



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Maria Ramos Freire Soares de Aquino

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “ROR and the Circadian Rhythm” referente à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação do Tenente Coronel Farmacêutico Paulo Santos, da Doutora Ana Catarina Pinto, do Doutor António Lucas Nunes e da Professora Doutora Maria Manuel Cruz Silva e apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Setembro de 2021



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Maria Ramos Freire Soares de Aquino

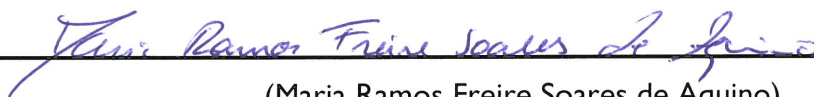
Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “ROR and the Circadian Rhythm” referente à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação do Tenente Coronel Farmacêutico Paulo Santos, da Doutora Ana Catarina Pinto, do Doutor António Lucas Nunes e da Professora Doutora Maria Manuel Cruz Silva e apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Setembro de 2021

Eu, **Maria Ramos Freire Soares de Aquino**, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o n. °**2016238739**, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “ROR and the Circadian Rhythm” apresentadas à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

Mais declaro que este Documento é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 13 de setembro de 2021.



(Maria Ramos Freire Soares de Aquino)

Agradecimentos

Aos meus pais e irmã Carolina, pelo incondicional apoio, pela palavra certa no momento certo e por todo o amor e orgulho que depositaram no percurso que escolhi traçar. A vocês que estão lá nos bons e nos maus momentos e que me inspiram a superar-me todos os dias. Por me terem apresentado Coimbra pelas vossas histórias e por serem o meu abrigo e refúgio.

À Binês, à Joana, à Beatriz Melo, ao Simão, à Gabi Moço, aos Brunos e aos meus amigos por me inspirarem e se deixarem inspirar. Por serem as pessoas que fizeram este percurso comigo e que nunca me deixaram abalar, mesmo quando tudo desabava. Por serem a mão, o braço, a boia e o leme e por, apesar de não estarem desde sempre, ter a certeza que ficarão para sempre comigo.

Ao Quarentena, por terem sido mais do que amigos, mas sim a família que o NEF/AAC juntou. Espero que permaneçam sempre fiéis a vós mesmos, nas horas boas e nas más e que todos, sem exceção, façam o favor de serem genuinamente felizes.

À minha família de Praxe, especialmente à Júlia, à Marília, à Diana, à Eduarda e à Carolina, por serem a minha rocha e a família que escolhi. Sem vocês, sem as horas infindáveis e os inúmeros conselhos não teria chegado aqui. Vocês são e serão sempre a eterna saudade de Coimbra.

Ao NEF/AAC, à Casa onde permaneci e às pessoas que mais me marcaram no meu percurso. Em especial à Beatriz pelas superações, as conversas e a “vizinha do conselho”. À Casa que me fez crescer, uma Casa maior que todos nós, a eterna Casa de quem sonha e de quem ousa sonhar.

À minha orientadora, a Professora Doutora Maria Manuel Cruz Silva, pela disponibilidade, oportunidade, orientação, conselho e apoio no meu percurso e na realização da monografia.

A todos os elementos da Farmácia Militar de Coimbra e às estagiárias que me acompanharam. O Homem vale realmente pelo que vale aos Outros. Obrigada pelo carinho, a disposição e por tudo o que fizeram por mim. Fizeram de mim uma melhor pessoa e profissional.

A toda a Equipa do Grupo de Investigação e Inovação da Bluepharma[®], por todo o apoio, confiança e amizade criada e por todos os conselhos que levo comigo e para o meu futuro.

À Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, Professores e Corpo Não Docente, pelo carinho e simpatia e por todo o auxílio no meu percurso.

A ti Coimbra, eterna saudade, a ti, às tuas gentes e às tuas memórias. Tornei-me a pessoa que hoje sou pelas memórias que em mim gravaste e pelos sorrisos que carrego. O teu sol será sempre diferente de qualquer outro. Deixo aqui uma parte de mim, sabendo que de ti, levo os verdes anos e a eterna gratidão de me fazeres ousar sonhar.

A Coimbra, a todos vós, o meu mais sincero obrigada.

“Life has three rules: Paradox, Humor, and Change.

-Paradox: Life is a mystery; don't waste your time trying to figure it out.

-Humor: Keep a sense of humor, especially about yourself. It is a strength beyond all measure.

-Change: Know that nothing ever stays the same.”

Dan Millman, *Way of the Peaceful Warrior: A Book That Changes Lives*

Índice Geral

Parte I – Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

| | |
|---|----|
| Lista de Abreviaturas | 9 |
| I. Introdução..... | 10 |
| II. Farmácia Militar de Coimbra do Laboratório Militar de Produtos Químicos e Farmacêuticos..... | 11 |
| III. Análise SWOT | 11 |
| A. Forças (<i>Strengths</i>)..... | 11 |
| A.1. Integração e Equipa Técnica | 11 |
| A.2. Multidisciplinaridade das funções realizadas | 12 |
| A.3. Proximidade ao utente e ao CSMC..... | 14 |
| B. Fraquezas (<i>Weaknesses</i>)..... | 15 |
| B.1. Hesitação no Aconselhamento..... | 15 |
| B.2. Associação entre o nome comercial do medicamento e a prescrição por Denominação Comum Internacional (DCI)..... | 16 |
| B.3. Formações Externas | 16 |
| C. Oportunidades (<i>Opportunities</i>)..... | 17 |
| C.1. Contacto com o <i>Software SPharma</i> ® | 17 |
| C.2. Singularidade do Público-Alvo | 17 |
| C.3. Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica de dispensa Exclusiva em Farmácia (MNSRM-EF)..... | 18 |
| D. Ameaças (<i>Threats</i>)..... | 18 |
| D.1. Dificuldade na aquisição de medicamentos, produtos de saúde e dispositivos médicos pela Sucursal e diminuição das consultas do CSMC..... | 18 |
| D.2. Prescrição por Receita Manual..... | 19 |
| D.3. Pandemia COVID-19..... | 19 |
| IV. Casos Práticos..... | 20 |
| Considerações Finais..... | 22 |
| Referências | 23 |

Parte II – Relatório de Estágio em Indústria Farmacêutica

| | |
|---|----|
| Lista de Abreviaturas | 26 |
| I. Introdução..... | 27 |
| II. Bluepharma Indústria Farmacêutica S.A. | 28 |
| A. Setor de Investigação e Inovação..... | 28 |
| III. Análise SWOT | 28 |
| A. Forças (<i>Strengths</i>)..... | 28 |
| A.1. Integração e Equipa Técnica | 28 |
| A.2. Metodologia <i>Kaizen</i> e Reuniões Semanais..... | 29 |
| A.3. Projeto Desenvolvido | 30 |
| A.4. Ciência no contexto Empresarial..... | 30 |
| A.5. Proximidade com a Orientadora..... | 30 |
| B. Fraquezas (<i>Weaknesses</i>)..... | 31 |

| | |
|---|----|
| B.1. Duração do Estágio..... | 31 |
| C. Oportunidades (<i>Opportunities</i>)..... | 31 |
| C.1. Formação de Integração Geral e Formação Específica | 31 |
| C.2. Regime de Estágio Misto | 32 |
| D. Ameaças (<i>Threats</i>) | 32 |
| D.1. Pandemia COVID-19 | 32 |
| Considerações Finais..... | 33 |
| Referências | 34 |

Parte III – Monografia: "ROR and the Circadian Rhythm"

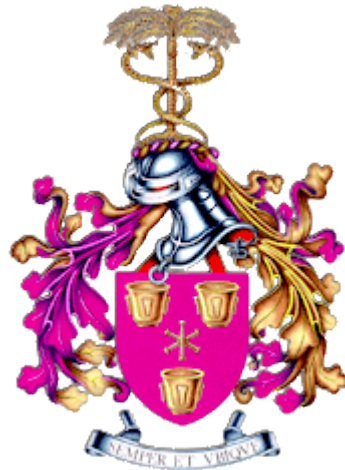
| | |
|--|----|
| List of Abbreviations | 37 |
| Introduction | 41 |
| The genes involved in Circadian Rhythm..... | 41 |
| Related Pathological Processes..... | 42 |
| Melatonin | 44 |
| Main Receptors of Melatonin..... | 44 |
| Main Receptor Ligands of Melatonin..... | 45 |
| Nuclear Receptors | 49 |
| REV-ERBs and ROR relation..... | 49 |
| REV-ERB | 50 |
| Retinoic-related Orphan Nuclear Hormone Receptor (ROR) | 51 |
| The role of RORs in the regulation..... | 52 |
| The circadian rhythm and ROR | 53 |
| RORs and Metabolic Disorders..... | 54 |
| RORs and Autoimmune Diseases..... | 55 |
| ROR Ligands | 55 |
| ROR Synthetic Ligands | 56 |
| ROR Natural Ligands..... | 58 |
| Natural Ligands directly affecting RORs..... | 58 |
| Natural ligands indirectly affecting RORs..... | 64 |
| Future perspectives..... | 66 |
| References..... | 68 |

Parte I

Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

Laboratório Militar de Produtos Químicos e Farmacêuticos

Farmácia Militar de Coimbra



Janeiro de 2021 – Abril de 2021

Estágio sob a orientação do Tenente Coronel Farmacêutico Paulo Santos

Resumo

O Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas culmina na Unidade Curricular “Estágio Curricular” com a realização de estágios. A profissão farmacêutica em Portugal tem evoluído exponencialmente ao longo do tempo, tendo como objetivo essencial a pessoa do utente e a satisfação das suas necessidades. Em diversos casos, a Farmácia Comunitária é a única estrutura acessível à população, sendo um local onde o utente vai em distintos casos e situações. O Farmacêutico é fundamental na sociedade, sendo um profissional de saúde qualificado para um aconselhamento diferenciador e fundamental nas diversas situações que lhe são apresentadas. O Estágio Curricular em Farmácia Comunitária tem um enorme impacto no culminar da formação dos futuros farmacêuticos, sendo fulcral para um maior aprofundamento dos conhecimentos e capacitação dos estudantes de farmácia.

Palavras-chave: Estágio Curricular; Farmacêuticos; Farmácia Comunitária.

Abstract

The Integrated Master's in Pharmaceutical Sciences culminates in the Curricular Unit “Curricular Internship” with the achievement of internships. The pharmacy profession in Portugal has evolved exponentially through the years, with the main point in the patient and the satisfaction of their necessities. In diverse cases, the Community Pharmacy is the only structure accessible to the population, being a place where the patient goes in distinct cases and situations. The Pharmacist is fundamental in society, being a qualified healthcare professional with a differentiated counseling and fundamental in diverse situations. The Curricular Internship has a major impact at the end of the formation of the future pharmacists, being fundamental for a more profound knowledge and capacitation of the pharmacy students.

Keywords: Curricular Internship; Pharmacist; Community Pharmacy.

Lista de Abreviaturas

ADM/IASFA – Assistência na Doença aos Militares/Instituto de Ação Social das Forças Armadas

ADSE – Assistência na Doenças dos Servidores do Estado

COVID-19 – *Coronavirus Disease 2019*

CSMC – Centro de Saúde Militar de Coimbra

DCI – Denominação Comum Internacional

DFA – Deficientes das Forças Armadas

FFUC – Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

IVA – Imposto de Valor Acrescentado

LM – Laboratório Nacional do Medicamento

LMPQF – Laboratório Militar de Produtos Químicos e Farmacêuticos

MICF – Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

MNSRM – EF – Medicamento Não Sujeito a Receita Médica de Dispensa Exclusiva em Farmácia

MNSRM – Medicamento Não Sujeito a Receita Médica

MSRM – Medicamento Sujeito a Receita Médica

SAD-GNR – Serviços de Assistência na Doença – Guarda Nacional Republicana

SAD-PSP – Serviços de Assistência na Doença – Polícia de Segurança Pública

SWOT – *Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats*

I. Introdução

A profissão farmacêutica em Portugal remota ao ano de 1449, sendo denominados os profissionais de boticários. Progressivamente a profissão evoluiu convergindo, ao longo do tempo, nas necessidades do utente e tendo como objetivo essencial a pessoa do utente. Em inúmeros casos, a farmácia comunitária é a única estrutura acessível à população e o farmacêutico, o único profissional com competências para solucionar transtornos de saúde menores, aplicando conhecimentos adquiridos na área, através do aconselhamento e dispensa quer de medicamentos não sujeitos a receita médica (MNSRM) quer de medicamentos não sujeitos a receita médica de venda exclusiva em farmácia (MNSRM – EF). Com a pandemia de COVID-19, o papel das Farmácias foi preponderante, sendo consideradas o local que transmite a maior sensação de segurança, destacando-se dos demais locais de prestação de cuidados. As farmácias são o segundo local ao qual os cidadãos mais recorrem em casos de um problema de saúde comum, superando os hospitais e a Linha SNS24 e ficando apenas aquém dos centros de saúde. É de demarcar o papel fulcral que o farmacêutico tem enquanto agente de saúde pública e, enquanto, profissionais de saúde, assim como, o papel das farmácias nos desafios de saúde ^{1;2}.

O Plano de Estudos do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF), ministrado na Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (FFUC), destaca-se pela sua abrangência e multidisciplinariedade ao longo dos seus cinco anos, desdobrando-se em 10 semestres letivos, num total de 300 créditos ECTS. A Unidade Curricular “Estágio Curricular” culmina o plano de estudos através da realização de estágios. A componente na Farmácia Comunitária permite a aplicabilidade do conhecimento adquirido ao longo dos anos de formação, capacitando os futuros profissionais de saúde para o exercício da profissão.

O estágio curricular, na sua vertente da farmácia comunitária, iniciou-se em janeiro de 2021, terminando em abril de 2021, decorrendo sob a orientação do Tenente Coronel Farmacêutico Paulo Santos, Chefe da Farmácia Militar de Coimbra do Laboratório Militar de Produtos Químicos e Farmacêuticos (LMPQF).

O presente relatório, efetuado na componente de Farmácia Comunitária da Unidade Curricular “Estágio Curricular”, tem por premissa a realização de uma análise SWOT (*Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats*), permitindo uma avaliação global dos conhecimentos adquiridos ao longo do Curso e a sua aplicabilidade no futuro exercício da profissão. Compila-se, assim, em análise detalhada Forças e Fraquezas, inerentes à minha formação e Oportunidades e Ameaças, notáveis ao longo do estágio curricular.

II. Farmácia Militar de Coimbra do Laboratório Militar de Produtos Químicos e Farmacêuticos

O LMPQF, atualmente denominado por Laboratório Nacional do Medicamento (LM), enquanto instituição centenária inserida no Exército, tem por missão assegurar o apoio logístico na área do medicamento e sanitário ao sistema de saúde militar e às Forças Armadas, aos seus familiares e aos Deficientes das Forças Armadas (DFA), respondendo, também, às necessidades do Ministério da Saúde, destacando-se pelo seu relevante papel na produção e manipulação de medicamentos³⁻⁶.

