga de 75 g de glicose oral (TOTG) (ADA, 2014). Existe também o teste de hemoglobina glicada (Hb A1C), que fornece dados sobre os níveis de glicose sanguínea de um indivíduo ao longo de 3 meses (NIH, 2014). A classificação proposta pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e pela Associação Americana de Diabetes (ADA, 2012), inclui quatro classes clínicas: DM tipo 1 (DM1), DM tipo 2 (DM2), outros tipos específicos de DM e diabetes mellitus gestacional (DMG). Há ainda duas categorias, referidas como pré-diabetes, que são a glicemia de jejum alterada e a tolerância à glicose diminuída. Essas

categorias não são entidades clínicas, mas fatores de risco para o desenvolvimento de DM e doenças cardiovasculares (DCV) (GROSS, SILVEIRO e CAMARGO, 2011).

O DM tipo 1 é caracterizado por destruição das células beta que levam a uma deficiência de insulina, sendo subdividido em tipos 1A e 1B, encontra-se em 5 a 10% dos casos de DM, sendo o tipo 1A ou autoimune é o resultado da destruição imunológica de células beta pancreáticas com conseqüente deficiência de insulina (GOMES e AGUILAR, 2010). Os marcadores de autoimunidade são os auto-anticorpos anti-ilhota ou antígenos específicos da ilhota e incluem os anticorpos anti-insulina, antidescarboxilase do ácido glutâmico (GAD 65), antitirosina-fosfatases (IA2 e IA2B) e antitransportador de zinco (Zn) (1A). O tipo 1B ou idiopático (TSIROGIANNI *et al*, 2009) não há uma etiologia conhecida, corresponde à minoria dos casos de DM1 e caracteriza-se pela ausência de marcadores de autoimunidade contra as células beta (FERNANDES *et al*, 2005). Os indivíduos com esse tipo de DM podem desenvolver cetoacidose e apresentam graus variáveis de deficiência de insulina. O diabetes mellitus tipo 2 (DM2) é a forma verificada em 90 a 95% dos casos e caracteriza-se por defeitos na ação e secreção da insulina e na regulação da produção hepática de glicose. A resistência à insulina e o defeito na função das células beta estão presentes precocemente na fase pré-clínica da doença. É causada por uma interação de fatores genéticos e ambientais (CAVAGNOLLI, GROSS e CAMARGO, 2012).

O diabetes mellitus gestacional (DMG) identificada como qualquer intolerância à glicose, de magnitude variável, com início ou diagnosticado durante a gestação (KAUTZKY e PACINI, 2006). O DMG ocorre em 1 a 14% de todas as gestações, dependendo da população estudada, e relaciona-se com aumento de morbidade e mortalidade perinatais. No Brasil, cerca de 7% das gestações são complicadas pela hiperglicemia gestacional. Na maioria dos casos, há reversão para a tolerância normal após a gravidez, porém há risco de 10 a 63% de desenvolvimento de DM2 dentro de 5 a 16 anos após o parto (SBD, 2016).

Outros tipos específicos da doença são algumas formas menos comuns de DM, cujos defeitos ou processos causadores podem variar. A apresentação clínica desse grupo depende da alteração de base. Estão incluídos nessa categoria defeitos genéticos na função das células beta, defeitos genéticos na ação da insulina, doenças do pâncreas exócrino e outras condições (CAVAGNOLLI, GROSS e CAMARGO, 2012).

Independente do tipo de diabetes, durante a gestação há maior risco de complicações. Muitos dessas complicações estão associadas à placenta, como pré-eclâmpsia, restrição de crescimento fetal e parto prematuro (MONTENEGRO e REZENDE, 2013).

A placenta é um órgão transitório de tecidos materno fetal altamente vascularizado, que desempenha importantes funções para a manutenção da gravidez e promoção do desenvolvimento do feto, como: a) transferência de produtos entre a mãe e o feto em ambas as direções, tais como gases, nutrientes e eletrólitos, anticorpos maternos, produtos de excreção (MOORE e PERSAUD, 2008); b) metabolismo, pois sintetiza glicogênio, colesterol e ácidos graxos que servem como fonte de nutrientes e energia para o embrião/feto particularmente na fase inicial da gravidez (GARCIA e FERNÁNDEZ, 2012) c) síntese e secreção de hormônios protéicos (tais como a Gonadotrofina Coriônica humana, a somatotrofina coriônica humana ou lactogênio placentário humano, a tireotrofina coriônica humana) e esteróides (MOORE e PERSAUD, 2008).

Este órgão começa a desenvolver dentro de poucos dias após a fertilização e é fundamental para o desenvolvimento e sobrevivência do feto durante a gestação. A placenta também desempenha para o feto funções similares ao pulmão, rim e sistema digestivo, além de exercer papel protetor para infecção (PAROLINI *et al* 2008). Ela é considerada um órgão materno fetal por possuir dois componentes: uma porção fetal e uma porção materna. A parte fetal é derivada do córion viloso, enquanto que a parte materna é originada de uma porção do endométrio uterino chamada de decídua basal (MOORE e PERSAUD, 2008).

O córion é um conjunto de tecidos derivado do citotrofoblasto, sinciotrofoblasto e mesoderma extra-embriônico, sendo estruturas extra-embriônicas que se organizam durante a implantação do blastocisto no endométrio uterino, formando a parede do saco coriônico. A partir do final da 2ª semana ocorre a formação de vilosidades em toda a extensão do córion. O saco coriônico permanece recoberto por vilosidades coriônicas até o início da 8ª semana. Com o desenvolvimento do embrião e do saco coriônico, permanecem somente as vilosidades coriônicas associadas à porção do endométrio uterino (a decídua basal) que irá participar da placenta, formando o córion viloso (porção fetal da placenta). Neste local, durante o resto da gestação as

vilosidades da placa coriônica aumentam em número, se ramificam, crescem e se tornam vascularizadas (MOORE e PERSAUD, 2008; SCHOENWOLF *et al.*, 2009).

A decídua refere-se à camada funcional do endométrio gravídico que se separa do restante do útero. Após o parto, a porção da decídua que fica associada ao córion viloso é chamada de decídua basal (porção materna da placenta). Esta decídua consiste de uma camada compacta de células grandes, chamadas de células decíduais, de diferentes origens, em conjunto com a matriz extracelular abundante. Estas células contêm grandes quantidades de lipídios e glicogênio acumulados no citoplasma (MOORE e PERSAUD, 2008; SCHOENWOLF *et al.*, 2009). As mudanças celulares e vasculares que acontecem no endométrio durante a implantação do blastocisto é chamada de reação decidual (MOORE e PERSAUD, 2008).

Durante a formação da placenta, as vilosidades que se desenvolvem a partir da placa coriônica invadem a decídua basal fazendo com que o tecido da decídua sofra erosão, aumentando os espaços entre as vilosidades (espaços intervilosos). Esse processo de erosão produz várias áreas cuneiformes na decídua basal, denominados de septos decíduais (ou placentários) que se projetam nos espaços intervilosos, mas não alcançam a placa coriônica, fazendo com que o contato entre os espaços intervilosos nos diversos cotilédones seja mantido. Os septos decíduais dividem a parte fetal da placenta em áreas convexas irregulares denominadas de cotilédones. Cada cotilédone é formado por duas ou mais vilosidades tronco e seus inúmeros ramos (MOORE e PERSAUD, 2008; SCHOENWOLF *et al.*, 2009).

Durante a gravidez, a hiperglicemia materna pode alterar o metabolismo oxidativo celular na interface materno-fetal (GAUSTER *et al.*, 2011). O estresse oxidativo ocorre quando existe um desequilíbrio entre a formação de espécies reativas de oxigênio (EROS) e a defesa antioxidante. Os EROS são formados através de uma variedade de ações extracelulares e intracelulares. Os EROS são gerados como subproduto do metabolismo oxidativo mitocondrial, formado como parte das vias de transdução de sinal induzidas por citocinas pró-inflamatórias, ou como mecanismo de defesa celular (ZHANG *et al.*, 2016). Para resistir à formação excessiva de EROS, são produzidas proteínas antioxidantes que neutralizam gradualmente os radicais de oxigênio. Um aumento nos níveis de EROS ou uma diminuição no sistema antioxidante pode levar ao estresse oxidativo. O estresse oxidativo provoca a modificação de

proteínas celulares, lipídios e DNA e, desse modo, afeta não apenas o comportamento celular e a diferenciação celular, mas também pode induzir apoptose e dano celular (ESPINOSA e MENNERICH, 2015).

Muitos estudos relatam efeitos do hormônio melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) sobre a secreção pancreática da insulina (FU, GILBERT e LIU, 2013) e a sua capacidade antioxidante (MONTIEL, BONILLA e VALERO, 2016). A melatonina (MLT) é o principal hormônio sintetizado pela glândula pineal dos vertebrados (AXELROD, 1974). A MLT é sintetizada a partir da serotonina na seguinte sequência de reações: conversão do triptofano em serotonina; conversão da serotonina em N-acetil-serotonina (mediada pela aril-alcil-amina-N-acetiltransferase); conversão da N-acetilserotonina em MLT (mediada pela hidroxindol-O-metil-transferase). Sua secreção ocorre exclusivamente à noite, iniciando-se cerca de 2 horas antes do horário habitual de dormir e atingindo níveis plasmáticos máximos entre 03:00 e 04:00 horas variando de acordo com a cronobiologia individual (CAJOCHEN, ZEITZER e CZEISLER, 2000).