A Farmácia Militar de Coimbra, enquanto uma das sete sucursais a nível nacional que integra o LMPQF, encontra-se situada na Rua Vandelli, na cidade de Coimbra, prestando auxílio direto ao Hospital Militar Regional, N°2, atual Centro de Saúde Militar de Coimbra (CSMC), pela proximidade ao mesmo. Esta sucursal encontra-se aberta ao público de segunda-feira a sexta-feira, das 9h às 17h.

A equipa técnica desta sucursal é constituída pelo Chefe da Sucursal Tenente Coronel Farmacêutico, Paulo César Santos, pelo Diretor Técnico, Victor Rodrigues, pelo Tenente Técnico de Saúde, Jorge Ferreira, pela Assistente Administrativa, Celeste Casquilho e pelo Assistente Administrativo, Vítor Nogueira.

III. Análise SWOT

A. Forças (Strengths)

A.I. Integração e Equipa Técnica

Ao longo do estágio na Farmácia Militar de Coimbra, foi proeminente o apoio incondicional da equipa técnica na realização das demais tarefas. Aquando do início desta jornada, a receção por parte do diretor técnico e o auxílio de uma estagiária, permitiram a dinamização de uma dinâmica única, permitindo-me esclarecer todas as dúvidas, enquanto adquiria conceitos e métodos necessários para o atendimento ao público no balcão. O conhecimento dos procedimentos internos, através da leitura do Manual de Procedimentos Internos da Farmácia Militar de Coimbra, permitiu uma proximidade ao método de trabalho praticado, tendo-me sido dada, no entanto, total abertura a sugestões no melhoramento dos processos. Foram preponderantes o acompanhamento e a disponibilidade de todos os elementos, permitindo uma dinâmica única e de total integração desde o primeiro dia, tendo

tido a possibilidade de colaborar em todos os serviços prestados e processos inerentes à sucursal. No decorrer do estágio, tive a oportunidade singular de assumir uma postura de ensino e ajuda com duas estagiárias que iniciaram posteriormente o seu estágio. Esta postura fomentou o meu espírito crítico e autónomo, fornecendo-me ferramentas necessárias para uma maior confiança e solidez nas demais tarefas que desempenhei.

O espírito de equipa, o companheirismo, a comunicação e a confiança transmitida pela equipa que integra esta estrutura, foram pilares fulcrais para o sucesso deste estágio, permitindo-me evoluir exponencialmente quer a nível pessoal, mas acima de tudo a nível profissional e realçando o papel fulcral que o farmacêutico assume na sociedade.

A.2. Multidisciplinaridade das funções realizadas

No decorrer do estágio foi-me permitido contactar com diversas funções inerentes ao normal funcionamento desta sucursal. Ao longo de diversos tópicos explanarei algumas das tarefas que tive oportunidade de realizar, sendo fundamentais para a minha experiência no âmbito da farmácia comunitária.

Backoffice

Ao longo do período de estágio foi-me possível desempenhar diversas funções de *backoffice*, maioritariamente associado ao aprovisionamento, armazenamento e gestão de *stocks*, em funções específicas como a conferência de prazos de validade dos medicamentos e produtos de saúde, a receção de encomendas e o armazenamento e gestão do *stock* da sucursal.

Na receção de encomendas, o procedimento incorporava a conferência do prazo de validade dos produtos rececionados, a conferência do preço de custo, o cálculo ou conferência do preço de venda ao público e o imposto de valor acrescentado (IVA) dos produtos. O sistema, no caso específico de produtos que haviam sido previamente reservados para certos utentes, emitia um alerta de reservas ao utilizador, permitindo uma separação destes produtos, sendo estes depois armazenados em local próprio. A proximidade e o manuseamento dos medicamentos e produtos de saúde e bem-estar, permitiu, numa fase inicial, um conhecimento mais profundo dos medicamentos de maior rotação na farmácia, assim como, uma associação do nome do produto à respetiva embalagem, ferramentas essenciais para uma associação entre o lugar de armazenamento e exposição, permitindo um atendimento ao balcão, posteriormente, mais profícuo.

Tendo em conta a duração do estágio, foi necessário no decorrer do mesmo, proceder à conferência dos prazos de validade dos medicamentos e produtos de venda livre, sendo que todos os produtos cujo prazo de validade expirasse nos três meses seguintes à conferência, eram reorganizados de forma a evitar futuros erros na dispensa. Todos os meses eram realizadas devoluções aos respetivos fornecedores dos produtos que expiravam no mês seguinte. Estas devoluções eram posteriormente resolvidas e registadas em sistema através de três opções: não aceite, troca pelo mesmo produto ou emissão de nota de crédito. Com a gestão do stock e sua respetiva organização, foi-me possível compreender quais as condições de armazenamento exigidas, assim como os diversos locais de arrumação.

Sendo um ponto de proximidade à Farmácia Hospitalar do CSMC e ao Laboratório de Análises Clínicas do CSMC, a farmácia além de adquirir produtos para aviamento ao balcão, fornecia um apoio direto a estas duas estruturas, enriquecendo o meu estágio pelo contacto direto com os procedimentos díspares inerentes a estas dinâmicas. Sendo o Hospital Militar Regional N°2 um local de vacinação para a COVID-19 foi-me possível acompanhar a equipa técnica do CSMC no desenvolvimento dos processos para a vacinação, permitindo um enriquecimento do meu estágio.

Sendo a maioria destes procedimentos realizada em sistema, essencialmente recorrendo ao uso do *software* SPharma®, o sistema informático de gestão da farmácia, permitiu-me uma melhor adaptação e compreensão do programa e principais fornecedores do LMPQF, fornecendo ferramentas essenciais para o atendimento ao balcão.

Atendimento ao Balcão

Desde o início do estágio, e associado às funções realizadas em *backoffice*, foi fomentada a aprendizagem observacional dos diversos atendimentos ao balcão realizados pela equipa técnica que trabalhava na farmácia. A visualização do atendimento, associado à leitura do Manual de Procedimentos Internos, permitiu a interiorização do método de trabalho, das etapas inerentes à dispensa dos medicamentos e produtos de saúde e do modo de funcionamento inerente ao sistema de gestão. Progressivamente, através da aquisição de autonomia e de espírito crítico, iniciei a realização de atendimentos com a supervisão do diretor técnico, permitindo-me desenvolver uma crescente independência nas funções. Foi estimulado o desenvolvimento do meu método pessoal de trabalho, desde que este respeitasse as etapas inerentes ao procedimento interno e minimizasse a possibilidade de erro.

Apesar de todo o conhecimento adquirido ao longo do plano de estudos curricular, o aconselhamento farmacêutico foi a componente mais desafiante. Considero que no decorrer

do estágio a minha confiança no aconselhamento farmacêutico aumentou exponencialmente, sendo fundamental o auxílio do diretor técnico na compreensão das diversas *nuances* associadas aos diversos artigos. O aconselhamento farmacêutico de medidas não farmacológicas, de produtos de saúde, de MNSRM ou de MNSRM-EF, permitiu-me vivenciar na primeira pessoa o impacto fundamental que o farmacêutico tem diariamente na qualidade de vida do utente, enriquecendo-me profundamente na vertente profissional e cativando a minha curiosidade a atualizar e aprofundar os meus conhecimentos.

Serviços de Saúde Diferenciados

Através de diversos serviços farmacêuticos com vista à promoção da saúde e bem-estar dos seus utentes, a Farmácia Militar de Coimbra dispõe de diversos serviços farmacêuticos, tais como: a administração de medicamentos e vacinas injetáveis não incluídas no Plano Nacional de Vacinação, a medição de parâmetros biofísicos (como a medição da pressão arterial) e a avaliação de parâmetros antropométricos. Tendo utentes que frequentemente se dirigiam à farmácia para a medição dos parâmetros bioquímicos e biofísicos, foi-me possível aplicar de forma mais personalizada e próxima os conhecimentos adquiridos ao longo da minha formação. Foram também diversas as oportunidades de explicação das técnicas de utilização de dispositivos médicos, destacando-se os aparelhos de medição de glicémia e dispositivos de inalação, permitindo-me fomentar e promover a literacia em saúde.

Tendo em conta a necessidade ambiental global, é fundamental a responsabilidade na gestão dos resíduos de embalagens vazias e medicamentos fora de uso de origem doméstica. Assim, surge o projeto de saúde pública que a farmácia integrava, promovido pela VALORMED, uma sociedade sem fins lucrativos ⁷. Existia, portanto, um dinamismo, promovido pela equipa técnica na promoção das campanhas da VALORMED, assim como, uma sensibilização próxima do utente para a necessidade de entregarem os resíduos de medicamentos no ponto de recolha da farmácia. A conscientização desta necessidade no utente, exponencia o valor do farmacêutico enquanto agente cujo foco de ação é o utente, não descorando, no entanto, o meio envolvente e a preservação do ambiente.

A.3. Proximidade ao utente e ao CSMC

Na sua maioria, os utentes da Farmácia Militar de Coimbra são utentes habituais tendo, em diversas temáticas, uma notória preferência pela equipa técnica da farmácia, sendo este um desafio inicial na realização de atendimentos pelos estagiários. Com a pandemia de COVID-19, houve a necessidade de efetuar a rotação de turnos, condicionando o utente à equipa técnica presente no turno. Neste sentido, foi necessário um esforço da minha parte na

compreensão e numa maior disponibilidade para a resolução das necessidades dos utentes, quer na dispensa do Medicamento Sujeito a Receita Médica (MSRM), quer de MNSRM ou produtos de saúde e bem-estar, levando à criação de um crescente vínculo de confiança no trabalho realizado pelos estagiários, notório no final do estágio.

Pode considerar-se que, pela proximidade ao CSMC, a maioria dos utentes da farmácia, se caracterizam por serem pessoas que se deslocavam às consultas de especialidade médica ou funcionários da unidade de saúde. Os períodos de maior afluência, usualmente no período da manhã, encontravam-se muitas vezes sincronizados com a presença de clínicos no centro de saúde. Estas condicionantes, geram uma população de utentes heterogénea, com distintas necessidades, distintas patologias e idades. As diferentes necessidades apelavam a um atendimento personalizado, com uma total disponibilidade e profissionalismo no momento do aconselhamento e do atendimento farmacêutico, primando pela excelência que caracteriza esta instituição centenária, levando à fidelização de novos clientes com novas necessidades.

Tendo em conta a minha formação pessoal, o contacto de proximidade, o acompanhamento personalizado quer presencialmente quer por telefone aos utentes, assim como, a disponibilidade para uma postura empática nos atendimentos, foram mais-valias que adquiri e que certamente me moldaram para o meu futuro enquanto profissional.

B. Fraquezas (*Weaknesses*)

B.1. Hesitação no Aconselhamento

Apesar da formação que adquiri ao longo dos cinco anos do meu percurso académico, o maior desafio com que me deparei inicialmente foi o Aconselhamento Farmacêutico. O conhecimento dos produtos disponíveis, segundo o enorme leque de produtos de saúde e MNSRM, a compreensão da situação apresentada segundo cada utente e a necessidade de transmitir recomendação farmacêutica de valor para o tratamento de problemas de saúde e afeções menores, demonstraram-se como um obstáculo inicial, principalmente no que concerne às posologias, às dosagens, ao início de tratamentos e períodos de tratamento de certos MNSRM e suplementos.

Neste sentido, foi fundamental para a superação desta barreira, a observação dos atendimentos e a prática da escuta ativa, procurando compreender a estrutura da árvore da decisão farmacêutica em cada situação específica, assim como, as questões fundamentais a realizar de forma a culminar na escolha do produto ideal segundo a necessidade apresentada e prestando aconselhamento farmacêutico. Foi exponencial o meu crescimento nesta

vertente, tendo uma crescente confiança no decorrer do estágio e fomentando o meu espírito crítico.

B.2. Associação entre o nome comercial do medicamento e a prescrição por Denominação Comum Internacional (DCI)

A prescrição médica, atualmente é feita por Denominação Comum Internacional (DCI) da substância ativa, permitindo assim ao utente ter a opção de adquirir um determinado medicamento que esteja integrado num grupo homogéneo. Apesar de diversas Unidades Curriculares aproximarem as diversas substâncias ativas ao mecanismo inerente e à indicação farmacêutica associada, raramente são referenciados e associados os nomes comerciais.

Tendo por premissa os utentes habituais da farmácia, foi notória a preferência destes por medicamentos de marca, ao invés dos medicamentos genéricos, sendo associação do DCI ao nome de referência uma dificuldade que senti ao iniciar os atendimentos ao balcão. Esta dificuldade tornava em determinados momentos, o atendimento mais complexo, levando a que não conseguisse dar uma resposta imediata. De forma a colmatar esta dificuldade, o uso do *software* SPharma® foi fundamental, permitindo-me consultar as opções existentes no grupo homogéneo para um determinado princípio ativo prescrito pelo médico, tentando também esclarecer com a equipa técnica quaisquer dúvidas. O contacto mais próximo com os medicamentos, através das funções em *backoffice* e dos diversos atendimentos permitiu-me, com a experiência, superar o ponto fraco supracitado.

B.3. Formações Externas

As formações externas são usualmente dinamizadas por entidades externas, permitindo um aprofundamento de temas como a dermocosmética, dispositivos médicos ou aconselhamento diferenciado, sendo dinamizadas junto das farmácias comunitárias. Infelizmente, devido à escassa divulgação deste tipo de iniciativas junto do LMPQF, não tive oportunidade de realizar este tipo de formação.

Estes tipos de formações são fulcrais no aprofundamento de temas e na aquisição de novos conhecimentos, principalmente em termos dos produtos comercializados nas farmácias, permitindo a partilha de informações e ferramentas úteis no atendimento. Considero, assim, que estas formações permitiriam uma aprendizagem extra de conhecimentos.

C. Oportunidades (*Opportunities*)

C.1. Contacto com o *Software* SPharma®

Ao contrário da maioria das farmácias comunitárias, a Farmácia Militar de Coimbra utiliza o *software* SPharma®, sistema de gestão de farmácias desenvolvido pela SoftReis, empresa pertencente ao SIER Group, desenvolvedora de produtos na área da saúde. Este sistema está presente em todos os processos da farmácia, facilitando a habitual atividade, sendo de fácil e rápida utilização e aumentando a eficiência dos processos. Sendo extremamente intuitivo, este *software* permite consultar informação técnico-científica, efetuar reservas, identificar alternativas terapêuticas, alertar para possíveis interações medicamentosas, assim como, aceder ao *stock* e aceder ao histórico de vendas dos utentes, permitindo-me desempenhar as funções de forma autónoma e fluída, diminuindo a ocorrência de erros no processo de dispensa.

C.2. Singularidade do Público-Alvo

A Farmácia Militar de Coimbra tem a particularidade de apenas dispensar MSRM a beneficiários dos subsistemas de saúde: Assistência na Doença dos Servidores do Estado (ADSE), Assistência na Doença aos Militares/Instituto de Ação Social das Forças Armadas (ADM/IASFA), Serviços de Assistência na Doença – Polícia de Segurança Pública (SAD-PSP) ou Serviços de Assistência na Doença – Guarda Nacional Republicana (SAD-GNR). Neste universo de utentes, destacam-se os DFA, “cidadãos que se deficitaram no cumprimento do serviço militar, em resultado de acidente e/ou doença em serviço de campanha”⁸. Os DFA têm comparticipação a 100% nos medicamentos, produtos de saúde e dispositivos médicos, desde que apresentem, nas sucursais do LMPQF, uma receita médica prescrita num Hospital Militar e que, em casos específicos como os dispositivos médicos, permite a solicitação de orçamentos para a aquisição do equipamento segundo as necessidades do utente.

Sendo uma particularidade da Farmácia Militar, esta vertente permitiu-me desenvolver uma postura única aquando destes atendimentos, tentando satisfazer as necessidades e as questões inerentes a estas situações específicas, necessitando de uma moldagem na minha abordagem para estas situações. Destaco, no entanto, esta experiência como uma das mais marcantes e humanas, tendo em conta, muitas vezes, o contexto da situação apresentada.

C.3. Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica de dispensa Exclusiva em Farmácia (MNSRM-EF)

Uma das maiores oportunidades e mais-valia dos farmacêuticos, atualmente, são os MNSRM-EF, permitindo um aconselhamento dedicado, diferencial e seguro na utilização para o utente. Estes medicamentos, com características e enquadramentos específicos em uma determinada patologia, permitem uma dispensa ao utente sem receita médica, desde que conste o seu DCI no Anexo I do regulamento dos MNSRM-EF, tendo de cumprir com os protocolos de dispensa do Anexo II do mesmo regulamento ⁹. Sendo uma dispensa supervisionada por um profissional de saúde qualificado, como o farmacêutico, estes são uma oportunidade e um fator diferenciador, permitindo uma utilização eficaz e segura, baseada no uso racional do medicamento, evitando-se situações de automedicação.

D. Ameaças (*Threats*)

D.1. Dificuldade na aquisição de medicamentos, produtos de saúde e dispositivos médicos pela Sucursal e diminuição das consultas do CSMC

No início do meu estágio e, pela integração da farmácia no Exército, a aquisição de dispositivos médicos, estava condicionada, não sendo possível adquirir este tipo de produtos ao fornecedor habitual. Esta situação gerou insatisfação, principalmente junto dos utentes, levando à impossibilidade de satisfazer necessidades específicas. No término do meu estágio, a farmácia ficou condicionada, também, na aquisição de medicamentos e produtos de saúde, levando a uma progressiva diminuição do *stock*, causada pela incapacidade de repor os produtos vendidos. Este fator condicionou o atendimento, levando por vezes a uma incompreensão pela situação e insatisfação junto dos utentes.

Ao longo do período de estágio, e tendo em conta que o fornecedor das sucursais do LMPQF é escolhido após concurso público e apresentação de propostas, apenas foi possível encomendar medicamentos e produtos de saúde a um fornecedor grossista, a Cooprofar. Esta restrição causou, em diversos momentos, situações de produtos esgotados e rateados, não sendo possível a aquisição a outro fornecedor. Também as entregas do fornecedor eram efetuadas apenas uma vez por dia, no período da manhã, levando à procura pelos utentes de outras farmácias ou parafarmácias.

Progressivamente o número de consultas foi sendo reduzido no CSMC, sendo apenas realizadas de manhã. Esta situação causou um afluxo de utentes superior no período da manhã,

causando uma diminuição abrupta no período da tarde. No entanto, este período da tarde era rentabilizado na aprendizagem de novos processos e no aprofundamento de conhecimentos.

D.2. Prescrição por Receita Manual

Durante o período do estágio, contactei com diversos tipos de receituário (prescrição eletrónica desmaterializada, prescrição eletrónica materializada e prescrição manual). Tendo o CSMC uma proximidade única à sucursal, maioritariamente as receitas eram prescritas neste centro de saúde que, devido a atualizações de sistema, durante determinados períodos necessitou de recorrer à prescrição manual. Esta prescrição, tendo de cumprir regras específicas e bem-definidas nas Normas relativas à prescrição de medicamentos e produtos de saúde, em diversas situações apresentava incorreções, sendo necessário o deslocamento ao CSMC de forma a corrigir estas situações. Também em termos de compreensão, em diversos momentos esta foi morosa, levando a uma insegurança na dispensa dos medicamentos. Esta situação foi colmatada através do contacto direto com o médico causando, no entanto, atrasos no atendimento e alterações na dinâmica de trabalho. Considero assim, fundamental, a estimulação à prescrição por prescrição eletrónica, facilitando o reconhecimento do DCI, da forma farmacêutica e da dosagem e minimizando a possibilidade de ocorrência de erro, muito mais prevalente na prescrição manual.

D.3. Pandemia COVID-19

A pandemia COVID-19 afetou de forma constante todo o meu período de estágio. A implementação dos turnos, de forma a reduzir os contactos entre os elementos da equipa técnica levou a uma alteração da dinâmica de trabalho, levando a um esforço adicional na integração e gestão da equipa. Apesar desta alteração, é de mencionar que em nenhum momento senti uma falta de acompanhamento por parte da direção técnica, permitindo uma dinâmica única de trabalho entre as estagiárias e fomentando o trabalho em sinergia e dupla.

Também a utilização de equipamento de proteção individual, a adoção de regras de etiqueta respiratória, da desinfeção constante de bancadas e locais comuns e a higienização das mãos foram constantes ao longo do estágio. Esta situação causou, no entanto, uma deslocação de menos utentes à farmácia, levando a deslocações segundo a necessidade e causando uma maior dificuldade no aconselhamento e na prática dos serviços farmacêuticos, sendo estas deslocações realizadas para a aquisição de medicamentos para patologias crónicas. Também a comunicação foi afetada, sendo por vezes complexa a comunicação com a população geriátrica devido ao uso de máscara e das barreiras físicas. Sinto, no entanto, que este desafio foi sendo colmatado com um discurso mais pausado e adequado às necessidades

e com uma busca constante, da minha parte, por um atendimento mais personalizado e integrado com uma promoção da literacia e de medidas preventivas no âmbito da COVID-19.

IV. Casos Práticos

Aquando da realização do estágio, foram diversas as situações que foi necessário um aconselhamento mais personalizado e uma resposta a situações específicas. Em seguida apresento três situações nas quais tive a oportunidade de aplicar os conhecimentos adquiridos.

Caso I

Um utente jovem dirigiu-se à farmácia, solicitando um aconselhamento para uma sensação de dor no lábio. Quando questionado, o utente referiu estar numa altura de elevado *stress* e sentia comichão, formigueiro, vermelhidão e uma ligeira dor na zona do lábio. Compreendendo que pelos sintomas apresentados possivelmente estaria perante uma situação de herpes labial, aconselhei a utilização do MNSRM Zovirax® Creme 50mg/g indicado para o tratamento de infeções de vírus *Herpes simplex*. Recomendei a aplicação de 4 em 4 horas durante o período de 5 dias¹⁰. Aconselhei que iniciasse o tratamento o quanto antes pois o início mais precoce diminuí a probabilidade de aparecimento da ferida. Recomendei a adoção de medidas não-farmacológicas, evitando ao máximo situações de *stress* e coadjuvando o tratamento com a aplicação de um *stick* labial com proteção solar (Uriage Bariésun Stick SPF 50+), evitando a exposição solar já que esta é fator desencadeante do herpes labial. A hidratação é um fator fulcral no tratamento, devendo ser aplicados adjuvantes da cicatrização de forma a restaurar a estrutura do epitélio labial. Recomendei a lavagem das mãos aquando e após a aplicação do Zovirax®, devido à possibilidade de contacto com a lesão, devendo evitar a partilha de objetos.

Caso II

Um utente jovem, dirigiu-se à farmácia para o aviamento da prescrição médica. Aquando do atendimento ao balcão, o utente confidenciou ter diagnóstico médico de hemorroidas, solicitando a venda da pomada retal faktu®, 50mg/g+10mg/g, tendo prolapso anal e dor ao defecar. O utente explicou que se encontrava atualmente em teletrabalho, passando diversas horas sentado. Aconselhei a associação da pomada com o uso do Daflon® 1000mg, uma associação de Bioflavonoides, tomando, durante a crise hemorroidária, nos 4 primeiros dias com 1 comprimido, 3 vezes ao dia, seguido de 3 dias com 1 comprimido, 2 vezes ao dia, adotando depois uma posologia de manutenção com 1 comprimido ao dia¹¹. Aconselhei a

adoção de medidas não farmacológicas, como a maior ingestão de fibras e de fluídos, a supressão de alimentos muito condimentados, uma redução na toma de café e uma diminuição dos períodos em posição sentada. Aconselhei também a uma limpeza da zona anal suavemente, associada a banhos de assento com água tépida com a duração de 10 a 15 minutos, 2 a 3 vezes ao dia. No caso de crises agudas, era recomendada a lavagem com água fria ou a aplicação de gelo.

Caso III

Uma senhora na faixa etária dos 50 anos dirigiu-se à farmácia com uma situação de prisão de ventre. Procurava uma solução para esta situação por ser uma condição que durava há cerca de 4 dias. A utente rapidamente descartou a possibilidade de uma gravidez, confidenciando que a obstipação a afetava cronicamente, realizando uma alimentação fraca em fibras e com baixa hidratação. Aconselhei então o uso do laxante Doce Alívio[®], um laxante de contacto, MNSRM-EF, durante dois a três dias, associado ao uso do Laevolac[®], um laxante osmótico. A associação destes dois laxantes permite um efeito rápido pelo laxante de contacto durante o período de latência do laxante osmótico que irá proporcionar o aumento da fluidez das fezes. Outra vantagem da associação é o evitar situações de obstipação crónica por abuso do laxante de contacto, estando a sua utilização limitada a 2-3 dias. Em termos de medidas não farmacológicas, aconselhei em primeira instância à implementação de uma dieta rica em fibras e à ingestão de muitos líquidos. Aconselhei a reeducação do intestino, a prática da atividade física e a diminuição progressiva do uso do laxante com a melhoria da condição.

Considerações Finais

Durante os quatro meses em que tive o privilégio de contactar e estagiar na Farmácia Militar de Coimbra, considero que existiu um aprofundamento notório dos conhecimentos adquiridos ao longo do meu percurso académico, moldando-me e enriquecendo-me enquanto futura farmacêutica. O meu empenho e a minha curiosidade foram constantes, considerando que se refletiram quer no contacto com os doentes, quer nas funções que desempenhei. A proximidade ao CSMC, os processos singulares e a intercolaboração existente foram fundamentais no meu aproveitamento e no enriquecimento das minhas decisões em momentos de aconselhamento e indicação farmacêutica para diversas situações.

Não posso, no entanto, deixar de realçar o papel fundamental que a equipa técnica, com especial destaque a direção técnica, assumiu desde o primeiro dia, proporcionado um ambiente constante de aprendizagem e de melhoria contínua. O ambiente em que fui recebida, a amabilidade e a centralização do utente na atuação são os pilares basilares que regem esta equipa e que, facilmente, me contagiaram. O LMPQF prima pela excelência e a Farmácia Militar de Coimbra é a prova viva de que a excelência é alcançável com um esforço conjunto, apesar de todas as dificuldades e obstáculos que possam advir, destacando-se pelo profissionalismo e pela elevada qualidade nos serviços prestados aos utentes que se dirigiam à farmácia. A eles, o meu sentido agradecimento pela confiança incondicional e o carinho com que me acolheram.

O estágio curricular permite-nos adquirir uma visão única do mundo real, uma visão fora dos bancos da faculdade, com pessoas reais e com situações reais. O Farmacêutico está e deverá estar sempre no leme da evolução, na constante melhoria e na aprendizagem contínua, não devendo nunca descorar do foco primordial, o utente e as suas necessidades.

Esta passagem pela Farmácia Comunitária permitiu-me adquirir metodologias de trabalho, organização, comunicação e autonomia, pilares basilares e fundamentais no exercício de qualquer profissão e que permitiram uma expansão dos meus horizontes e o meu enriquecimento. Hoje posso afirmar que cresci enquanto pessoa, mas cresci acima de tudo a nível profissional e adquiri as bases para o meu futuro enquanto Futura Farmacêutica.

Referências

1. A Farmácia Comunitária - Farmácia Comunitária - Áreas Profissionais - Ordem dos Farmacêuticos - [Consult. 9 ago. 2021]. Disponível em: <https://www.ordemfarmaceuticos.pt/pt/areas-profissionais/farmacia-comunitaria/a-farmacia-comunitaria/>
2. OS FARMACÊUTICOS E A PANDEMIA Linha de Apoio Linha de Apoio Linha de Apoio ao Farmacêutico ao Farmacêutico ao Farmacêutico - (2020).
3. Decreto-Lei n.º 13/2021 - DRE - [Consult. 9 ago. 2021]. Disponível em: <https://dre.pt/web/guest/home/-/dre/156974201/details/maximized?serie=1>
4. Decreto-Lei 102/2019, 2019-08-06 - DRE - [Consult. 9 ago. 2021]. Disponível em: <https://dre.pt/home/-/dre/123725410/details/maximized>
5. Laboratório Nacional do Medicamento sucede ao Laboratório Militar de Produtos Químicos e Farmacêuticos - Notícias - Ordem dos Farmacêuticos - [Consult. 9 ago. 2021]. Disponível em: <https://www.ordemfarmaceuticos.pt/pt/noticias/laboratorio-nacional-do-medicamento-sucede-ao-laboratorio-militar-de-produtos-quimicos-e-farmaceuticos/>
6. Exército Português - Quem Somos - [Consult. 9 ago. 2021]. Disponível em: <https://www.exercito.pt/pt/quem-somos/organizacao/ceme/cmdlog/lmpqf>
7. Homepage :: ValorMed - [Consult. 9 ago. 2021]. Disponível em :<http://valormed.pt/intro/home>
8. Deficientes das Forças Armadas - [Consult. 9 ago. 2021]. Disponível em: <https://www.defesa.gov.pt/pt/adesaeeu/dfa>
9. Lista de DCI - MNSRM-EF - INFARMED, I.P. - [Consult. 9 ago. 2021]. Disponível em : https://www.infarmed.pt/web/infarmed/entidades/medicamentos-uso-humano/autorizacao-de-introducao-no-mercado/alteracoes_transferencia_titular_aim/lista_dci
10. Produtos para o Herpes Labial | Zovirax - [Consult. 9 ago. 2021]. Disponível em: <https://www.zovirax.pt/cold-sore-products.html>
11. Doença Hemorroidária - Daflon - [Consult. 9 ago. 2021]. Disponível em: <https://www.daflon.pt/doenca-hemorroidaria/>

Parte II

Relatório de Estágio em Indústria Farmacêutica

Bluepharma Indústria Farmacêutica, S.A.