Depois de ser secretada, se distribui por vários tecidos corporais e não é estocada. Ela apresenta alta solubilidade em lipídeos, o que facilita sua passagem através das membranas celulares, atravessando, inclusive a barreira hematoencefálica (PARDRIDGE e MIETUS, 1990). Os níveis plasmáticos exibem grande heterogeneidade entre diferentes indivíduos, porém costumam ser constantes em um mesmo indivíduo, representando um dos ritmos circadianos humanos mais marcantes (MORIN, *et al* 1998). A MLT é metabolizada no fígado, e o seu principal metabólito é a 6-sulfatoximelatonina excretada na urina humana cujos níveis refletem fielmente a atividade biosintética da glândula pineal (REITER, 2003). Há evidências de que a síntese de MLT e seus níveis séricos decrescem com o envelhecimento do indivíduo (FOURTILLAN e BRISSON, 2001).

A luz é o fator ambiental mais importante para a regulação da síntese de MLT e responsável pelo ritmo circadiano de sua secreção. Tal ritmo é gerado no núcleo supraquiasmático do hipotálamo que atua como um oscilador circadiano endógeno, pois estudos demonstraram que, quando isolado de outras estruturas do encéfalo, seus neurônios mantêm o ritmo circadiano (ZEE e MANTHENA, 2007). A luz tem ação inibitória sobre a pineal realizada pela seguinte via: impulsos luminosos excitam os

neurônios da retina que fazem conexão com o núcleo supraquiasmático através do trato retino-hipotalâmico (TZISCHINSKY e LAVIEM, 1997).

Entre as várias ações da MLT se destacam a ação de imunomodulação (GUERRERO e REITER, 2002, HARA et al, 2013) anti-inflamatória (BLASK, SAUER e DAUCHY, 2002) antitumoral (HARDELAND, FUHRBERG e UBIQUITOUS, 2007; FRANÇA *et al*, 2015), antioxidante (ARENDDT e SKENE, 2006; MORCELI et al, 2013) e cronobiológica (ARENDDT e SKENE, 2005). Diferente do que se especulou por décadas, a MLT não é o hormônio do sono, uma vez que tanto animais de hábitos diurnos quanto de hábitos noturnos possuem o mesmo padrão de secreção (ZHDANOVA, 2005). Ao contrário, ela seria o “hormônio da escuridão”, fornecendo ao organismo a informação de que é noite. Como propuseram (ARENDDT e SKENE, 2005) a MLT é uma substância cronobiótica que sincroniza os ritmos biológicos intrínsecos. Quando a MLT é secretada em horários diferentes do fisiológico, ocorre aumento da sonolência e diminuição da temperatura corporal (LOCKLEY *et al* 1997). De forma semelhante, se a MLT é inibida pela luz, há diminuição da sonolência e aumento da temperatura corporal (STRASSMANN, QUALLS e LISANSKY, 1991).

Além da glândula pineal, outros tecidos ou células também possuem capacidade de produzir melatonina. Estudos *in vitro* com tecidos humanos mostraram presença da MLT em retina (GERN e RALF, 1979), pâncreas e trato gastrointestinal (BUBENIK, 2008), linfócitos humanos (CARRILLOVICO *et al*, 2004). Estudos experimentais relatam a presença da MLT em macrófagos (MARTINS *et al*, 2004) e na medula óssea (TAN *et al*, 1999).

Na literatura há evidências da importância dos hormônios como potentes agentes imunomoduladores que melhoram a atividade funcional de células (IANÃS *et al*, 1991; FRANÇA *et al*, 2009; França *et al*, 2009b; HONORIO-FRANÇA *et al*, 2009; FRANÇA *et al*, 2009b; HONORIO-FRANÇA *et al*, 2009). A melatonina pode ligar-se a fagócitos e determinar vários processos oxidativos no organismo (KUHLEIN *et al*, 2001). Dependendo da dose, a melatonina pode ter efeito antioxidante (VANECEK et al, 1999, REITER *et al*, 2000), ou exercer efeitos pro-oxidativo (IANÃS, 1991; FRANÇA *et al*, 2009).

Sabe que a melatonina estimula a liberação de metabólitos ativos do oxigênio pelos fagócitos do sangue e colostro e modula a atividade funcional destas células

(IANÃS *et al*, 1991; Honorio-França *et al*, 2013). Os mecanismos pelos quais a melatonina influencia a função imunológica envolvem a participação de outros hormônios, citocinas e receptores específicos (ROGERS *et al*, 1997; PANDI-PERUMAL *et al*, 2008; PESCHKE *et al*, 2012). Estudos com células mononucleares em modelos experimentais de diabetes e em pacientes diabéticos a melatonina atua exercendo ação antioxidante, enquanto que em células de animais e de indivíduos não diabéticos ela apresenta efeito pro-oxidativo (FRANÇA *et al*, 2009; HONORIO-FRANÇA *et al*, 2009; MORCELI *et al*, 2013). Porém os efeitos sobre as células de placenta, bem como sua ação na interface materno-fetal ainda não foram elucidados. A chave de interações entre as células, tanto na interface materna como fetal, sugerem um mecanismo adicional para garantir a manutenção do feto e tolerância materno-fetal. É possível que a melatonina atue neste processo favorecendo a manutenção e o desenvolvimento do feto em gestações de mães diabéticas.

2- OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar em gestantes diabéticas, o estresse oxidativo e a apoptose de células mononucleares do sangue materno e da placenta modulados pelo hormônio melatonina.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a liberação do anion superóxido pelas células MN tratadas ou não pela melatonina do sangue materno, da placenta porção vilosa e da placenta extravilosa de mães diabéticas;
- Avaliar a concentração da enzima superóxido dismutase em sobrenadante de cultura de células MN tratadas ou não pela melatonina do sangue materno, da placenta porção vilosa e da placenta extravilosa de mães diabéticas;
- Avaliar a relação SOD\Anion no sangue materno, na placenta vilosa e na placenta extravilosa de mães diabéticas;
- Verificar os índices de apoptose pelas células MN tratadas ou não pela melatonina do sangue materno, da porção vilosa e extravilosa da placenta de mães diabéticas.

3. METODOLOGIA

3.1 Desenho do estudo

Estudo de corte transversal, onde foram analisados sangue e placenta de gestantes não diabéticas (normoglicêmicas) e portadoras de diabetes mellitus tipo 2 (DMT2).

3.2 Amostras

As amostras de sangue materno e placenta foram obtidas de gestantes de 18 a 45 anos de idade, cadastradas no Serviço Especializado de Diabetes e Gravidez da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB-Unesp), referência para as gestantes complicadas por Diabetes mellitus. As mulheres com diabetes mellitus tipo 2 foram encaminhadas ao serviço com diagnóstico prévio de diabetes. Gestantes foram submetidas ao Teste oral de tolerância à glicose (TOTG -75g) (ADA 2012), e ao teste do perfil glicêmico (PG) (RUDGE *et al.*, 2000), o qual foram aplicadas em paralelo entre as semanas 24 e 28 da gravidez. PG alterado foi considerado quando um dos valores foram encontrados igual ou excedendo glicemia de jejum igual ou superior a 90 mg/dL e pós-prandial de 130 mg/dL (RUDGE *et al.*, 2000). O TOTG-75g foi alterado quando um dos valores de glicose plasmática foram encontrados excedendo a glicemia em jejum de 92 mg/dL; pós-sobrecarga 1 h de 180 mg/dL e pós-sobrecarga 2 h de 153 mg/dL (ADA, 2012). Conforme os resultados dos testes, 40 gestantes foram classificadas nos seguintes grupos: (i) gestantes portadoras de Diabetes Mellitus tipo 2 (N=20) (DMT2; TOTG-75g alterado antes da gestação) e (ii) Não Diabéticas (N=20) (ND; TOTG-75g e PG normais).

3.3 Critérios de inclusão, exclusão e descontinuidade.

3.3.1 Critérios de inclusão

- Ser classificada nos grupos definidos no delineamento do estudo;
- Idade gestacional mínima de entrada no protocolo de tratamento de 20 semanas para portadoras de DM2;
- Idade gestacional no parto entre 37 a 41 semanas;
- Reações sorológicas negativas para hepatite, HIV e sífilis;
- Realizar assistência pré-natal e parto no Serviço.

- Assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

3.3.2 Critérios de exclusão

- Gravidez gemelar;
- Malformações fetais.
- Gestantes portadoras de Diabetes Mellitus Gestacional (DMG) e Hiperglicemia Gestacional Leve (HGL).