Maio de 2021 – Julho de 2021

Estágio sob a orientação da Doutora Ana Catarina Pinto e supervisão do Doutor António
Lucas Nunes

Resumo

A Unidade Curricular “Estágio Curricular” culmina os estudos do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas através da realização de estágios. É dada a oportunidade aos estudantes finalistas de estagiarem em diversas áreas, promovendo a aquisição e o aprofundamento de ferramentas essenciais para o mercado de trabalho. A Indústria Farmacêutica agrega em si diversas áreas, causando um notório impacto na sociedade. O Estágio Curricular no Setor de Investigação e Inovação da Bluepharma Indústria Farmacêutica, S.A., fomentou a compreensão do desenvolvimento de métodos e formulações na fase inicial do desenvolvimento do medicamento.

Palavras-chave: Estágio Curricular; Investigação e Inovação; Indústria Farmacêutica.

Abstract

The Curricular Unit “Curricular Internship” culminates the studies of the Integrated Master’s in Pharmaceutical Sciences with the achievement of internships. It’s given the opportunity to the finalists’ students to achieve an internship in diverse areas, promoting the acquisition and deepening of the essential tools for the job market. The Pharmaceutical Industry aggregates in herself distinct areas, causing a notorious impact in the society. The Curricular Internship in the Department of Research and Innovation at Bluepharma Pharmaceutical Industry, S.A., foment the comprehension of the development of methodologies and formulations in the initial phases of the drug development.

Keywords: Curricular Internship; Research and Innovation; Pharmaceutical Industry.

Lista de Abreviaturas

BLPH – Bluepharma Indústria Farmacêutica, S.A.

COVID-19 – *Coronavirus Disease 2019*

FFUC – Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

I&I – Investigação e Inovação

MICF – Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

SWOT – *Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats*

I. Introdução

O Plano de Estudos do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF), ministrado na Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (FFUC), destaca-se pela sua singularidade e multidisciplinariedade, culminando na Unidade Curricular “Estágio Curricular” através da realização de estágios. É dada a oportunidade aos finalistas do MICF de estagiarem em áreas díspares, de forma a enriquecer o seu percurso académico, promovendo a aquisição de ferramentas essenciais para o mercado de trabalho.

A indústria farmacêutica, pela sua demarcada multidisciplinariedade e impacto na sociedade, despertou desde cedo o meu interesse em realizar um estágio nesta área. Agregando a indústria farmacêutica em si diversas áreas, tive a oportunidade de estagiar no Setor de Investigação e Inovação (I&I) da Bluepharma Indústria Farmacêutica, S.A. (BLPH), após um processo de candidatura, entrevista e seleção pelos recursos humanos da BLPH. Esta oportunidade permitiu-me compreender o rigor e a dinâmica ímpar associada a este setor, assim como, o papel fulcral que a investigação e os Assuntos Científicos têm a montante para a obtenção e desenvolvimento de métodos analíticos e formulações farmacêuticas¹.

O estágio curricular, na sua vertente da Indústria Farmacêutica, iniciou-se no dia 03 de maio de 2021, culminando no dia 30 de julho de 2021, decorrendo na Bluepharma Indústria Farmacêutica, S.A., no Setor de Investigação e Inovação sob a orientação da Doutora Ana Catarina Pinto e supervisão do Doutor António Lucas Nunes.

Através de uma análise SWOT (*Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats*), o presente relatório, realizado na componente de Indústria Farmacêutica da Unidade Curricular “Estágio Curricular”, apresenta uma avaliação global do decorrer desta vertente, assim como, uma reflexão acerca da sua aplicabilidade no futuro exercício da profissão. Compila-se, assim, em análise detalhada Forças e Fraquezas, inerentes à minha formação e Oportunidades e Ameaças, notáveis ao longo do estágio curricular.

II. Bluepharma Indústria Farmacêutica S.A.

A BLPH, sediada em São Martinho do Bispo, Coimbra, conta já com 20 anos de dedicação à cadeia de valor do medicamento, desde o I&I ao mercado, destacando-se pelas unidades de produção, qualidade e formação. A BLPH produz atualmente para mais de 40 países, destacando-se em três áreas distintas: produção de medicamentos próprios e para terceiros; investigação, desenvolvimento e registo de medicamentos; e medicamentos genéricos e sua comercialização. Movidos pela missão de investigar e desenvolver medicamentos de elevado valor acrescentado e contínua inovação dos seus processos de fabrico e comercialização, a BLPH procura fomentar o desafio e a superação dos seus colaboradores, fornecendo ferramentas essenciais na realização das suas tarefas, em processo de melhoria contínua ².

A. Setor de Investigação e Inovação

O Setor de Investigação e Inovação insere-se no Departamento de Parcerias Estratégicas e Desenvolvimento de Produto da BLPH, subdividindo-se em duas unidades distintas: Inovação Tecnológica e Assuntos Científicos, unidade na qual decorreu o meu estágio. Os Assuntos Científicos são responsáveis pelo suporte científico ao setor da I&I e aos diversos departamentos da BLPH, permitindo desenvolver, a montante, o conhecimento e o contexto relativo a possíveis áreas de foco na ação da BLPH.

Devido à pandemia de COVID-19, a equipa de I&I realizava as atividades laboratoriais em turnos no horário das 8h30 às 15h30 e das 16h às 23h seguido de teletrabalho, estando, no entanto, elementos da equipa em teletrabalho no horário das 8h30 às 17h30.

III. Análise SWOT

A. Forças (*Strengths*)

A.I. Integração e Equipa Técnica

A equipa técnica de I&I destaca-se pela combinação da experiência de alguns elementos da equipa associada à jovialidade dos restantes, sendo notória a elevada multidisciplinariedade, o exímio rigor e a alta qualificação que os elementos depositam no desenvolvimento das suas atividades diárias. Regendo-se por uma atitude de integração, de um ambiente propício à discussão e intercolaboração, todos os elementos são integrados na discussão dos temas

diários e relevantes ao desenvolvimento da atividade e ação da BLPH, propiciando uma interação constante e desafiante.

Com funções bem definidas, todos os elementos estão integrados numa unidade do setor, otimizado e com desafios bem definidos, sendo notório o espírito de equipa e entreajuda entre colegas. Estas características fomentaram uma fácil integração na equipa, fazendo-me sentir incluída e integrada na ação do setor. A integração do meu estágio e sua atividade no planeamento da equipa, com o debate e contextualização nas reuniões semanais, permitiu-me melhorar a nível pessoal e profissional, estimulando a uma escuta ativa e participação crescente nas discussões e nos temas debatidos.

A.2. Metodologia Kaizen e Reuniões Semanais

A aplicação da metodologia *Kaizen*, com o termo “*Kai*” que significa mudar e “*Zen*” que significa para melhor, procura desenvolver um método de melhoria contínua³. Integrado nesta metodologia, os diversos departamentos da BLPH são desafiados a realizar reuniões diárias, curtas, de cerca de 15 minutos, e previamente marcadas, nas quais, segundo um planeamento prévio, são abordados os temas inerentes ao departamento em dias específicos. A metodologia *Kaizen* integra, também, a presença de um quadro na sala do setor, onde estão presentes, por exemplo, os indicadores, a assiduidade, informações relevantes à equipa e os desafios, permitindo e fomentando a uma visualização dos objetivos do setor e propiciando a uma melhoria contínua da equipa.

Além destas reuniões curtas diárias, a BLPH tem por prática a realização de reuniões de planeamento semanais, com uma duração de cerca de 2h, nas quais era feita uma visão geral do estado da arte das tarefas e desafios, sendo definidos os objetivos e o planeamento específico da semana seguinte. Além disso, tendo em conta a minha integração nos Assuntos Científicos, todas as semanas fui desafiada a transmitir um ponto de situação à restante equipa, contextualizando o trabalho desenvolvido na semana anterior. Estas reuniões permitiram-me, de forma singular, uma maior inclusão no trabalho desenvolvido pela equipa, assim como um maior conhecimento dos métodos de cada elemento do grupo, de cada unidade da I&I, assim como o ponto de situação das diversas tarefas e desafios da equipa, aumentando a minha confiança no debate destes assuntos, assim como um aprofundamento e maior conhecimento do trabalho desenvolvido em I&I. Além destas reuniões, semanalmente foi agendada pela minha orientadora uma reunião semanal de *feedback*. A grande vantagem desta reunião era a possibilidade de realizar uma contextualização do trabalho realizado a cada semana, assim

como, definir objetivos e retocar pontos no trabalho. Estas reuniões propiciaram, também, um espaço para esclarecimento de qualquer dúvida ou preocupação com o estágio.

A.3. Projeto Desenvolvido

No início do meu estágio na BLPH fui desafiado pela equipa a desenvolver um projeto integrado no foco de ação no setor de I&I e da BLPH. Este projeto, focado nos “*Unmet Medical Needs*”, especificamente na população geriátrica, foi composto por diversas vertentes, culminando numa apresentação final e na elaboração de um relatório passível de ser utilizado futuramente pela equipa. Considero que a realização deste desafio foi uma mais-valia no meu estágio. Desde o desenvolvimento de uma metodologia mais profícua na pesquisa científica em diversas plataformas, ao desenvolvimento da capacidade de síntese, à capacidade oratória em situações de apresentação, foram inúmeros os sub-desafios a que este projeto me conduziu, necessitando de um espírito crítico e um método de trabalho na resolução dos diversos obstáculos. Este projeto enriqueceu o meu estágio, permitindo-me crescer exponencialmente a nível pessoal e profissional e desenvolvendo capacidades únicas na realização de tarefas.

A.4. Ciência no contexto Empresarial

Associado à metodologia *Kaizen*, o setor de I&I fomentou a realização de reuniões científicas denominadas de “*Journal Club*”, iniciativa que desafia colaboradores dos departamentos da BLPH a expor artigos de relevância aos colegas, contextualizando e apresentando literatura científica atual. Durante o período de estágio tive oportunidade de realizar uma apresentação no “*Journal Club*”. Pelo desafio de preparar uma apresentação para diversos colaboradores dos departamentos da BLPH, com uma contextualização do tema a abordar, assim como, a dinâmica de apresentar fora de um contexto puramente académico, fomentou no meu estágio um desafio único a nível pessoal e profissional, retirando-me da minha zona de conforto e propiciando um crescimento singular na minha cultura científica.

A.5. Proximidade com a Orientadora

Ao iniciar o estágio na BLPH, aos novos estagiários são atribuídos um tutor e um orientador. De forma a propiciar uma melhor integração inicial, assim como uma receção, o tutor acompanha o estagiário na primeira semana de estágio, tendo formação para esse efeito. O orientador é responsável por um acompanhamento mais próximo no decorrer do trabalho do estagiário sendo, frequentemente, o primeiro contacto em caso de questões relativas ao estágio. A Doutora Ana Catarina Pinto foi a orientadora e tutora do meu estágio, sendo um elemento da equipa com uma profunda experiência na área de I&I, integrando atualmente a

unidade dos Assuntos Científicos. Em diversos momentos, recorri à ajuda da minha orientadora, contactando-a diretamente para o esclarecimento de dúvidas, auxiliando-me em todas as questões e dificuldades ao longo do estágio. Além de me transmitir informações essenciais e a missão e valores da BLPH, a presença da orientadora foi fundamental na minha integração na equipa, assim como, na resolução de todas as minhas preocupações. Apesar de estar em regime de teletrabalho e da elevada carga de trabalho, a Doutora Ana Catarina Pinto foi um apoio e uma ajuda constante ao longo do estágio, tendo melhorado exponencialmente a minha experiência de estágio.

É de destacar, também, o acompanhamento do Doutor António Nunes Lucas, Responsável pelo Setor de I&I, tendo feito o acompanhamento nas reuniões semanais, e tendo estado sempre disponível para resolver qualquer questão que surgisse ao longo do estágio.

B. Fraquezas (*Weaknesses*)

B.1. Duração do Estágio

Com a duração prevista de 3 meses, o período de estágio em Indústria Farmacêutica, concilia-se com o estágio em Farmácia Comunitária, não permitindo, no entanto, um aprofundamento dos trabalhos realizados em I&I. Este tempo demonstrou-se notoriamente insuficiente, tendo em conta toda a contextualização e o trabalho desenvolvido na I&I, principalmente na vertente laboratorial. O período inicial do estágio permitiu uma abordagem inicial à metodologia de trabalho em indústria farmacêutica, assim como, a realização de um projeto baseado na pesquisa, limitando o aprofundamento e a cimentação dos conhecimentos adquiridos.

C. Oportunidades (*Opportunities*)

C.1. Formação de Integração Geral e Formação Específica

Sendo a política da BLPH baseada na melhoria contínua e na renovação constante do conhecimento, todos os colaboradores da BLPH realizam constantemente uma série de formações, quer no local, quer remotamente. Este tipo de formação, dinamizado pelo Departamento de Formação, integra o plano do estagiário, sendo a primeira semana de estágio fundamental na realização das formações de integração que permitem uma introdução e contextualização em diversos temas da empresa. Além das formações dinamizadas por oradores, a formação baseada na leitura de normas e procedimentos fomenta o contacto do colaborador com os documentos da BLPH.

Ao longo do meu estágio realizei diversas formações tendo inicialmente realizado a formação inicial e contextualização da empresa. Progressivamente as formações foram aprofundadas tendo em conta o departamento em que estava inserida. Considero que estas formações são essenciais na integração e no desenvolvimento do colaborador, propiciando um maior contexto na empresa e no departamento, assim como, uma melhoria contínua do conhecimento.

C.2. Regime de Estágio Misto

O estágio na BLPH realizou-se num regime misto. Este regime permitiu a minha integração em um dos turnos do setor de I&I. Desta forma realizei uma parte do meu estágio presencialmente na BLPH, realizando o horário de turno das 8h30 às 15h30, com 1h30 de teletrabalho em casa, associado a semanas em regime de teletrabalho com o horário das 8h30 às 17h30. Este regime, assim como a minha presença na BLPH com as duas unidades que integram o I&I, permitiu uma proximidade também à Unidade de Inovação Tecnológica, permitindo-me compreender e experienciar de perto o trabalho desenvolvido pelos diversos elementos integrantes das equipas das unidades da I&I e das suas funções inerentes.

Apesar de estar integrada nos Assuntos Científicos, tive a oportunidade de contactar presencialmente com as equipas laboratoriais, compreendendo melhor o trabalho desenvolvido por estas, assim como, visualizar a aplicabilidade prática dos conceitos abordados ao longo das diversas reuniões. Este regime foi fundamental para o meu estágio, permitindo-me uma presença na BLPH e uma proximidade da equipa, com um maior contexto no trabalho desenvolvido pela empresa.