3.3.3 Critérios de descontinuidade

- Abandono do pré-natal no Serviço;
- Malformação fetal diagnosticada no momento do parto;
- Perda de dados relativos ao parto e ao período neonatal.

3.5 Definição das variáveis

3.4.1 Variáveis de controle

- Presença (sim) ou ausência (não) de tabagismo e de hipertensão arterial (NHBPEP,2000);
- Idade gestacional, em semanas completas, na entrada do protocolo de tratamento do Serviço;
- Média glicêmica mantida na gestação, categorizada em adequada (MG <120mg/dL) e Inadequada (MG \geq 120mg/dL) (RUDGE *et al*, 2000);
- Tipo de diabetes e distúrbios hiperglicêmicos.

3.4.2 Variáveis independentes

- DM (Diabetes Mellitus clínico tipo 2) (TTG75g alterado);
- ND (Não Diabéticas -TOTG75g e PG normais).

3.4.3 Variáveis dependentes

- Determinação de superóxido, SOD, apoptose de células MN do sangue materno e das camadas vilosa e extravilosa da placenta.

3.5 Métodos de coleta e avaliação

3.5.1 Média glicêmica da gestação

Foi avaliada pela média aritmética de todas as dosagens de glicemia plasmática de gestantes com DM2 prévio à gestação a partir da primeira consulta de pré-natal realizado durante a gestação (RUDGE *et al.*, 2000). Como a Média Glicêmica (MG) da gestação é marcador da qualidade do controle glicêmico materno, todos os resultados obtidos no estudo foram ajustados pelos níveis da MG obtida nos diferentes grupos, categorizados em $MG < 120$ mg/dL (controle adequado) e $MG \geq 120$ mg/dL (RUDGE *et al.*, 2000).

3.5.2 Obtenção de células MN do sangue materno

Na 37^a semana de gestação foram coletadas amostras de sangue materno (máximo de 8ml) em tubos Vacutainer com EDTA (Beckton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA®).

As células mononucleares foram separadas em gradiente de densidade com Ficoll-Paque (Pharmacia) por 40 minutos a 160 G, sob temperatura de 4°C. A seguir as células foram lavadas duas vezes em meio de cultura 199 e contadas em câmara de Neubauer. As concentrações celulares foram ajustadas para 2×10^6 células/ml. As células foram utilizadas nos ensaios de liberação de superóxido e de apoptose.

3.5.3 Obtenção de células MN da Placenta

Foram coletadas as amostras das placentas no momento do parto e imediatamente lavadas com solução salina. A seguir, foi retirado uma amostra, respeitando-se uma margem mínima de 2 cm da inserção do cordão umbilical e da borda placentária (CALDERON *et al.*, 2007). A placenta foi cuidadosamente dissecada isolando o tecido extraviloso da porção vilosa, a partir de procedimento adaptado descrito para o isolamento citotrofoblasto amniocoriônico (STENQVIST *et al.* 2008; BORBELY *et al.* 2014). Estes fragmentos foram imediatamente armazenados em nitrogênio líquido e depois processados para a separação de células. Os fragmentos das placentas foram macerados em PBS com Tween 20 suplementado com inibidores de protease (0,1 mM de fluoreto de fenilmetilsufoxi; 0,1 mM de cloreto de benzeno, 10 mM de EDTA, 20 UI de aprotinina, e 0,5% de BSA) em uma proporção de 100 mg de

tecido/ml, usando homogeneizador Gen 125 (Fisher Scientific ®). O homogenato foi descartado e o sedimento (células) foi fracionado por centrifugação (160 G, 40 min) através de gradiente de densidade. Após o preparo do macerado placentário as células foram ressuspensas em meio de cultura 199 (Gibco), e separadas em gradiente de densidade com Ficoll-Paque (Pharmacia) por 40 minutos a 160 G, sob temperatura de 4°C. A seguir as células foram contadas em câmara de Neubauer, e as concentrações celulares ajustadas para 2×10^6 células/ml. As células foram armazenadas para ensaios estresse oxidativo e apoptose.

3.5.4 Incubação das células MN com melatonina exógena

As células MN do sangue materno e da placenta foram mantidas em cultura por 24 horas na presença ou ausência de melatonina (Sigma, St Louis, USA) em estufa a 37°C com 5% de CO₂. Após este período as células foram utilizadas nos ensaios de ânion superóxido e apoptose e o sobrenadante de cultura reservado para quantificação da enzima superóxido (SOD). Para cada ensaio realizado, como controle dos experimentos os fagócitos (2×10^6 cels/ml) foram incubados por tempo similar, dependendo do tipo de ensaio em meio 199 ou em PBS, na ausência de melatonina. A concentração de melatonina foi de 100 ng/ml (HONORIO-FRANÇA *et al*, 2013).

3.5.5 Dosagem de ânion superóxido

A modulação de células MN do sangue materno e da placenta por melatonina foi verificada através da liberação de ânion superóxido, utilizando-se o cromógeno Ferricitocromo C, segundo o método de Pick & Mizel (1981) e adaptado por Honório-França *et al*. (1997). Em presença do ânion superóxido o ferricitocromo C sofre oxidação passando a ferrocitocromo C, sendo esta mudança colorimétrica detectável em espectrofotômetro com filtro de 550nm.

Após a separação, as células foram incubadas com melatonina conforme descrito acima. A seguir a suspensão de células foi centrifugada a 160 G e o sobrenadante reservado. As células foram ressuspensas em 0,5 ml de PBS glicosado contendo ferricitocromo C (concentração de 2 mg/ml). Um controle contendo células não tratadas foi realizado paralelamente para verificação da liberação espontânea do ânion superóxido. As suspensões celulares (tratadas ou não pela melatonina) foram colocadas em placas de cultura celular de 96 poços com um volume de 100 µl por poço e deixadas em estufa a 37° C durante 1 hora. A leitura foi realizada em espectrofotômetro para

placa com filtro de 630 nm. A concentração do ânion superóxido foi calculada através da seguinte relação: Concentração O_2^- (nmol) = DO/6,3 x 100.

3.5.6 Enzima Superóxido Dismutase (Cu-Zn-SOD)

A atividade enzimática da superóxido dismutase (Cu-Zn-SOD) foi determinada no sobrenadante de cultura de células MN do sangue materno e células MN das camadas vilosa e extravilosa da placenta utilizando o método de redução do NBT (NOVELLI *et al*, 1993). Para realização dos ensaios foram pipetados, em diferentes tubos, 500 μ L do sobrenadante da suspensão de células MN (sangue ou placenta) tratados ou não por melatonina. Em seguida, em cada tubo foram adicionados os seguintes reagentes: 500 μ L de mistura clorofórmio-etanol (1:1), 500 μ L da mistura reativa de Nitro Blue tetrazolium (NBT) e ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) (1:1,5) e 2 mL de solução tampão de hidroxilamina. Para calibração do aparelho, utilizou-se da mistura reativa de NBT e EDTA. A absorbância padrão foi medida a partir da mistura das seguintes soluções: 500 μ L de mistura hidro-alcoólica (1:4), 500 μ L de mistura clorofórmio-etanol (1:1), 500 μ L da mistura reativa de NBT e EDTA (1:1,5) e 2 mL de tampão de hidroxilamina.

Os valores da SOD foram expressos em unidades de $SOD g^{-1}$, ou seja, em termos de atividade da enzima, uma unidade de SOD é definida como a quantidade de enzima necessária para inibir 50% a velocidade de redução do NBT em cristais de formazam. O cálculo de % de redução é dado pela equação:

$$\% \text{ de redução do NBT} = \frac{(\text{Abs. padrão} - \text{Abs. da amostra})}{\text{Abs. padrão}} \times 100$$

Onde:

Abs. padrão: Absorbância Padrão do método;

Abs. da amostra: Absorbância de cada amostra a 560 nm.

3.5.7 Apoptose

Para o ensaio de apoptose foi utilizado o Kit APO -DIRECT TM (BD Biosciences - USA). Suspensões de células MN foram colocadas em placas de 24 poços e pré-tratados ou não com melatonina e incubadas durante 24 horas (37°C - 5% de CO_2). A seguir, as células MN foram retiradas das placas e lavadas duas vezes com 1 mL de PBS e centrifugadas por 10 minutos a 1500 rpm. Após este período, as células MN foram

fixadas com etanol, ajustadas e posteriormente armazenadas a -20°C por 12 a 18 h. Posteriormente as células passaram pelo processo de coloração onde foram ressuspensas, 1mL das células controle positivo, 1mL das células controle negativo e 1mL das células de sangue ou placenta. A seguir foram centrifugadas por 5 minutos a 2.800 rpm, eliminando o etanol, por aspiração. Após esta etapa as amostras foram ressuspensas e lavadas duas vezes com 900 μL de tampão de lavagem sendo descartado o sobrenadante, em seguida as amostras foram ressuspensas em 50 μL de solução de tampão de ligação, incubou-se por 60 minutos a 37°C na estufa. Após esse período de incubação foi adicionado 900 μL de tampão de lavagem e centrifugou por 5 minutos a 2800 rpm, A seguir o sobrenadante foi descartado, em seguida repetiu o procedimento de lavagem. Após as lavagens o pellet foi ressuspensado em 460 μL de tampão de coloração (Iodeto de propídeo/anexin V) e as células incubadas no escuro durante 30 minutos a temperatura ambiente e posteriormente foram analisadas no Citômetro de Fluxo (FacsCalibur, BD Biosciences, USA). Os dados foram obtidos através do software Cell Quest (BD Biosciences, USA).