D. Ameaças (*Threats*)

D.1. Pandemia COVID-19

Num ano profundamente marcado pela Pandemia de COVID-19, o meu estágio em Indústria Farmacêutica foi afetado pela situação vivida a nível mundial. A realização de reuniões de equipa e formações num formato totalmente *online*, reduziu parcialmente a interação e o contacto inerente a este tipo de iniciativas. No entanto, o esforço por parte da equipa e pelos dinamizadores das formações foi notável, propiciando o regime de maior proximidade possível, tendo em conta todas as limitações enfrentadas. No período final do estágio houve a necessidade de implementar um regime de puro teletrabalho, tendo em conta a situação vivida no concelho de Coimbra. Ainda que o regime misto seja o de maior preferência e o que mais prevaleceu ao longo do estágio, o regime de teletrabalho, tendo em conta a realização o

relatório final e da apresentação final, teve um impacto menos negativo do que o esperado inicialmente. Realçar, no entanto, o papel fundamental que toda a equipa de I&I teve na minha integração ao longo do estágio, apesar das limitações devido à situação pandémica vivida.

Considerações Finais

O farmacêutico, enquanto profissional multidisciplinar, dispõe de inúmeras ferramentas e oportunidades aquando da entrada no mercado de trabalho. Apesar de abrangente, o Plano Curricular do MICF explana, apenas, uma pequena parte das diversas saídas profissionais existentes. A realização de Estágios Curriculares em diversas áreas, associado sempre ao estágio em Farmácia Comunitária, proporciona um aprofundamento dos conceitos e o desenvolvimento de ferramentas únicas para o futuro profissional de saúde.

Considero que o estágio na BLPH em I&I fomentou em mim um exponencial crescimento a nível pessoal, mas, acima de tudo, um crescimento profissional. Apesar de abrangente, a breve experiência no ramo da Indústria Farmacêutica, permitiu-me o contacto com as diversas áreas e departamentos. Além disso, o desenvolvimento de um método de trabalho, um aprofundamento nos conceitos de pesquisa científica, o enriquecimento em cultura científica, os desafios e os diversos projetos associados ao estágio, fomentaram um espírito crítico e de decisão, retirando-me da zona de conforto e propiciando a um pensamento “fora da caixa”. A experiência de estagiar num setor como a I&I, de compreender todo o processo a montante do desenvolvimento de formulações foram mais-valias que retenho deste estágio.

Apesar da pandemia de COVID-19 ter tido efeitos no estágio curricular, foi notório e de destaque o trabalho de toda a equipa na minha integração, propiciando uma proximidade aos projetos desenvolvidos pela BLPH, assim como, um acompanhamento constante em todas as minhas tarefas.

A experiência profissional de Indústria Farmacêutica, o espírito de equipa e a metodologia de trabalho que aprendi ao longo dos 3 meses em que integrei o Setor de Investigação e Inovação da BLPH são mais-valias para o meu futuro profissional, capacitando-me para a resolução de desafios e estimulando a uma maior adaptabilidade a qualquer adversidade. A capacidade de trabalho, a entreatajuda, o empenho, a qualidade e rigor são algumas das características que regem a atividade do Setor de I&I, sendo ensinamentos que me fizeram evoluir a nível profissional e a nível pessoal, influenciando-me enquanto futura profissional de saúde.

Referências

1. Investigação & Desenvolvimento | Bluepharma - [Consult. 21 ago. 2021]. Disponível em: <https://www.bluepharma.pt/innovation/>
2. Bluepharma - [Consult. 22 ago. 2021]. Disponível em: <https://www.bluepharma.pt/>
3. What is KAIZEN™ - [Consult. 22 ago. 2021]. Disponível em: <https://pt.kaizen.com/o-que-e-kaizen.html>

Parte III

Monografia

“ROR and the Circadian Rhythm”

Sob a Orientação da Professora Doutora Maria Manuel Cruz Silva

List of Figures

| | |
|---|----|
| Figure 1 - Structure of DIV880..... | 48 |
| Figure 2 - Structure of NR and RORs | 50 |

List of Tables

| | |
|---|----|
| Table 1 - Natural and synthetic ligands for melatonin receptors | 47 |
| Table 2 - ROR synthetic ligands | 58 |
| Table 3 - Natural ligands directly affecting RORs | 62 |

List of Abbreviations

24S-OHC – 24S-Hydroxycholesterol

2-PMT – 2-Phenylmelatonin

7 α -OHC – 7 α -Hydroxycholesterol

AF-2 – Ligand-dependent activation domain 2

ASD – Autism Spectrum Disorder

BHLH – Basic Three Helix-Loop-Helix

BMALI – Brain and Muscle ARNT-like protein – I

CI/R – Cerebral Ischemia/Reperfusion

CLOCK – Circadian Locomotor Output Cycles Kaput

CRY – *Cryptochrome*

DBD – DNA-binding domain

DIO – Diet-induced obesity

EAE – Experimental Autoimmune Encephalomyelitis

EMA – European Medicines Agency

FDA – U.S. Food and Drug Administration

FGF21 – Fibroblast Growth Factor-21

FXR – Farnesoid X Receptor

GPCRs – G Protein-Coupled Receptors

IL-17 – Interleukin 17

LBD – Ligand-binding domain

LXR – Nuclear Receptor Oxysterols

MS – Multiple Sclerosis

NOB – Nobiletin

NORI – Nuclear Receptor Co-Repressor 1

Npas2 – Neuronal PAS Domain Protein 2

NR – Nuclear Receptors

NR1F1 – Nuclear receptor subfamily 1, group F, member 1

PAS – PER-ARNT-SIM

PDK2 – Pyruvate Dehydrogenase Kinase 2

PER – *Period*

RA – Rheumatoid Arthritis

ROR – Retinoic-Related Orphan Nuclear Hormone Receptor

RORE – Receptor-Related Orphan Receptor Binding Elements

SCN – Suprachiasmatic Nucleus

TAC – Transverse Aortic Constriction

T_H – T helpers

T_H17 cells – T helper 17 cell

TTFLs – Transcriptional-translational feedback loops

Resumo

O Ritmo Circadiano desempenha um papel preponderante no controlo da atividade comportamental, mental e fisiológica nas 24 horas do ciclo dia-noite. Através da regulação por um relógio endógeno, é possível antecipar as alterações no meio envolvente e coordenar os processos biológicos. BMALI e CLOCK, enquanto fatores de transcrição, regulam a expressão dos genes CRY e PER através de vários padrões de expressão. Os ROR e os REV-ERB, através da ligação competitiva ao RORE na região do promotor do BMALI, têm a capacidade de ativar ou reprimir, respetivamente, a atividade do fator de transcrição BMALI e a expressão das proteínas. Sendo o ROR associado ao ritmo circadiano, é fulcral compreender o papel que os ligandos do ROR, sintéticos e naturais, podem exercer quer na regulação do relógio endógeno, quer nas patologias subjacentes. Sendo a melatonina uma neuro-hormona reconhecida pela sua intervenção no Ritmo Circadiano, é essencial estabelecer a relação com o ROR e de que forma esta hormona tem capacidade de ligar e afetar a atividade do recetor. Pelo seu reconhecido valor na regulação do ritmo circadiano, esta revisão procura compreender os ligandos naturais e sintéticos associados ao ROR, assim como as perspetivas para o futuro.

Palavras-chave: Ritmo Circadiano; ROR; Melatonina; Genes Relógio; Ligandos.

Abstract

The Circadian Rhythm plays a major role in controlling behavioral, mental, and physiological activity in a 24-hour day-night cycle. Through the regulation of an endogenous clock, the body can anticipate changes in the environment, and coordinate the biological processes. BMAL1 and CLOCK, as transcriptional factors, regulate the expression of PER and CRY genes through different patterns of expression. ROR and REV-ERB, through competitive binding to RORE in the promoter region of BMAL1, can activate or repress, respectively, the transcriptional activity of BMAL1 and the proteins. Being ROR associated with Circadian Rhythm, it's essential to comprehend the role of ROR ligands, both synthetic and natural, in the regulation of the endogenous clock and related pathologies. Being Melatonin a neurohormone recognized for its role in the Circadian Rhythm, it's essential to establish a relationship between ROR and the capacity to bind and affect the receptor. Because of the recognized importance in the regulation of the Circadian Rhythm, in this review, we focus on the role of the ROR synthetic and natural ligands, with a perspective for the future.

Keywords: Circadian Rhythm; ROR; Melatonin; Clock Genes; Ligands.

Introduction

Circadian rhythm is essential in the sleep-wake cycle, and responsible for controlling behavior, mental and physiological activity in a 24-hour day-night cycle¹⁻⁴. This process is regulated by an endogenous clock, that allows the body to anticipate changes in the environment, adapting its response and coordinating the biological processes⁵. Organized hierarchically, the central pacemaker is composed of a wide range of nerve cells that control the daily rhythm, known as neurons, forming a structure known as the suprachiasmatic nucleus (SCN) on the brain's hypothalamus⁶. This structure is characterized by a pair of neuron aggregates that can incorporate light-based information, mainly from the direct input of the eyes, and respond to different photo signals. Through neuronal and hormonal signaling, the circadian regulation is maintained by autonomous transcriptional-translational feedback loops (TTFLs), controlling and affecting major organ systems and tissues in the human body, including the liver, lungs, and muscles that incorporate autonomous cells^{1;2}.

Sleep and wakefulness, temperature, feeding, neuroendocrine and autonomic effects are all controlled by the circadian physiological and behavioral rhythms, and the synchronization in the SCN. This control has a 24-hour periodicity and, by the main stimulus, light, the internal clock aligns with the external environment⁶.

External stimuli like food availability, ambient temperature, or even social interaction, can be integrated as signals, adapting the mammalian clock pattern of expression. The synthesis at night of melatonin, a hormone, is based on a neural output signal, generated in the SCN. However, the presence of light, during the daytime, inhibits the synthesis of melatonin, reducing melatonin effects and promoting an awake state^{2;6}.

The genes involved in Circadian Rhythm

In the human body, the elemental genes associated with this process are the *Period* (PER) and *Cryptochrome* (CRY). These two genes are involved in the codification of proteins that increase in the night period but decrease during daytime. However, the environmental alterations are the main signals, causing changes in the circadian rhythm pattern of expression and generating, for example, differential patterns of expression in PER and CRY genes, based on differential light exposures during different moments of the day⁷.

On a molecular level, the endogenous clock is generated by a complex network of feedback loops associated with the expression of patterns of genes that encode proteins that make up the molecular clock^{3;7}. These feedback loops interlink positive and negative

transcriptional and translational feedback, driving the periodic expression of target genes⁵. They include two transcriptional factors, Brain and Muscle ARNT-like protein-1 (BMAL1) and Circadian Locomotor Output Cycles Kaput (CLOCK), that belong to the basic three helix-loop-helix (bHLH) PER-ARNT-SIM (PAS) transcription factor family^{1;5;8}. These transcriptional factors form a heterodimer that binds to E-box enhancers, activating *Cryptochrome* genes (CRY1 and CRY2) and the and *Period* circadian clock genes (PER1, PER2, PER3)^{1;3;8;9}. Reaching critical levels, CRY and PER proteins provide negative feedback directly to the CLOCK/BMAL1 dimer, inhibiting the transcriptional activity and, consequently, the expression of the genes^{3; 8; 9}. The core loop also includes neuronal PAS domain protein 2 (Npas2), enzymes that control the degradation and stability of the clock core proteins and phosphatases^{1;5}. The additional stabilization loop adjusts the quantity of bHLH-PAS. This includes diverse circadian nuclear receptors, namely the genes that encode REV-ERB α , the negative regulator, and the retinoic-related orphan nuclear hormone receptor α (ROR α), the positive regulator, as well as the respective isoforms that integrate the transcription of CLOCK/BMAL1 heterodimers^{1;5}. REV-ERB and ROR competitively bind to receptor-related orphan receptor binding elements (RORE) in the BMAL1 promoter region^{1;5;9}.

A solid link between the metabolic pathways and the circadian clock machinery can, in case of clockwork dysfunction, correlate with several pathologies. On glucose homeostasis, a direct interaction of the glucocorticoid receptor with CRY1 and CRY2 mediates the glucocorticoid receptor's transcriptional activity, playing a significant role in normal signaling. A circadian oscillation on CRY1 can therefore have a rebound in the immune response⁷.

Related Pathological Processes

The circadian rhythm can influence hormonal release, eating habits, digestion, and body temperature². The mammalian clock possibly impacts physiological functions and behavior, as well as sleep and mood disorders, diabetes, obesity, and cancer⁴. In this context, the modulation of the circadian rhythm may play a fundamental part in providing positive effects in circadian rhythm-related diseases⁵.

However, the most prominent process is associated with the sleep pattern². The circadian rhythm directly correlates with the sleep-wake cycle. Sleep, a neurochemical process, has a major role in restoring the brain energy, but also in the switching off of external inputs⁶. Melatonin is a hormone with a major role in sleep regulation in diurnal animals, with the unique capacity of making the organism feel sleepy. It has a particular association with the light captured by the optic nerves, thus a reduction of the light, during the night period for

example, can be interpreted as a trigger to the production of melatonin. Humans will feel tired at night, usually two hours after the release of endogenous melatonin and reaching the peak approximately 5 hours later ^{2; 6; 10}.

The molecular clocks have been correlated with neurodegenerative and neuropsychiatric diseases, as they contribute to their progression. The circadian rhythm has a very strong relation with the metabolic system, regulating and receiving feedback from the metabolic pathways ⁸. One example is the induction of the ROR α transcription factor function, which enhances the BMAL1, having an effect in mice fed with high-fat diets, and preventing weight gain, because of the increased amplitude of clock rhythms ^{8; 11}.

Every single person has a unique sleep-wake cycle based on their genetics. Chronotype reflects the interindividual difference between daily activities and patterns of sleep and work. Chronotherapy plays a major role in the human body. This is proved in cases of total derangement with light, the main external signal, eventually leading to fatigue, exhaustion, and an incorrect sleep-wake cycle, possibly caused by a misaligned clock rhythm ⁸.

The circadian melatonin rhythm is affected by aging. Aging and certain diseases (primary degeneration of autonomic nervous system, diabetic neuropathy, or some types of neoplasms and Alzheimer's disease) are intrinsically related to the reduction of nocturnal production of melatonin and impaired sleep ⁶. Older adults are, therefore, more susceptible to suffer from inadequate melatonin levels ¹⁰. In this context, the administration of exogenous melatonin can mitigate the loss of endogenous melatonin. Mimicking the hormone and binding to the same receptors, exogenous melatonin activates the same downstream pathways, promoting a healthy physical and mental aging ^{6; 10}. In Europe, Circadian[®], a medicine that contains melatonin as an active substance, was approved for the management of insomnia in adults over the age of 55 ^{10; 12}. It's also worth mentioning the approval of three melatonin receptors agonists molecules, already in the market: Valdoxan[®] and Thymanax[®] (approved for depression by the European Medicines Agency (EMA) with agomelatine as the active substance); Rozerem[®] (approved for delayed sleep onset by the U.S. Food and Drug Administration (FDA) with ramelteon as the active substance), and Hetlioz[®] (approved Orphan Therapy for non-24 hour sleep-wake disorder by FDA and EMA with tasimelteon as the active substance) ¹³⁻¹⁸.