3.5.8 Análise Estatística

Os dados foram expressos como média \pm desvio-padrão (SD). Utilizou-se a análise de variância (ANOVA) seguido do teste de comparação de médias de Tukey para as variáveis: média glicêmica, hemoglobina glicada, ânion superóxido, SOD e apoptose. Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

3.5.9 Aspectos Éticos

As considerações éticas foram baseadas no uso do material biológico para fins científicos, com sigilo da identidade da gestante, livre de coação ou conflito de interesses da instituição ou de pessoas envolvidas no projeto. As coletas respeitaram os protocolos técnicos do hospital e dos serviços envolvidos. As gestantes foram previamente informadas e o material somente foi coletado ou utilizado sob expresso consentimento em formulário específico (Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE), conforme resolução 466/12 do Conselho Nacional de ética em Pesquisa (CONEP) da Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP), aprovado com o número: 348\08-CEP.

4 RESULTADOS

As características clínicas das gestantes de ambos os grupos (ND e DM2) estão apresentadas na tabela 1. Observa-se que as gestantes apresentaram similaridade entre a idade materna, idade gestacional ao nascimento e peso antes da gravidez ($P > 0,05$). Os níveis de glicose, HbA1c e índice placentário foram maiores no DM2 (Tabela 1).

Tabela 1. Dados clínicos maternos e dos recém-nascidos do grupo não-diabético (ND) e Diabetes Mellitus tipo II (DMT2).

Parâmetros	ND	DMT2
Idade (anos)	27,1 ± 3.8	29.5 ± 5.3
Idade gestacional (semanas)	38,0 ± 1.2	37.8 ± 0.8
Média glicêmica (mmol/L)	4,2 ± 0.7	5.9 ± 0.8*
HbA1c (%)	5,2 ± 0.4	6.4 ± 0.8*
IMC -1	27,2 ± 4.2	30.3 ± 6.0
IMC-2	31,8 ± 7.3	34.4 ± 8.9
Hipertensão	10%	40%
Tabagismo	10%	5%
Exercício Físico	25%	70%
Peso placentário (g)	612.5 ± 99.4	716.6 ± 112.6
Índice placentário	0.162 ± 0.035	0.179 ± 0.031*

Notas: HbA1c - hemoglobina glicada; IMC -1 (índice de massa corporal no primeiro trimestre de gravidez); IMC -2 (índice de massa corporal no terceiro trimestre da gravidez. Dados são expressos como média e desvio padrão (SD). Índice placentário corresponde à relação entre o peso da placenta e o peso fetal. * Indica diferenças entre grupos.

Na figura 1 estão apresentados os resultados da liberação de superóxido pelas células MN tratadas ou não pela melatonina do sangue materno de mães diabéticas. Observa-se o aumento na liberação de superóxido no grupo de mães diabéticas quando comparado ao grupo não diabético. Quando tratadas pela melatonina houve aumento nas células MN do grupo de mães não diabéticas. A melatonina reduziu a liberação de superóxido pelas células MN de mães diabéticas que foram tratados pelo hormônio.

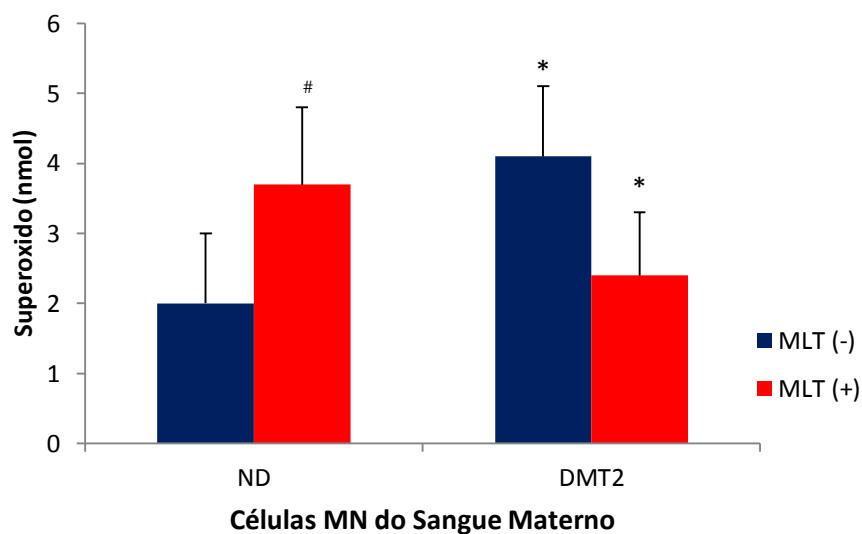


Figura 1. Liberação de superóxido (O_2^-) pelos fagócitos do sangue materno na presença ou não de melatonina de gestantes diabéticas. Resultados representam a média e desvio padrão de 10 amostras. Células MN de diferentes mães de cada grupo. * $p < 0.05$ comparando os grupos, considerando o mesmo tratamento e tipo de amostra; # $p < 0.05$: comparando células tratadas com não tratadas com melatonina, considerando o mesmo grupo e amostra. Não diabéticas (ND); Diabetes Mellitus Tipo 2 (DMT2); melatonina (MLT); Células mononucleares (MN).

A liberação de superóxido pelas células MN da camada vilosa da placenta está apresentada na figura 2. Houve aumento de liberação de superóxido pelas células MN do grupo diabético. O hormônio melatonina aumentou a liberação de superóxido em fagócitos de mães não diabéticas. No grupo diabético houve menor liberação do ânion quando as células foram tratadas pela melatonina.

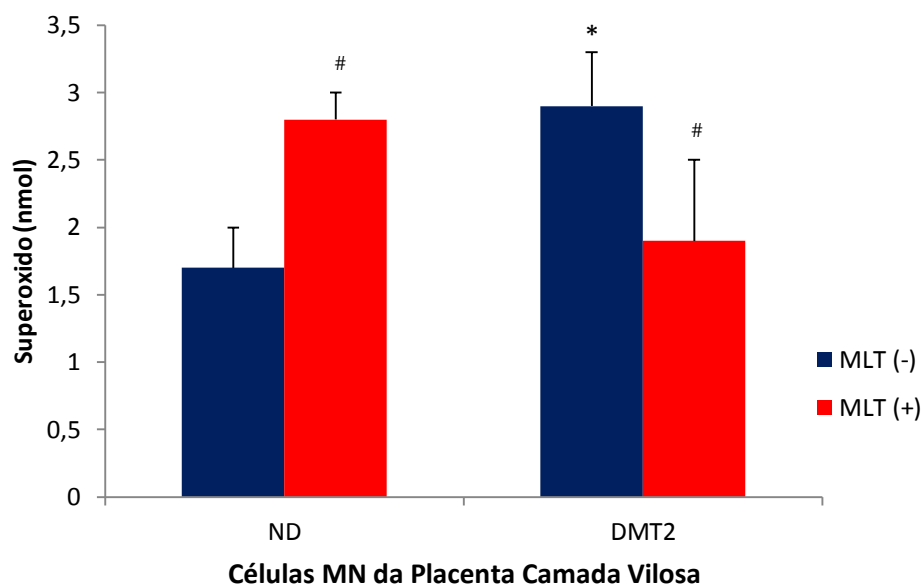


Figura 2. Liberação de superóxido (O_2^-) pelos fagócitos da camada vilosa da placenta na presença ou não de melatonina de gestantes diabéticas. Resultados representam a média e desvio padrão de 10 amostras. Células MN de diferentes mães de cada grupo. * $p < 0.05$ comparando os grupos, considerando o mesmo tratamento e tipo de amostra; # $p < 0.05$: comparando células tratadas com não tratadas com melatonina, considerando o mesmo grupo e amostra. Não diabéticas (ND); Diabetes Mellitus Tipo 2 (DMT2); melatonina (MLT); Células mononucleares (MN).

A liberação do ânion superóxido pelas células MN da camada extravilosa da placenta está apresentada na figura 3. Na presença de melatonina houve menor liberação de superóxido pelas células MN de mães diabéticas. Os maiores níveis de superóxido foram observados em fagócitos de mães não diabéticas tratados pelo hormônio.

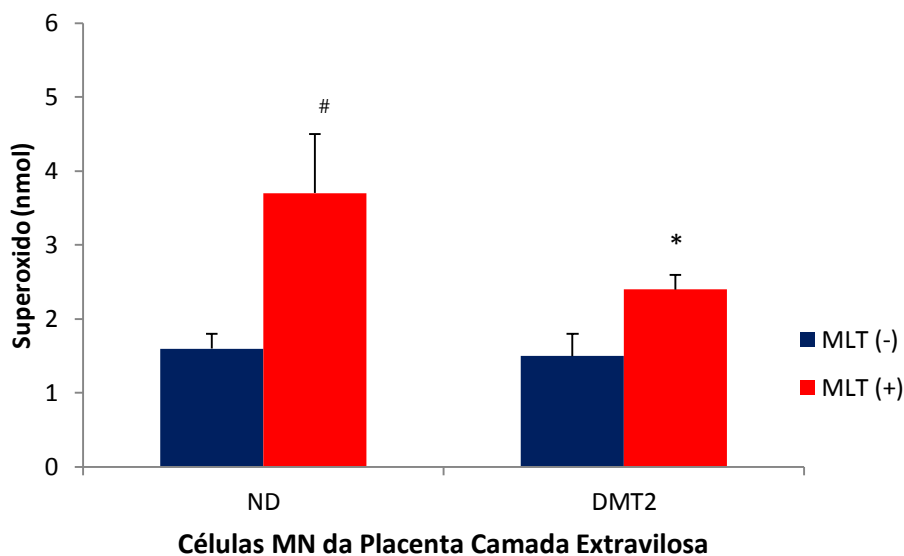


Figura 3. Liberação de superóxido (O_2^-) pelos fagócitos da camada extravilosa da placenta na presença ou não de melatonina de gestantes diabéticas. Resultados representam a média e desvio padrão de 10 amostras. Células MN de diferentes mães de cada grupo. * $p < 0.05$ comparando os grupos, considerando o mesmo tratamento e tipo de amostra; # $p < 0.05$: comparando células tratadas com não tratadas com melatonina, considerando o mesmo grupo e amostra. Não diabéticas (ND); Diabetes Mellitus Tipo 2 (DMT2); melatonina (MLT); Células mononucleares (MN).

Na tabela 2 estão apresentados os dados referentes à concentração da enzima superóxido dismutase (SOD) no sobrenadante de cultura de células MN do sangue materno e das camadas vilosa e extravilosa da placenta dos grupos não-diabético (ND) e Diabetes Mellitus tipo II (DMT2). Observa-se que em cultura de células MN do sangue de mães diabéticas houve redução de SOD. Quando as células foram incubadas com melatonina níveis similares da enzima foram observados entre os grupos. Na camada vilosa da placenta, independente da presença de melatonina, não houve diferenças na concentração de SOD no sobrenadante de cultura. Houve redução de SOD no sobrenadante da cultura de células MN da camada extravilosa da placenta de mães diabéticas. Quando estas células foram incubadas pelo hormônio, independentemente do nível glicêmico, valores similares da enzima foram encontrados no sobrenadante de cultura.

Tabela 2. Concentração de superóxido dismutase (SOD) no sobrenadante de cultura de células MN tratadas ou não pela melatonina de sangue e de placenta de mães diabéticas.

SOD (U/mg proteína)		ND	DMT2
Sangue Materno	MLT (-)	14.6±6.3	4.71±1.2*
	MLT (+)	17.7±7.9	18.2±6.1 [#]
Placenta Vilosa	MLT (-)	18.3±5.9	17.2±3.4
	MLT (+)	15.8±7.1	13. ±6.8
Placenta Extravilosa	MLT (-)	20.2±5.4	9.3±5.7*
	MLT (+)	21.9±8.9	19.2±8.3 [#]

Os resultados representam a média e desvio padrão de 6 amostras. Células mononucleares (MN); melatonina (MLT). *p<0.05 comparando os grupos considerando o mesmo tratamento e tipo de amostra; [#]p<0.05: comparando células não tratadas com células tratadas com melatonina, considerando o mesmo grupo e amostra; †p<0.05: comparando entre camada vilosa e extravilosa da placenta considerando o mesmo tratamento e grupo.

A relação de liberação de superóxido pelas células MN entre placenta vilosa/placenta extravilosa está apresentada na figura 4. Observa-se que no grupo diabético houve aumento na relação de liberação do ânion entre as células MN das diferentes camadas da placenta. O tratamento com melatonina reduziu os níveis de superóxido na relação placenta vilosa/extravilosa.

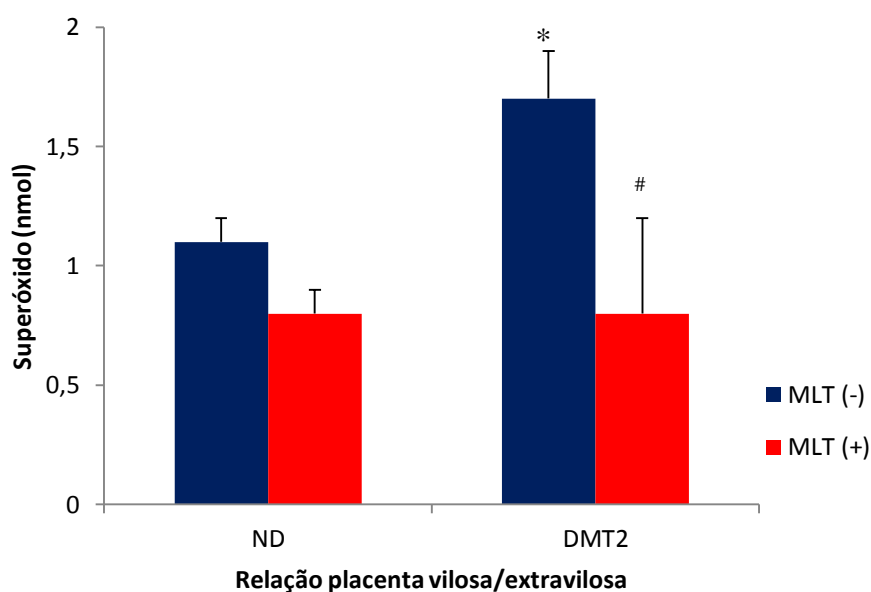


Figura 4. Relação entre placenta vilosa/placenta extravilosa da liberação de superóxido pelas células MN dos grupos não-diabético (ND) e Diabetes Mellitus tipo II (DMT2). Os resultados representam a média e desvio padrão de 6 amostras. * $p < 0.05$ comparando os grupos considerando o mesmo tratamento; # $p < 0.05$: comparando células não tratadas com células tratadas com melatonina, considerando o mesmo grupo.

A figura 5 apresenta a relação da enzima superóxido dismutase entre a camada vilosa e camada extravilosa da placenta. No grupo diabético houve redução da enzima na relação placenta vilosa/extravilosa. Quando tratadas pela melatonina houve aumento significativo da SOD na relação placenta vilosa/extravilosa.

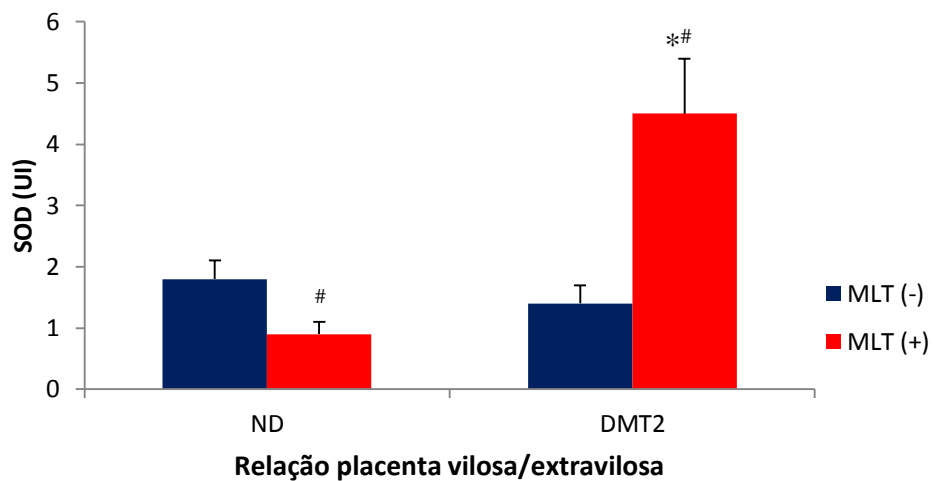


Figura 5. Relação entre placenta vilosa/placenta extravilosa da concentração de superóxido dismutase (SOD) em sobrenadante de cultura de células MN dos grupos não-diabético (ND) e Diabetes Mellitus tipo II (DMT2). Os resultados representam a média e desvio padrão de 6 amostras. * $p < 0.05$ comparando os grupos considerando o mesmo tratamento; # $p < 0.05$: comparando células não tratadas com células tratadas com melatonina, considerando o mesmo grupo.

A relação SOD/O₂⁻ no sobrenadante da cultura de células do sangue materno e nas camadas vilosa e extravilosa da placenta dos grupos não-diabético (ND) e Diabetes Mellitus tipo II (DMT2) estão apresentadas na tabela 3. Observa-se a redução na relação SOD/O₂⁻, das células do sangue de mães diabéticas. Na placenta vilosa a relação SOD/O₂⁻ foi menor no grupo diabético. O tratamento com melatonina aumentou a relação SOD/O₂⁻ com valores similares aos encontrados no grupo controle. Não houve diferença entre os grupos estudados na relação SOD/O₂⁻ na camada extravilosa da placenta, porém quando for comparar com a camada vilosa da placenta, a relação SOD/O₂⁻ é menor presença da melatonina (Tabela 3).