In addition, a reduction of circulating levels of melatonin can be associated with a disruption of the circadian rhythm, which predisposes to ischemic stroke ¹⁹.

Melatonin

Melatonin, a neurohormone produced in the pineal gland and released exclusively at the night into the bloodstream, serves as a cue for the circadian rhythm, promoting sleep anticipation^{6; 7; 10}. Secreted during nighttime, the amino acid hormone melatonin (N-acetyl-5-methoxytryptamine) is characterized by being a hormone with peak levels in the dark, mainly regulated by the light detected by the retinal ganglion cells and melanopsin, signaling and allowing the night and day succession on peripheral organs^{7; 13; 19; 20}. The main role is regulating the sleep-wake cycle, being also fundamental in the metabolism and as a mammalian clock regulator^{7; 19; 20}. It is related to memory formation, as it directly affects the hippocampal neuron. However, melatonin also regulates reproduction, bone metabolism, and the immune, neurological, cardiovascular, digestive, urinary, and endocrine systems. The molecule presents anti-inflammatory, antioxidant, anti-infective, and anti-tumoral properties. On the therapeutic side, melatonin is a potential agent for obesity, cardiovascular diseases, and neurodegenerative disorders^{7; 21}. Via receptor-dependent or receptor-independent signaling pathways, it can be highlighted as antioxidant, antiaging, or carcinostatic²².

The role of melatonin in the regulation of addictive behavior is correlated with the inhibition of dopamine release, which has been shown by the increase of melatonin receptor-related cAMP in the mesolimbic dopaminergic system. Melatonin also regulates the secretion of gonadotrophin-releasing hormone in the hypothalamic neurons, fundamental in controlling both luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone. In the granulosa cells, the hormone stimulates the secretion of progesterone and suppresses the expression of estrogen receptors and estrogen activation²³.

Melatonin is thus a very versatile molecule with a wide range of roles, especially in the cardiovascular system, as it plays a role as a cardioprotector against ischemic heart injury and diabetic cardiomyopathy²².

Main Receptors of Melatonin

Melatonin effects can be triggered by different receptors, having three different membrane receptors and, possibly, an indirect nuclear receptor²³. This neurohormone acts through a wide range of targets, including two G protein-coupled receptors (GPCRs) in the plasma membrane, MT1, and MT2, the two most well-characterized receptors¹³.

Melatonin membrane-bound receptor type 1a (Mel 1a, MLIa, MLI, MT1, MTNR1A) can be commonly found in the human skin. This receptor is present in the human chromosome

#4 and the MT1 receptor is a part of adenylate cyclase inhibition, binding to a wide range of G-proteins²³. Melatonin membrane-bound receptor type 1b (Mel 1b, ML1b, MT2, MTNR1B) is present in normal and malignant melanocytes and eccrine sweat glands in the skin. These receptors are present in the human chromosome #11²³. MT2 receptor is responsible for the process of adenylate cyclase inhibition binding to various G-proteins, like MT1. Another process correlates with the soluble guanylyl cyclase pathway²³. MT3 (ML2=NQO2=Quinone reductase 2 enzyme=QR2) is a detoxification cytosolic enzyme that belongs to the reductase group, preventing oxidative stress. This enzyme can inhibit electron transfer reactions of quinones, being found in the liver, kidney, heart, lungs, intestine, muscle, and brown fat tissue²³.

It's speculated that melatonin has nuclear binding sites²¹. Recent studies proved that the molecule indirectly regulates the transcriptional activity of nuclear receptor ROR α /ROR β . This receptor allows melatonin to indirectly regulate transcriptional activity through intermediate steps²¹. These receptors are in the periphery and brain, and correlate with immunomodulation, cellular growth, and differentiation of the bone. In addition, the melatonin effect is directly influenced by the activation of Protein Kinase C²³.

GPR50 (H9, MLIX) is a melatonin-related orphan receptor. This X-linked inherited receptor binds to G-proteins and is an orthologue of MEL1c. GPR50 is present in all mammals, including humans, not having the characteristics of binding melatonin. However, it inhibits melatonin signals when it dimerizes with MT1²³.

Melatonin action is mainly mediated by the binding to MT1 or MT2. However, the activation of these membrane receptors can lead to opposite outcomes²¹. The molecular mechanisms associated with the pathophysiological processes where melatonin is involved, often involve MT1/MT2 membrane receptors, the MT3, calmodulin cytosolic binding sites, and the nuclear receptor ROR superfamily¹⁹. The molecule can also interact through non-receptor-mediated mechanisms, such as free radical scavenging²¹.

In sleep, the effect is considered to be a consequence of mechanisms that enhance the amplitude of the circadian rhythm oscillations via MT1 receptors, synchronizing with the circadian clock via MT2 receptors, increasing the sleep propensity¹⁰.

Main Receptor Ligands of Melatonin

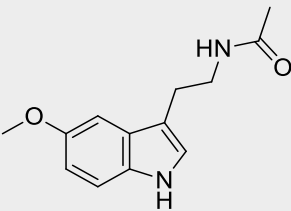
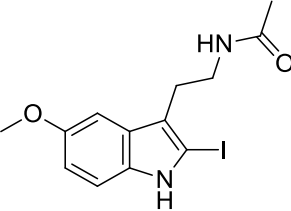
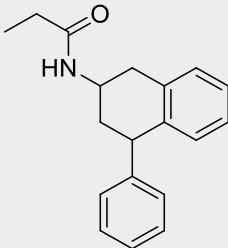
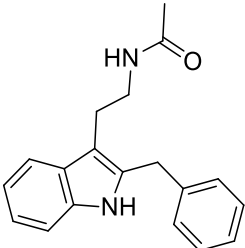
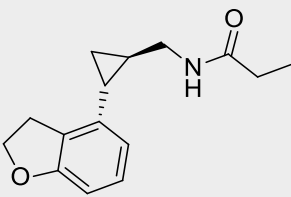
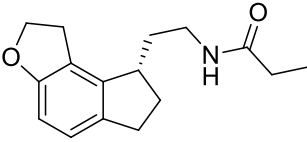
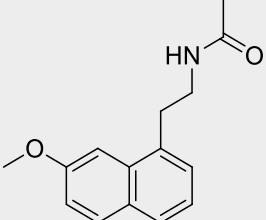
Melatonin, as a neurohormone, has led to the design of alternative ligands for MT1 and MT2 receptors with a major interest in agonists and antagonists (non-selective and subtype-selective) to determine receptor-dependent or -independent actions. However, if the search

for agonists has revealed some molecules of interest, the search for antagonists remains a major challenge, with, according to Boutin *et al.*¹³, only two, non-selective, antagonists tested *in vivo*, luzindole and the MT₂-selective, 4P-PDOT, and with no information on stability and metabolic stability¹³.

The concept of agonist is based on a drug, substance, or molecule that can bind to a receptor inside of a cell or on its surface, causing an action like the one caused by the substance that usually binds to the receptor. On the other hand, antagonists block agonist-mediated activation, blocking the action and the effect^{24;25}. The discovery of ligands was based on these two concepts, but also on the possible biased agonists and antagonists, proving that the same molecule can antagonize one intracellular signaling pathway while presenting an agonist effect in another mechanism¹³.

In a review from Boutin *et al.*¹³, and based in the IUPHAR data base²⁶, seven main structures are listed as natural agonists for MT₁ and MT₂ receptors (**Table I**): melatonin; the radiotracer (a super-agonist (2-iodomelatonin); two antagonists or partial agonists (4P-PDOT & luzindole); Agomelatine (Valdoxan[®] and Thymanax[®], approved for depression); Ramelteon (Rozerem[®], approved for delayed sleep onset), and Tasimelteon (Hetlioz[®], approved Orphan Therapy for non-24 hour sleep-wake disorder). In terms of chemical diversity, the molecules do not present a wide range of diversity, featuring two fused aromatic cycles with alkoxy (mostly methoxy) and N-acylaminoalkyl (mostly acetamidoethyl) moieties, mostly inspired by the natural substituents of melatonin¹³⁻¹⁸.

Table I – Natural and synthetic ligands for melatonin receptors

| Compound | Chemical Structure | Target(s) |
|------------------------|---|---------------------------|
| Melatonin |  | MT1 & MT2 (Agonist) |
| 2-Iodomelatonin |  | MT1 & MT2 (Agonist) |
| 4P-PDOT |  | MT2 (Antagonist) |
| Luzindole |  | MT1 & MT2 (Antagonist) |
| Tasimelteon |  | MT1 & MT2 (Agonist) |
| Ramelteon |  | MT1 & MT2 (Agonist) |
| Agomelatine |  | MT1 & MT2 (Agonist) |

A lot of compounds (bicycles, tricycles, tetra-cycles) have been developed as ligands for melatonin receptors, mostly mimicking melatonin or the natural ligands and demonstrating at least one of these two features – methoxy moiety and the ethylamide side chain – and based on the crystal structure of MT1 and MT2 receptors. It's worth mentioning that based on the geometry of the orthosteric binding pockets in MT1 and MT2 crystal structures, MT2 presents a slightly larger binding site than MT1, allowing for better accommodation of substituents, specifically the ones of higher dimensions ¹³.

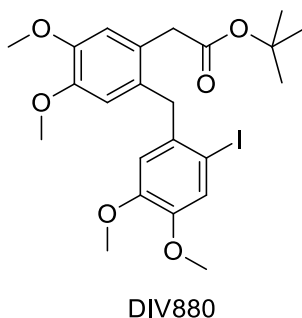


Figure 1 - Structure of DIV880

One molecule worth mentioning is DIV880 (**Figure 1**), an atypical ligand, discovered by a library screening by Researchers at Servier, and being one of the few high-affinity compounds without the guided structural similarities. It is, however, expected to bind to the MT2 receptor in the same binding site as the other classical agonists of this receptor ¹³. According to Boutin *et al.*¹³, it's possible to understand the binding mode of DIV880 with the formation of a complex with a non-selective agonist 2-phenylmelatonin (2-PMT) (PDB 6ME6). Based on this review ¹³, DIV880 presents an extensive overlap with 2-PMT, extending with its t-butyl-ester side chain into a hydrophobic sub-pocket formed by the residues Val124, Ile125, Phe209, Phe260, and Phe264, with the ester moiety presenting the ability to interact with Asn268. The dimethoxy-phenyl ring points “up” to Phe192 and Gln194, positioned in the same plane as the amide of 2-PMT. Otherwise, the iodo-substituted phenyl ring is oriented in the plane adopted by the indole of 2-PMT. The methoxy group is in para position of the iodine and overlaps in a very good manner with 2-PMT methoxy groups, interacting with the Asn175 side chain. By this context, DIV880 presents a good and relevant steric fit on an unstrained conformation, aligned with high affinity, making this compound a relevant agonist ¹³.

Nuclear Receptors

The nuclear receptors (NR) can be classified as ligand-regulated transcriptional factors since many of them can be receptors for physiological ligands, like steroid hormones, lipids, or even fatty acids. With these characteristics, and in the specific case of diseases, this superfamily is often a primary class of therapeutic drug targets. For example, some drugs targeting nuclear receptors are anti-inflammatory glucocorticoids, steroidal contraceptives, or even hormone replacement therapies. Moreover, this family, composed of 48 members in humans, shares a high sequence identity and conserved domains ²⁷.

The nuclear receptors have a typical domain structure composed of four major functional regions. This structure contains four functional domains, an amino-terminal domain (A/B region), a highly conserved DNA-binding domain (DBD) (C region), consisting of two zinc finger motifs to bind distinct DNA response elements involved in receptor dimerization, flexible and short hinge domain that spaces DBD and LBD (region D), and, at the carboxy-terminal, a ligand-binding domain (LBD) with the ligand-dependent activation domain 2 (AF-2) (region E, AF-2, and F) (**Figure 2**) ^{7; 20; 27; 28}. Vulgarly referred to as helix 12, the AF2 domain presents a structural surface that allows for the interaction with co-activators and co-repressor proteins ²⁰. The most divergent regions are AF-1 and the hinge ²⁷. This family has two conserved sequences through the superfamily, DBD, and LBD. The binding of ligands in the LBD causes a conformational change in this region, altering the surface to facilitate the recruitment of cofactor proteins, which transcriptionally regulate the induction or repression of target genes, with the stabilization or destabilization of the helix 12 region, resulting in a cascade of downstream events ^{3; 20; 27}.

REV-ERBs and ROR relation

ROR and REV-ERB are both ligand-dependent transcription factors ²¹. In terms of DNA response, there is considerable overlap between REV-ERBs and RORs. Both receptors are frequently co-expressed in the same tissues and are involved in similar physiological processes. Both receptors recognize RORE and bind competitively in the regulatory region, causing a mutually antagonistic relationship ^{3; 21; 29}. In addition, RORs constitutively activate transcription by recruiting co-activators, in contrast to REV-ERBs that inhibit gene transcription by recruiting co-repressors, together providing a balanced, dynamic regulation of genes containing DNA response elements, as well as responsiveness to both classes of receptors ^{3;}

²⁹.

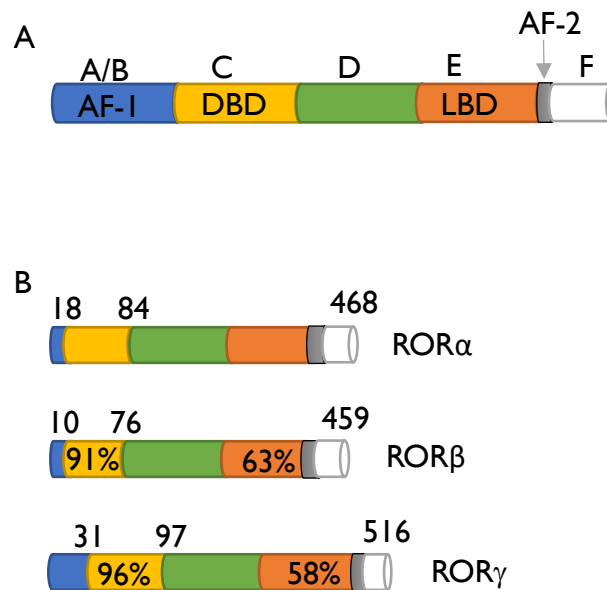


Figure 2 - Structure of NR and RORs

- A. The general organizational structure of members of the Nuclear Receptor Superfamily.
- B. Structure of RORs. Numbers above the receptor indicate the amino acid position. Percentage discriminates the identity of a particular domain relative to the other receptors. A/B, C, D, E, and F refer to the classically defined regions in the nuclear receptors' domain structure. DBD (DNA-binding domain). LBD (ligand-binding domain)^{3; 27}.