Tabela 3. Relação entre Superóxido dismutase (SOD) e liberação de ânion superóxido (O₂⁻) no sobrenadante de cultura de células MN tratadas ou não pela melatonina de sangue e de placenta de mães diabéticas.

Parâmetros		ND	DMT2
Sangue Materno	MLT (-)	10.9±4.7	2.7±1.3* [#]
	MLT (+)	8.8± 3.7	11.0±5.7
Placenta Vilosa	MLT (-)	12.4±4.3	4.1±1.7*
	MLT (+)	14.0±6.9	16.5±5.7 [#]
Placenta Extravilosa	MLT (-)	11.5±3.5	11.6±2.4†
	MLT (+)	9.6±4.9†	7.5±3.5 [#] †

Os resultados representam a média e desvio padrão de 6 amostras. Células mononucleares (MN); melatonina (MLT). *p<0.05 comparando os grupos, considerando o mesmo tratamento e tipo de amostra; [#]p<0.05: comparando células tratadas com não tratadas com melatonina, considerando o mesmo grupo e amostra; †p<0.05: comparando entre camada vilosa e extravilosa da placenta considerando o mesmo tratamento e grupo.

Na tabela 4 estão apresentados os índices de apoptose de células MN do sangue materno, placenta camada vilosa e placenta camada extravilosa. Observa-se altos índices de apoptose em células MN do sangue materno do grupo de mães diabéticas. O tratamento com melatonina reduziu o índice de apoptose neste grupo. Nas células MN da placenta vilosa, independente da presença da melatonina, houve redução dos índices de apoptose no grupo diabéticos. Em ambos os grupos estudados, não houve diferenças significativas entre os índices de apoptose de células MN da placenta extravilosa.

Tabela 4. Índice de viabilidade (%) e de apoptose (%) de células MN tratadas por melatonina do sangue materno e da placenta dos grupos não-diabético (ND) e Diabetes Mellitus tipo II (DMT2).

MN Cells		ND		DMT2	
		Viáveis	Apoptose	Viáveis	Apoptose
Sangue Materno	MLT (-)	78.9±9.1	21.1±8.5	68.6±12.7	41.4±11.0 [#]
	MLT (+)	80.4±6.8	19.6±5.7	82.9±4.6*	17.1±3.7*
Placenta Vilosa	MLT (-)	76.5±16.4	33.0±5.8	82.5±6.4	16.1±5.7 [#]
	MLT (+)	81.4±9.1	26.1± 6.6	78.7±7.0	18.8±5.4 [#]
Placenta Extravilosa	MLT (-)	79.4±5.1	21.7±11.4	73.7±11.0	23.8±8.9
	MLT (+)	78±5.0	22.1±11.4	75.4±10.7	22.8±11.1

Os resultados representam a média e desvio padrão de 6 amostras. Células mononucleares (MN); melatonina (MLT). *p<0.05: comparando células tratadas com não tratadas com melatonina, considerando o mesmo grupo e amostra; [#]p<0.05: comparando os grupos considerando o mesmo tratamento e tipo de amostra; †p<0.05: comparando entre os tipos de amostras considerando o mesmo tratamento e grupo.

5- DISCUSSÃO

A hiperglicemia contribui para a geração de espécies reativas de oxigênio (EROS) resultando no estresse oxidativo, que pode contribuir para o ambiente pró-inflamatório típico no diabetes (CVITIC *et al*, 2014). Neste trabalho a hiperglicemia foi capaz de alterar o balanço entre a produção de ânion superóxido e a enzima superóxido dismutase (SOD) em sangue materno e na placenta de mães diabética. Estas alterações refletiram nos mecanismos de indução de apoptose e foram modulados pelo hormônio melatonina.

As células MN do sangue de mães diabéticas apresentaram aumento de ânion superóxido, menores liberação da enzima superóxido dismutase e redução na relação entre SOD/O₂⁻, sugerindo alterações no balanço entre os sistemas pro e antioxidantes. A geração de radicais livres por células mononucleares, entre estes o ânion superóxido, tem sido relatada como um importante mecanismo de defesa frente a processos infecciosos (HONORIO-FRANÇA *et al*, 2001, FRANÇA *et al*, 2011) e o balanço entre os mecanismos pro e antioxidantes são extremamente importantes, uma vez que níveis elevados de radicais livres causam danos às proteínas celulares, lipídios de membrana e ácidos nucléicos que acabam no desencadeamento de vias de morte celular (MARITIM *et al*, 2003, FERRARI *et al*, 2009).

Uma grande variedade de mecanismos tem sido sugerida para a formação desses reativos de oxigênio. Acredita-se que a oxidação da glicose seja a principal fonte de radicais livres em diabetes (FERRARI *et al*, 2009, FRANÇA *et al*, 2009a). A hiperglicemia promove a peroxidação lipídica por uma via dependente de superóxido, resultando na geração e liberação de radicais livres (TSAI *et al*, 1994, KAWAMURA *et al*, 1994). Outra fonte importante de radicais livres em pacientes diabéticos é a interação da glicose com proteínas que levam à formação de produtos finais avançados de glicosilação e contribuem para o excesso de formação radical livre (LAPPAS *et al*, 2011).

Pode observar que a melatonina aumentou a liberação de superóxido no grupo não diabético e foi capaz de reduzir a liberação deste ânion em células MN do grupo diabético. Esta redução foi capaz de atuar na relação SOD/O₂⁻ determinando valores similares aos encontrados no grupo controle.

As funções da melatonina em seres humanos ainda são parcialmente compreendidas. O hormônio melatonina pode estar associado a células mononucleares, tendo sido inclusive relacionado com os processos oxidativo do organismo (FRANÇA *et al*, 2009b). A melatonina dependendo da dose administrada pode ter efeito anti-oxidativo, incluindo o “scavenging” dos radicais (IANÃS *et al*, 1991) ou função pro-oxidativa (HONORIO-FRANÇA *et al*, 2013, HARA *et al*, 2013).

Estudos anteriores têm relatado que a melatonina aumenta a produção de superóxido em fagócitos MN do colostro de mulheres normoglicêmicas, mas não em fagócitos do colostro de mulheres hiperglicêmicas. Em mães diabéticas, a hiperglicemia materna modifica a atividade funcional de células MN, e seus efeitos provavelmente são limitados a processos não-inflamatórias, com menor liberação de superóxido (MORCELI *et al*, 2013). A estimulação insuficiente da atividade funcional de células MN, devido a uma falha nos mecanismos pro oxidantes indica um efeito antioxidante relacionado ao diabetes (REITER *et al*, 2008). Resultados semelhantes foram observados em modelos de diabetes induzido pela droga diabetogênica aloxana (BRÖMME *et al*, 2002, PAWLAK *et al*, 2005, DEVI *et al*, 2008, FRANÇA *et al*, 2009^a, HONORIO-FRANÇA *et al*, 2009).

Alterações nos mecanismos pro e antioxidantes também foram observadas na placenta sendo associados à sua camada (camada extravilosa na interface materna e camada vilosa na interface fetal). A camada materna apresentou menor concentração da enzima SOD. A presença de melatonina restaurou os níveis desta enzima com valores similares ao do grupo controle. Na camada fetal houve aumento de superóxido e redução na relação SOD/O₂⁻. Quando em presença da melatonina houve redução de superóxido e a relação SOD/O₂⁻ apresentou valores similares ao do grupo controle, sugerindo que em ambas as camadas da placenta a melatonina foi capaz de reduzir o estresse oxidativo, possivelmente causado pela hiperglicemia.

Estudos experimentais têm relacionado à estrutura e a função placentária anormais nas gestações diabéticas ao aumento do estresse oxidativo com redução da capacidade antioxidante (WHITE *et al.*, 2002). O estresse oxidativo ocorre na gravidez diabética e, provavelmente compromete mecanismos de defesa antioxidante e aumenta a produção de radicais livres (BIRI *et al*, 2006).

Como uma interface natural entre mãe e feto, a placenta é o alvo de mudanças ambientais (RADAELLI *et al*, 2003). Estudos anteriores mostraram que a placenta pode modificar a concentração de células e citocinas do sangue materno antes de transferi-las para o feto, e que esse mecanismo é afetado pelo ambiente inflamatório produzido pela hiperglicemia (HARA *et al*, 2016). No entanto, as alterações metabólicas maternas associadas ao diabetes alteram o ambiente uterino e pode levar a um padrão anormal de crescimento fetal (CATALANO *et al*, 1991). Neste estudo, alterações no estresse oxidativo encontradas no sangue materno refletiram na placenta e provavelmente são direcionadas para o feto.

Um resultado relevante é que a taxa de superóxido (placenta a vilosa/extravilosa) foi maior na placenta de DMT2. A melatonina foi capaz de reduzir esta taxa de superóxido e aumentar a taxa de SOD. Considerando que a melatonina é capaz de atuar na remoção de radicais livres (KLEPAC *et al*, 2005) e no controle de diabetes (SUDNIKOVICH *et al*, 2007) devido sua ação benéfica associada à capacidade de eliminar diferentes radicais livres e aumentar a atividade antioxidante das enzimas (KLEPAC *et al*, 2005, SUDNIKOVICH *et al*, 2007, PANDI-PERUMAL *et al*, 2008), os resultados deste estudo sugerem que este hormônio modifica o tecido placentario gerando na interface materno-fetal um ambiente com características anti-oxidantes.

Deve-se considerar que durante a gravidez ocorrem adaptações imunofisiológicas, mas a hiperglicemia pode alterar essas adaptações e ser responsável pela maior frequência de complicações na gestação de mulheres com diabetes (GROEN *et al*, 2015).

Por outro lado, a literatura tem relatado que o aumento da liberação de superóxido modifica respostas intracelulares, especialmente eventos de fosforilação durante o metabolismo oxidativo (CARRICHON *et al*. 2011) e estas alterações podem aumentar a apoptose (HONORIO-FRANÇA *et al*, 2016). Aqui o aumento da liberação de superóxido pelas células MN no sangue materno de mães hiperglicêmicas associado à redução da enzima superóxido dismutase pode estar associado aos altos dos índices de apoptose.

A apoptose pode ser considerada como um mecanismo fisiológico essencial através do qual os tecidos e as células indesejáveis, programados a ser mortos de maneira controlada e firmemente regulada (KOUDRINE, 1998; BASKIC *et al.*, 2006),

sendo estas alterações evidenciadas através de mudanças morfológicas com dano no DNA (Zimmermann e Green, 2001). Em mães hiperglicêmicas ocorre aumento do estresse oxidativo e dano do DNA. O tipo de base nitrogenada de DNA afetada parece ser dependente do perfil glicêmico ou do estresse oxidativo (Gelati *et al*, 2015). Acredita-se que as espécies reativas de oxigênio resultantes da oxidação da glicose sejam mais prováveis para causar danos no DNA (Collins *et al*, 1998) o que explicaria o aumento de células apoptóticas em sangue de mães com diabetes. Cabe ressaltar o importante papel do hormônio melatonina neste processo uma vez que este hormônio devido sua atividade antioxidante foi capaz de reduzir os índices de apoptose no sangue materno de mães hiperglicêmicas.

É evidente que na camada vilosa da placenta de mães diabéticas houve redução da enzima superóxido dismutase e dos índices de apoptose. Sabe-se que um dos processos associados à tolerância do sistema imunológico materno é a apoptose das células T pela expressão de ligantes Fas em células do trofoblasto ou da decidua (GULERIA *et al*, 2007) o que confere privilégio imunológico. A apoptose das células imunológicas maternas que expressam Fas ocorre na interface placenta/decidua. Fas (CD95 +) é um receptor de superfície celular que desempenha um papel central na regulação da morte de muitos tipos de células, incluindo células β do pâncreas, e pode estar associado ao desenvolvimento de diabetes tipo 2 (MAEDLER *et al*, 2001, DANATH *et al*, 2003, NOLSOE *et al*, 2006).

Estudo recente do grupo evidenciou que mães diabéticas apresentam níveis mais baixos de células T de memória na camada vilosa da placenta, associada à menor expressão de Fas, sugerindo o comprometimento de apoptose em células MN e, provavelmente, na imunoregulação da unidade mãe-placenta-feto e na tolerância materno-fetal (QUEIROZ *et al*, 2018).

Por outro lado, os dados deste trabalho reforçam mais uma vez a importância do hormônio melatonina não só no controle do estresse oxidativo e na redução de apoptose no sangue materno, como também no controle de apoptose em células trofoblásticas, o que provavelmente pode atuar favorecendo a tolerância materno-fetal em mães diabéticas. Os mecanismos pelos quais a melatonina influencia a função imunológica parecem envolver a participação de outros hormônios, citocinas e receptores específicos (ROGERS *et al*, 1997; PANDI-PERUMAL *et al*, 2008;

PESCHKE *et al*, 2012). Mais estudos devem ser realizados no sentido de investigar o papel deste hormônio nos processos de imunoregulação e tolerância da unidade materno-placenta-feto.

6- CONCLUSÕES

- Estes dados sugerem que a hiperglicemia foi capaz de alterar o balanço entre a produção de ânion superóxido e a enzima superóxido dismutase (SOD) em sangue materno e na placenta de mães diabética. Estas alterações refletiram nos mecanismos de indução de apoptose e foram modulados pelo hormônio melatonina;
- Também reforçam a importância do hormônio melatonina não só no controle do estresse oxidativo e redução de apoptose no sangue materno, como também no controle de apoptose em células trofoblásticas, o que provavelmente pode atuar favorecendo a tolerância materno-fetal em mães diabéticas.

7- REFERÊNCIAS

AKTUN H L. et al. Gestational Diabetes Mellitus Screening and outcomes. Journal of the Turkish-German Gynecological Association. Istanbul, v. 16, n. 1, p. 25-29, jan, 2015.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION (ADA). Diabetes Mellitus Gestacional. Diabetes Care. v. 27, n. 1, p. 88-90, jan, 2004.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION (ADA). Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Diabetes Care. v. 37, n. 1, p. 81-90, jan, 2014.

ASHER O. et al. Effect of maternal diabetes on the embryo, fetus, and children: Congenital anomalies, genetic and epigenetic changes and developmental outcomes. Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews Teratology Society. Hoboken, v. 105, n. 1, p. 53-72, mar, 2015.

ANTÓN T F. Melatonin effects on brain function. Advances in biochemical psychopharmacology. New York. v. 11, n. 1, p. 315-324, Fev, 1974.

ARENDRT J, BORBELLY AA, FRANEY C et al. The effects of chronic, small doses of melatonin given in the late afternoon on fatigue in man. A preliminary study. Neuroscience Letters journal. v. 45, n. 1, p. 317-321, 1984

ARENDRT J, SKENE D. Melatonin as a chronobiotic. Sleep Medicine Reviews. v. 9, n.1, p. 25-39, 2005.

AXELROD J. The pineal gland: a neurochemical transducer. Science. v. 184, n.1, p. 1341- 1348, jun, 1974.

ALSAT E, BOUALI Y, GOLDSTEIN S, et al. Low-density lipoprotein binding sites in the microvillous membranes of human placenta at different stages of gestation, Molecular and Cellular Endocrinology. v. 38, n.1, p. 197-203, 1984.

.BIRI A. et al. Effect of different degrees of glucose intolerance on maternal and perinatal outcomes. The Journal of Maternal-Fetal Medicine & Neonatal. Ankara, v. 22, n. 6, p. 473-478, jun, 2009.

BIRI A, ONAN A, DEVRIM E, BABACAN F, KAVUTCU M, DURAK I .Oxidant status in maternal and cord plasma and placental tissue in gestational diabetes. Placenta, v. 27, p.327-332, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Vigitel Brasil 2013: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico. Brasília, 2013. 134p.

BRÖMME HJ, MÖRKE W, PESCHKE E, EBELT H, PESCHKE D. Scavenging effect of melatonin on hydroxyl radicals generated by alloxan. Journal of Pineal Research. v. 29, p. 201-208, 2002.

CATALANO P, HUSTON L, ANINI S, KALHAN SC. Longitudinal changes in glucose metabolism during pregnancy in obese women with normal glucose tolerance and GDM. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. v. 180, p. 903-916, 1999.

COLLINS AR, RASLOVÁ K, SMOROVSKÁ MP, PETROVSKÁ H, ONDRUSOVÁ A, VOHNOUT B, et al. DNA damage in diabetes: Correlation with a clinical marker. *Free Radical Biology and Medicine*. v. 25, p. 373–377, 1998.

CVITIC S, DESOYE G, HIDDEN U. Glucose, Insulin, and Oxygen Interplay in Placental Hypervascularisation in Diabetes Mellitus. *BioMed Research International*. v. 34, p. 480-484, 2014.

DEVI MMS, SURESH Y, DAS UN. Preservation of the antioxidant status in chemically-induced diabetes mellitus by melatonin. *Journal of Pineal Research*. v. 29, p. 108-115, 2008.

DONATH MY, STORLING J, MAEDLER K, et al. Inflammatory mediators and islet beta-cell failure: a link between type 1 and type 2 diabetes. *J Mol Med*. v. 81, p. 455–470, 2003.

ESPINOSA DC, MENNERICH D. Antioxidant responses and cellular adjustments to oxidative stress. *Redox Biology*. v. 6, p. 183-197, dec 2015.

FERRARI CKB, SOUTO PCC, FRANÇA EL, HONORIO-FRANÇA AC. Oxidative and nitrosative stress on phagocytes' function: from effective defense to immunity evasion mechanisms. *Archivum Immunologiae et Therapia Experimentalis*. v. 59, p. 441-448, 2011.