On the circadian rhythm, BMAL1 has a major role in the regulation. RORs and REV-ERBs play a significant role in the positive and negative regulation of the feedback loops since both receptors regulate the BMAL1 expression, having opposite transcriptional activities³.

ROR α , the activator, and REV-ERB α , the repressor, perform a cycle of 12 hours out of phase, leading to contrast events, with alternate activation and repression of BMAL1 expression, by competitively binding to the RORE of BMAL1 promoter. Since ligands regulate REV-ERBs and RORs, the utilization of synthetic or natural ligands in these receptors could potentially treat diseases and control the circadian rhythm^{3; 21}.

REV-ERB

REV-ERBs owe their designation to the unique genomic organization of *NR1D1*, encoding two unique orphan members of the NR superfamily, REV-ERB α , and REV-ERB β . The opposite DNA strand of the EDRA oncogene codes the thyroid hormone receptor α , the REV-ERB α , thus the receptor's name is derived from the reverse strand of *EDRA*. Some years after the discovery of REV-ERB α , it was discovered that REV-ERB β is coded by *NR1D2*^{3; 28}.

These receptors have an atypical LBD, lacking the carboxy-terminal activation function 2 (AF2 region), responsible for the recognition of co-activators, hence vital to the transcriptional activation. This characteristic makes these REV-ERBs constitutive repressors of transcription, binding constantly to co-repressors like nuclear receptor co-repressor 1 (NOR1)^{3; 28}.

BMAL1 transcription is repressed by REV-ERB α , based on the action on the BMAL1 promoter, by two DNA response elements of the circadian feedback loops. However, REV-ERB α expression is regulated by the heterodimer BMAL1/CLOCK in the *NR1D1* promoter via E-box DNA response elements. These relationships, similar to the circadian expression of CRY and PER genes, suggest that the genes that encode REV-ERB should be considered core clock genes³.

Widely expressed throughout the body, REV-ERB α and REV-ERB β have prominent roles in the circadian regulation of transcription, having a circadian pattern of expression³.

Retinoic-related Orphan Nuclear Hormone Receptor (ROR)

With the characteristics of the nuclear receptors, RORs presents the domain structure of a typical NR. The three members of the ROR subfamily of nuclear receptors - RORs alpha, beta, and gamma (ROR α , ROR β , and ROR γ) - have sequence similarities to the retinoic acid receptor, being encoded by RORA-C (or NR1F1-3)^{3; 20}. Each receptor constitutively activates transcription based on the ligand-independent recruitment of transcriptional co-activators, translating the endocrine and dietary signals and modulating different gene expression patterns by binding to RORE (**Figure 2**)^{3; 20; 21}.

With different stimulations by promoters and/or alternative splicing, the ROR genes can produce different isoforms. These isoforms differentiate from one another by the N-terminal region, exhibiting specific patterns and regulating distinct processes. ROR, as a transcriptional factor, modulates the target gene transcription by binding to RORE. RORE is identified by DBD, being composed by an AGGTCA core motif and subsequent A/T – rich sequence^{7; 20; 21}. RORE and ROR interaction play a significant role, accomplishing interaction with the identification of the core motif in the main groove of the p-box, described as the ring between the last two cysteines in the first zinc finger²¹. Involved in the mediation of the processes of activation or repression of transcription by RORs, the C-terminus, downstream of the two zinc fingers, has the capacity of identifying the 5' – AT-rich RORE segment in the

small adjoining groove, enhancing the binding of ROR to RORE²¹. On the other hand, the LBD has a significant role in the recruitment of co-repressors, co-activators, and nuclear localization, regulating the ligand-binding^{7; 21}. When a ROR contacts with an agonist, that molecule can mediate the transcriptional response of ROR based on the induction of a conformational change in the LBD, enhancing or repressing the transcription with the recruitment of co-activators or co-repressors, respectively. The presence of a co-activator induces conformational change through histone acetylase, increasing gene expression. With co-repressors, chromatin compaction is induced, repressing the gene expression^{7; 21}. Based on these different mechanisms, it can be concluded that ROR may be a potential therapeutic target for a wide range of diseases⁷.

The role of RORs in the regulation

ROR is fundamental in a wide range of physiological processes, including cerebellar development, lymphoid tissue development, retinal development, bone formation, lipid metabolism, circadian rhythm, oxidative stress, and inflammatory suppression^{20; 21}.

ROR α , fundamental in the regulation of circadian rhythms, immune responses, and metabolism, is also known as NR1F1 (nuclear receptor subfamily I, group F, member 1)¹⁹. It can be expressed in different tissues, like cerebellar Purkinje cells, the liver, thymus, skeletal muscle, skin, lung, adipose tissue, and even the kidney^{3; 20; 21}. On the other hand, ROR β with a more restricted pattern of expression, appears in some areas of the CNS, mainly in the ones involved in the processing of information from the sensations and functions within the spinal cord^{3; 21}. ROR β is expressed in the brain, retina, bone, and pineal gland^{3; 20}.

The two isoforms of ROR γ (ROR γ or ROR γ 1 and ROR γ t or ROR γ 2) are encoded by RORC genes, using alternative promoters. Even though ROR γ 1 is expressed in different tissues like the muscle, prostate, pancreas, liver, heart, or testicles, ROR γ t, the thymic isoform, is exclusively expressed in lymphatic tissues^{20; 21}.

ROR α is also expressed in the heart tissue, modulating circadian rhythm, and it regulates the embryonic development and metabolism. In addition, it is associated with the alleviation of oxidative stress, inhibition of inflammatory response, and regulation of apoptosis, autophagy, and processes related to melatonin, suggesting a possible interconnection with the hormone²².

ROR α is associated with the physiological effects of melatonin, like transactivation of transcriptional factors, anti-inflammatory, and anti-oxidative functions. Zang *et al.*¹⁹ report

that ROR α is also a novel negative regulator of cerebral ischemia-reperfusion injury and mediates neuroprotective actions of melatonin ¹⁹.

ROR β is found mainly connected to the brain, central nervous system, and specific areas like the retina (sensory information) or the suprachiasmatic nucleus (circadian rhythm). ROR β , in the case of *Rorb*^{-/-} mice, is associated to retinal degeneration and blindness in adulthood (mainly due to the connection with retina) but also, abnormalities in circadian rhythm, or even in male sexual behavior ²⁰.

ROR γ in the lymphatic tissues has a key role in their development but also in the up-regulation of the anti-apoptotic gene Bcl-XL, reducing the apoptosis of CD4⁺ and CD8⁺ cells. In special, ROR γ t has a critical role in the regulation of T helper 17 cell (T_H17) differentiation, connecting this receptor to the inflammatory process and autoimmune diseases such as multiple sclerosis, asthma, or rheumatoid arthritis (RA) ²⁰.

RORs are a promising therapeutic target in autoimmune diseases, tumors, obesity, diabetes, and other diseases. The identification of natural and synthetic ligands, considering the major role of RORs on the aforementioned diseases, poses an opportunity for the development of targeted therapies ^{20; 21}.

The circadian rhythm and ROR

RORs play a significant role in the modulation of the circadian clock. As previously mentioned, the clockwork is regulated by a wide range of molecules. BMAL1, Npas2, E4bp4, and CRY1 transcription is directly regulated by ROR γ in peripheral tissues via ROREs in regulatory regions. In this context, ROR γ I, whose gene is regulated by BMAL1/CLOCK heterodimers that ligate with two successive E-boxes in the ROR γ I promoter, is an isoform with an important role in the modulation of the circadian clock in the peripheral regions. This isoform influences tissues like the kidney, the liver, or the fatty tissue, having a robust oscillatory pattern, unlike ROR α . In addition, the clock proteins and RORs have the unique capacity of regulating several metabolic genes within a circadian pattern of expression, with ROR γ being controlled by the clock machinery ⁷.

In disparity to the REV-ERBs, RORs stimulate the expression of BMAL1. Alterations in the circadian oscillator are notorious in mice with loss function of ROR α , presenting the essential role of these receptors in the normal circadian process ³.

ROR α is fundamental in the regulation and modulation of circadian rhythms, immune responses, and metabolism. being expressed in heart tissue. As mentioned before, ROR α

alleviates oxidative stress, inhibits inflammatory response, and regulates apoptosis and autophagy, being present in a wide range of processes that include melatonin, a major molecule for the mammalian clock²². In the case of melatonin, the receptor relates to the transactivation of transcriptional factors, however there is still a “grey area” without consensus on the role of melatonin as a direct or indirect regulator of this receptor^{19;21}. Although ROR γ has a role in the circadian rhythm, a more robust regulation of the mammalian clock by ROR α is fundamental, especially when linked with the role of this isoform in cerebral development³.

RORs may function as downstream mediators, being clock proteins that regulate the circadian expression of metabolic genes. RORs regulate the expression of genes involved in diverse mechanisms, linking, in some cases, the circadian clock with a characteristic pattern of expression⁷.

RORs and Metabolic Disorders

Metabolism regulation is intrinsically related to the circadian rhythm and its genetic perturbations. An alteration in the circadian rhythm in humans, caused by a change of professional work shift or other situations, may cause metabolic disturbances. RORs and REV-ERBs are well-characterized metabolic regulators. As mentioned above, these receptors are fundamental components of the mammalian clock, linking the core circadian oscillator to the clock-controlled genes, regulating metabolic pathways³.

In glucose and lipid metabolism, both ROR α and ROR γ play main roles. In phenotypes of mice with mutations in ROR α and ROR γ , the absence of a functional ROR α lowers total plasma cholesterol levels resulting in resistance to weight gain, and hepatic steatosis, when exposed to a high-fat diet. A deficiency in ROR α may also result in a reduction of hepatic glucose output, providing a possible future therapeutic approach²⁷.

RORs demonstrate potential for the development of new therapies addressing the therapeutics needs in diseases related to the circadian rhythm and others, like cancer, neurodegenerative diseases or autoimmune diseases²⁷.

RORs and Autoimmune Diseases

ROR α and ROR γ (especially the ROR γ t) present a major role in the development of T_H17 cells. These cells are often associated with autoimmune disorders, such as multiple sclerosis, rheumatoid arthritis, inflammatory bowel disease or psoriasis^{3; 20; 27}.

Both ROR α and ROR γ are involved in the full differentiation of naïve CD4⁺ T cells involving interleukin 17 (IL-17). T_H17 cells can produce a wide range of cytokines and are often associated with inflammatory processes. Interacting with ROREs in the IL-17 promoter, RORs can regulate the pattern of expression of IL-17. Since IL-17 are cytokines produced by T_H17 cells, and these cells are often mediators of autoimmune disorders, further studies in these cells may provide novel therapies to address these diseases, based on the function of T_H17 cells^{3; 27}. Since ROR γ t is a critical regulator of T_H17 cells differentiation, needing however the ROR α intervention, targeting RORs represents a novel approach, different from the current therapies with immunosuppressants^{3; 20; 27}. The use of RORs presents a significant advantage, targeting specifically the T_H17 cells, and not the immune system as a whole²⁷.

ROR Ligands

The drug development programmes targeting ligand-regulated nuclear receptors led to the design of diverse therapeutic compounds, increasing the interest in natural or synthetic ligands, and the knowledge and value of these potential therapeutical receptors³. The NR superfamily, involved by its signaling in a wide range of diseases such as cancer, diabetes, obesity, or autoimmune diseases, were, in 2015 with agonists and antagonists of NR, approximately 13% of all FDA-approved drugs²⁷.

Based on the most appropriate profile, pharmacokinetics and pharmacodynamics were the main points in the development of synthetic ligands within a chemical biology strategy. Furthermore, the chemical biology strategy is fundamental to the development of ligands to some specific receptors like the REV-ERBs and the RORs, since these two classes share many of the same target genes, having a substantial overlap in functions, including the regulation of the circadian rhythm, metabolism and the immune system³. Some receptors, like ROR, receive the designation of orphan NRs because they don't have, at this point, well-characterized ligands. Diverse studies have been developed in this area, mainly associated with the presence of ROR in diverse pathologies and mechanisms (circadian rhythm, immunity, development,

oxidative stress, and cellular metabolism), making orphan NRs relevant in the search for ligands and future development of new therapies^{21; 27}.

For the transcriptional modulation, ligands bound to LBD have different impacts on the receptor's activity. ROR is dependent of agonists, antagonists, and inverse agonists to modulate its inner transcriptional activity binding to RORE motifs within the promoter region of BMAL1. The wide dispersion of ROR isoform through the tissues presents a major potential for the treatment of pathophysiological conditions, linking these receptors to autoimmune diseases and metabolic diseases. With further studies, it will be possible to identify more specific natural and synthetic ligands, capable of modulating the activity of the receptors^{1; 21; 27}.

An agonist of ROR has the ability to increase the co-activator recruitment, enhancing the transcription of the target genes. Otherwise, antagonists block the action and the effect of agonists having, however, no interaction with the transcriptional activity. The inverse agonist, with still an unclear mechanism, can recruit extra co-blockers preventing the co-activators from binding and downregulating the basal activity of the receptor^{21; 24; 25; 27}.

ROR Synthetic Ligands (Table 2)

I. T0901317

T0901317, nowadays designated as T1317, was the first validated synthetic ligand with the capacity to bind and regulate RORs functions. Initially, T1317 was designated as an agonist for nuclear receptor oxysterols (LXR), for farnesoid X receptor (FXR), a nuclear receptor for bile acids, and pregnane X receptor. Further studies determined a major role as an inverse agonist of ROR α and ROR γ . Suppressing ROR α and ROR γ , this receptor inhibits T_H17 cell proliferation, suppressing, consequently, IL-17 production and lowering the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). This ligand also plays a major role in the repression of *G6Pase* in HepG2. T1317 is also considered a nonspecific ligand for a wide range of nuclear receptors, being used as a model for further development of ROR-selective compounds^{1; 3; 30; 31}.

II. SR1078

Originating from the lead of the ROR inverse agonist compound, T1317, SR1078 is considered a direct agonist of ROR α and ROR γ , increasing, unlike its precursor, the expression of ROR target genes in *G6Pase* and fibroblast growth factor-21 (FGF21) in HepG2 cells. SR1078 can reduce the expression of pyruvate dehydrogenase kinase 2 (PDK2), and aerobic glycolysis in hepatoma cells. SR1078 is also used to characterize the FGF21 gene as a direct target gene

of ROR α . The use of SR1017 in the autistic mouse model shows an increase in brain genetic expression, often downregulated in Autism Spectrum Disorder (ASD), and a reduction in the repetitive behavior^{1; 3}. In this context Nobiletin (NOB) is worth mentioning, an agonist for ROR α and ROR γ that is similar to SR1078. Classified as a natural ligand, this compound will be further discussed in the polyketides section of Natural Ligands directly binding to RORs^{1; 3; 20; 32; 33}.