FINOCHIARO LME, NAHMOD VE, LAUNAY JM. Melatonin Biosynthesis and Metabolism in Peripheral Blood Mononuclear Leucocytes. *Biochemical Journal*. v. 280, p. 727-731, 1991.

FOURTILLAN JB, BRISSON AM. Melatonin secretion occurs at a constant rate in both young and older men and women. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. v. 10, p. 11-22, jan 2001.

FRANÇA EL, FELICIANO ND, SILVA KA, FERRARI CKB, HONORIO-FRANÇA AC. Modulatory Role of Melatonin on Superoxide Release by Spleen Macrophages Isolated from Alloxan-Induced Diabetic Rats. *Bratislava Medical Journal*, v. 7, p. 163-173, 2008.

GAUSTER *et al.* The Placenta and Gestational Diabetes Mellitus. Onset of Gestational Diabetes and Effects on Placenta Development. *Springer Science*. v. 12, p. 12-16, nov 2011.

GROSS J. et al. Diabetes Mellitus: Diagnóstico, Classificação e Avaliação do Controle Glicêmico. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia Metabologia*. Porto Alegre, v. 46, n. 1, p. 16-26, Fev, 2002.

GROEN B, VAN DER WIJK A, VAN DEN BERG P, LEFRANDT J, VAN DEN BERG G, “Immunological Adaptations to Pregnancy in Women with Type 1 Diabetes”, *Science Reproduction*. v. 22, p.136-138, sep, 2015.

GULERIA I, SAYEGH M. Maternal acceptance of the fetus: true human tolerance. *Journal of Immunology*. v. 178, p. 3345-3351, 2007.

HONORIO-FRANÇA AC, SILVA KA, FELICIANO ND, CALDERON IMP, RUDGE MVC, et al. Melatonin effects on macrophage in diabetic rats and the maternal hyperglycemic implications for newborn rats. *International Journal of Diabetes and Metabolism*. v. 17, p. 87-92, 2009.

HONORIO-FRANÇA *et al.* Human colostrum melatonin exhibits a day-night variation and modulates the activity of colostrum phagocytes. *Journal of Applied Biomedicine*.v. 11, p. 153-162, 2013.

IDF Diabetes Atlas: Global estimates for the prevalence of diabetes for 2013 and projections for 2035. *Diabetes research and clinical practice*. v. 103, p 137–149, fev 2014.

IANĂȘ O, OLINESCU R.; BĂDESCU I. Melatonin involvement in oxidative processes. *Romanian Journal of Endocrinology*. v. 29, p. 147-53, 1991

INTERNATIONAL EXPERT COMMITTEE. International Expert Committee report on the role of the A1C assay in the diagnosis of diabetes. *Diabetes Care*. v. 32, n. 7, p. 1327–1334. Jul, 2009.

KERNER W, BRÜCKEL J. Definition, Classification and Diagnosis of Diabetes Mellitus. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*,v. 122, n. 7, p. 384-386, Jul, 2014.

KLEPAC N, RUDES Z, KLEPAC R .Effects of melatonin on plasma oxidative stress in rats with streptozotocin induced diabetes. *Biomedicine and Pharmacotherapy*.v. 60, p. 32-35, 2005.

KAWAMURA M, HEINECKE J, W, CHAIT A. Pathophysiological concentration of glucose promote oxidative modification of low density lipoprotein by a superoxide-dependent pathway. *The Journal of Clinical Investigation*. v. 94, p. 771-778, 1994.

LANDON M.et al. The Relationship Between Maternal Glycemia and Perinatal Outcome. *Obstetrics and gynecology*. Washington, v. 117, n. 2, p. 218-224, Fev, 2011.

LASH G.et al. Interaction between uterine natural killer cells and extravillous trophoblast cells: effect on cytokine and angiogenic growth factor production. *Human Reproduction*. Oxford, v. 26, n. 9, p. 2289-2295, Sep, 2011.

LEE H. et al. Prevalence of type 2 diabetes among women with a previous history of gestational diabetes mellitus. *Diabetes Research and Clinical Practice*. v. 81, n. 1, p.124-129, Fev, 2008.

LAPPAS M, HIDDEN U, DESOYE G, FROEHLICH J. “The role of oxidative stress in the pathophysiology of gestational diabetes mellitus” *Antioxidants and Redox Signaling*. v. 15, n. 12, p. 3061-3100, 2011.

MARITIM AC, SANDERS RA, WATKINS B. Diabetes, Oxidative Stress, and Antioxidants: A Review. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*. v. 17, p. 24-38, 2003.

MAEDLER K, SPINAS GA, LEHMANN R, et al. Glucose induces beta-cell apoptosis via upregulation of the Fas-receptor in human islets. *Diabetes*. v. 50, p. 1683-1690, 2001.

MORCELI G, HONORIO-FRANÇA AC, FAGUNDES DLG. Antioxidant effect of melatonin on the functional activity of colostrum phagocytes in diabetic women. *Journals.plos.org* v. 8, p. 569-575, n. 2, fev 2013.

MORIN, *et al.* Melatonin high-affinity binding to alpha-1-acid glycoprotein in human serum. *Pharmacology*. v. 21, p. 52-68, 1998.

MOORE KL, PERSAUD TVL. Human Fetal Membranes: A Source of Stem Cells for Tissue Regeneration and Repair. *Placenta*. v. 30, p. 2-10, jan 2008.

NOLSOE RL, HAMID YH, POCIOT F, et al. Association of a microsatellite in FASL to type II diabetes and of the FAS-670G. A genotype to insulin resistance. *Genes and Immunity*. v. 7, p. 316-321, 2006.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Ministério da Saúde. *Diabetes*. Geneva, Nov, 2014.

PAROLINI *et al.* Isolation and characterization of cells from human term placenta. *Concise*. v. 26, p. 300-311, fev 2008.

PAWLAK J, SINGH J, LEA RW, SKWARLO-SONTA K. Effect of melatonin on phagocytic activity and intracellular free calcium concentration in testicular macrophages from normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Molecular and Cellular Biochemistry*. v. 275, p. 207-213, 2005.

PARDRIDGE WM, MIETUS L J. Distribution of retinal melatonin deacetylase activity among vertebrate classes. *Journal of Neurochemistry*. v. 54, p. 716-719, 1990.

PANDI PERUMAL SR, TRAKHT I, SRINIVASAN V, SPENCE DW, MAESTRONI GJM, ZISAPEL N. Physiological effects of melatonin: Role of melatonin receptors and signal transduction pathways. *Progress in Neurobiology*: v. 85, p. 335–353, 2008.

RADAELLI T, VARASTEHPUR A, CATALANO P, HAUGEUL-DE MOUZON S. Gestational diabetes induces placental genes for chronic stress and inflammatory pathways. *Diabetes*. v. 52, p. 2051-2058, 2003.

REITER RJ, TAN DX, JOU MJ, KORKMAZ A, MANCHESTER LC, et al. Biogenic amines in the reduction of oxidative stress: melatonin and its metabolites. *Neuro Endocrinology Letters*. v. 29, p. 391-398, 2008.

SCHMIDT et al. High prevalence of diabetes and intermediate hyperglycemia – The Brazilian Longitudinal Study of Adult Health (ELSA-Brasil). v .6, P. 122-124, nov 2014

SUDNIKOVICH EJ, MAKSIMCHIK YZ, ZABRODSKAYA SV, KUBYSHIN VL, LAPSHINA EA, BRYSEWSKA M. Melatonin attenuates metabolic disorders due to streptozotocin-induced diabetes rats. European Journal of Pharmacology: v. 569, p 180-187, 2007.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE ENDOCRINOLOGIA E METABOLOGIA (SBEM). Diabetes mellitus gestacional. Revista da Associação Médica Brasileira. São Paulo, v. 54, n. 6, p. 477-480, Nov, 2008.

TSIROGIANNI *et al.* Specificity of islet cell autoantibodies and coexistence with other organ specific autoantibodies in type 1 diabetes mellitus. Autoimmunity Reviews. v. 8, p. 687-691, jul 2009.

TSAI EC, HIRSCH IB, BRUNZELL JD, CHAIT A. Reduced plasma peroxy radical trapping capacity and increases susceptibility of LDL to oxidation in poorly controlled IDDM. Diabetes. v. 43, p. 1010-1014, 1994.

WHITE V, JAWERBAUM A, SINNER D, PUSTOVRH C, CAPOBIANCO E, GONZÁLEZE. Oxidative stress and altered prostanoid production in the placenta of streptozotocin-induced diabetic rats. Reproduction, Fertility, and Development. v. 14, p. 117-123, 2002.

ZHANG *et al.* Oxidative stress increases adhesion molecules expression in human endothelial cells. Journal of Applied Toxicology. v. 36, p. 48-59, jan 2016.

ZEE PC, MANTHENA P. The brain's master circadian clock ,implications and opportunities for therapy of sleep disorders. Sleep Medicine Reviews. v. 11, p. 59-70, fev 2011.