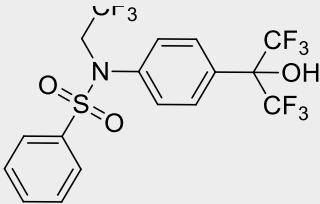
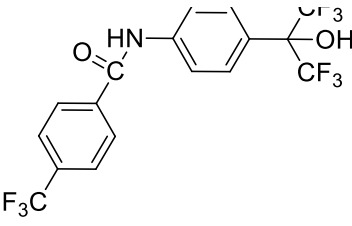
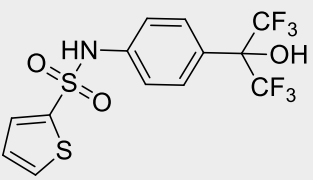
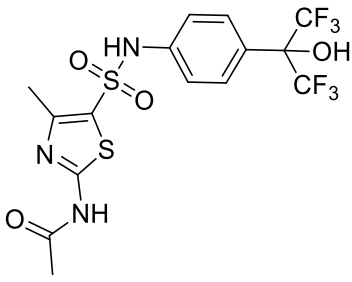
III. SR3335

Additional modifications applied to T1317 and SR1078 scaffolds culminated in the discovery of SR3335, also named ML-176. SR3335 is the first potent ROR α -specific inverse agonist, the first specific for only one isoform of target genes *G6Pase* and *PEPCK* in HepG2, relevant genes in gluconeogenesis. The molecule has been able to suppress the gluconeogenesis *in vivo* in diet-induced obesity (DIO) mouse models, reducing also the plasma levels of glucose, being thus an important discovery for future treatments of obesity^{1; 3; 34}.

IV. SR1001

The studies of synthetic ROR ligands were limited to a proof-of-concept *in vivo* study. However, the discovery and report of SR1001 proved the relevant role that ROR ligands can have in mouse models of disease. SR1001 is, therefore, considered as an inverse agonist, binding directly and suppressing ROR α and ROR γ reporter activity, decreasing the interaction between the receptor and co-activators. The main difference between SR1001 and T1317 is based on the capacity to suppress LXR activity, being SR1001 a derivate from the leader, T1317. Although T1317 has a high affinity to ROR α , theirs still activity in the LXR receptor. The main advantage of SR1001 is the ability to suppress ROR α and ROR γ activity, limiting also LXR affinity. SR1001 inhibits directly the T_H17 cell differentiation, having activity without interfering on other T helpers (T_H) cells. This brings a major advantage in the management of autoimmune diseases related to T_H17 cells, such as multiple sclerosis (MS). Further SR1001 scaffold optimization allowed the discovery of two ROR γ -specific ligands, SR2221 and SR1555, both ROR γ inverse agonists capable of inhibiting T_H17 cell differentiation^{1; 3; 35}.

Table 2 - ROR synthetic ligands

| Compound | Chemical Structure | Target(s) |
|-----------------------------|---|---|
| T0901317 (TI317) |  | ROR α and ROR γ inverse agonist |
| SR1078 |  | ROR α agonist |
| SR3335 |  | ROR α inverse agonist |
| SR1001 |  | ROR α and ROR γ inverse agonist |

ROR Natural Ligands

Natural Ligands directly affecting RORs (Table 3)

I. Steroids

I.1. Cholesterol and cholesterol sulfate

The discovery and elucidation of the crystal structure of ROR α LBD allowed further research on possible ligands for the ligand-binding pocket of this receptor. Through mass spectrometry, it was possible to determine that cholesterol and 7-dehydrocholesterol (provitamin D₃) were natural ligands for ROR. Alterations in the LBD caused impairment in cholesterol binding and inhibition of cholesterol synthesis, decreasing the transcriptional

activity of the receptor, a process that also occurs in cholesterol depleted cells. Cholesterol causes an active conformation in LBD, not interacting however with helix 12 in LBD thus indicating the presence of another interaction with the ability to stabilize the active conformation of LBD. When compared to other cholesterol metabolites, such as cholesterol sulfate, the affinity for ROR α LBD was lower^{20; 36-40}.

Cholesterol Sulfate presented the ability to replace cholesterol in the ligand-binding pocket of ROR α , binding to ROR α LBD with a higher affinity than cholesterol or other cholesterol derivatives. With a structural resemblance to cholesterol, cholesterol sulfate presented an agonistic conformation, leading to a higher transcriptional activity when compared to cholesterol. In a study by Hanyu *et al.*⁴¹, cholesterol sulfate significantly increased, in a ROR α -dependent manner, profilaggrin expression (an epidermal barrier precursor protein expressed in normal human epidermal keratinocytes). With expression in other tissues, ROR α and cholesterol sulfate may present a novel mechanism in the regulation of local expression of other genes, requiring, however, further studies to prove other actions for cholesterol sulfate^{20; 36; 37; 40; 41; 42}.

1.2. Oxysterols

RORs play a major role in bile acid metabolism as mentioned before. 7 α -hydroxycholesterol produced by CYP7A1, a key enzyme in bile acid synthesis, and other 7-oxysterols (7-OS, 7 β -hydroxycholesterol, and 7-ketcholesterol) have been investigated on ROR α /ROR γ activity, with 7-OS binding with high affinity to ROR α /ROR γ LBD. However, it's suggested that 7-oxygenated sterols act as an inverse agonist, decreasing the transcriptional activity of ROR α /ROR γ nuclear hormone receptors. In a study by Wang *et al.*⁴⁰, it was proved that 7 α -hydroxycholesterol (7 α -OHC) works as a key intermediate in bile acid metabolism, modulating the expression of ROR target genes, and predicting that 7 α -OHC binds to ROR α and induces a conformational change. With this binding it reduces the level of interaction between the receptor and the coactivator, repressing the transcriptional output of the receptors. This study also predicted that an increased hepatic level of 7 α -OHC could decrease hepatic glucose output, via inhibition of ROR α /ROR γ activity. 7-oxygenated sterols may also be implicated in atherosclerosis since they function as ROR α /ROR γ ligands and ROR α may play a role as an atheroprotective, with 7-oxygenated sterols exhibiting an atherogenic activity. Since CYP7A1 expression presents a circadian rhythm, it is suggested that 7 α -OHC may also present a circadian pattern of production, with serum levels of 7 α -OHC correlating with the level of bile acid synthesis and showing a possible role for ROR α ligand in the modulation of

the mammalian clock in many tissues. The study proposed a role of 7-oxysterols in the transcriptional output of the constitutively active RORs on hepatic glucose production, but also the circadian rhythms^{20; 40}.

Another relevant oxysterol is the 24S-hydroxycholesterol (24S-OHC), informally referred to as “cerebrosterol” as it is found mostly in the brain. Compared to 7-oxysterols, it shows similar effects on ROR α and ROR γ transcriptional activity, binding to LBD and working as an inverse agonist, also demonstrating reduced recruitment of the peptide and coactivator NCOA2 in ROR α . With the role of 24S-OHC in the brain and the high abundance of “cerebrosterol” in young children, it can be proposed a role in brain development^{20; 43}.

1.3. Secosteroids

RORE-driven activation of a reporter in human epidermal keratinocytes and melanoma cells and IL-17 production by immune cells are inhibited by the secosteroids 20(OH)D₃, 20,23(OH)₂D₃, and 1,25(OH)₂D₃. A study by Slominski *et al.*⁴⁴ documented that 20(OH)D₃ and 20,23(OH)₂D₃ can act as antagonists or inverse agonists for ROR α and ROR γ . 20(OH)D₂, in a functional assay, consistently inhibited ROR α - and ROR γ - mediated transactivation, predicting a role as an additional antagonist and suggesting that 1,25(OH)₂D₃ and vitamin D₂ and D₃ are good candidates for further testing as antagonists for ROR α and ROR γ ⁴⁴. The study predicts that these findings may also explain the inhibition of the T_H17 transcriptome, regulated by ROR γ t. The studies of these secosteroids and the explanation of their action as inverse antagonists for ROR α and ROR γ may explain the different functions and diverse effects elicited by vitamin D^{20; 44}.

1.4. Neoruscogenin

Identified as an agonist for ROR α , neoruscogenin is a natural steroidal sapogenin. In a method of purification of fractionated plant extracts, 25S-ruscogenin was identified as the most active hit compound. However, due to the better availability of neoruscogenin and its higher potency in terms of ROR α activity, this compound was further studied, proving its agonistic properties and the significant increase of gene expression of the nuclear hormone receptor, with selectivity to ROR α . Since ruscogenins were identified in plants with medicinal properties, and pure ruscogenin is often associated with anti-inflammatory, antithrombotic, and antiapoptotic activities *in vivo*, further studies are needed to understand if these properties rely on ROR α activation^{20; 45}.

2. Polyketides

2.1. Isoflavones

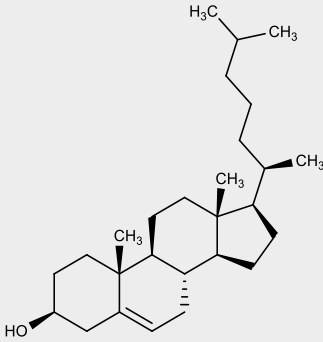
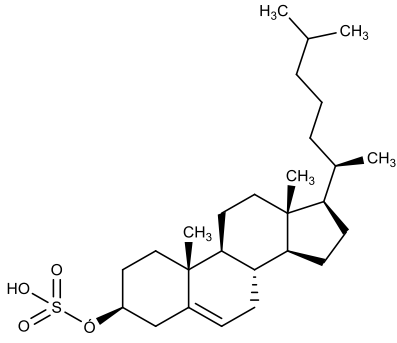
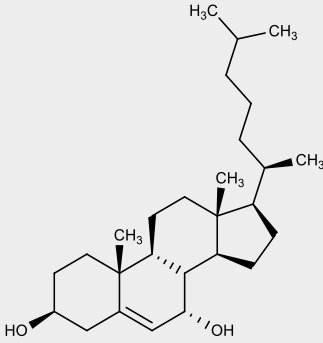
Isoflavones, such as biochanin A, genistein, formononetin, and daidzein, common plant constituents, have been recently reviewed for their properties in the prevention and treatment of cancer, metabolic syndrome, and cardiovascular disease. These isoflavones act as agonists of ROR α - and ROR γ - mediated transactivation, enhancing the RORE activation in a ROR-dependent manner. The isoflavones containing a methoxy group at 4' position, such as formononetin and biochanin A, show a higher agonistic activity when compared to daidzein and genistein that possess a hydroxyl group in the same position. This suggests that hydrophobic isoflavones preferentially enhance RORE activation via ROR α /ROR γ when compared to hydrophilic isoflavones. Isoflavones can also enhance IL17 α promoter activation through RORE activation. The four isoflavones enhance the binding of co-activators on the LBD region of RORs, with a mechanism of stabilization of the AF2 region of ROR with the respective co-activators, for example in immune cells. With these conclusions it can be suggested that isoflavones may be a promising therapeutic strategy in the treatment of immunosuppressive diseases, with beneficial functions for the T_H17 cells in fighting pathogens, but may also lead to compounds for the treatment of immune dysfunction diseases, as they play a major role in the regulation of diverse diseases that involve RORs ^{20; 46}.

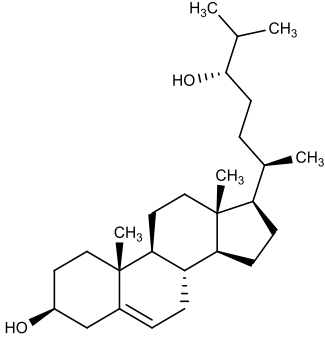
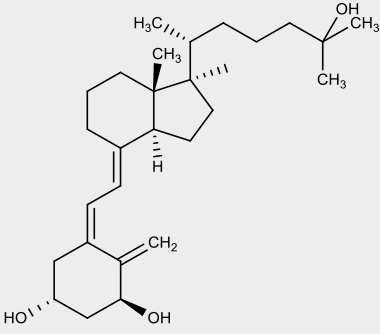
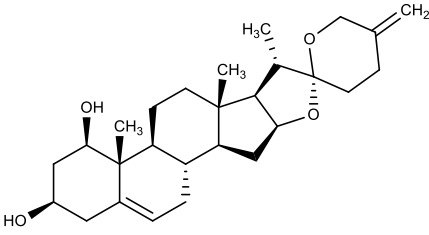
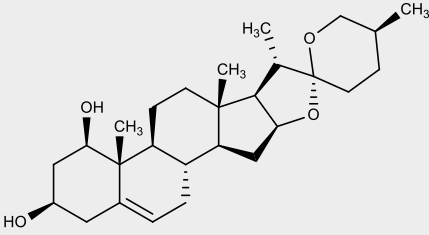
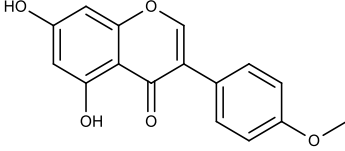
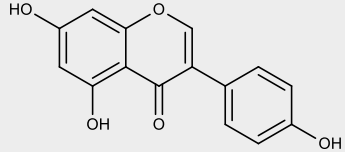
2.2. Nobiletin

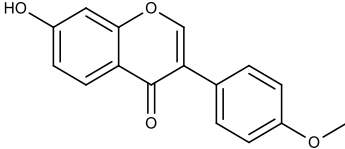
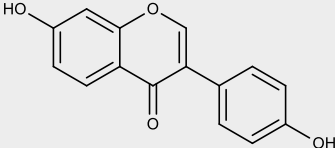
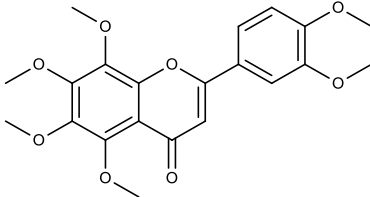
As a natural clock-enhancing polymethoxylated flavone, nobiletin (NOB) enhances circadian rhythms to prevent metabolic disease via a circadian gene network, having as main and direct targets the ROR nuclear receptor. NOB, a ROR α /ROR γ agonist, presents a CLOCK gene-dependent efficacy in the protection of metabolic syndrome, also suggesting an enhancement of the circadian clocks based on the activation of ROR receptors, with a stabilization of the core CLOCK/BMAL1 transcriptional feedback loop. NOB is also associated with the enhancement of bile acids synthesis genes in the liver, with overall protection of the liver from the metabolic changes. NOB, in aged mice with high-fat diets, promoted healthy aging with improved energy expenditure, cold tolerance, exercise endurance, grip strength, and inflammatory markers. With skeletal muscle as a major site of glucose and lipid uptake, NOB and ROR-targeted circadian gene expression improved the core body temperature, energy expenditure, and exercise endurance, being consistent with the major role that RORs and ligands can have in the metabolic regulation of skeletal muscle. Since the disruption of the circadian rhythm may be associated with cancers and their aggressiveness, NOB may affect

the oncogenic features in some cancer cells, when these are connected to the circadian clock or a ROR target, with anti-cancer effects, especially on malignant cell migration. However, further studies are still required to prove the effects of NOB in the diverse processes where RORs may be involved, especially in the anti-cancer effect, suggesting that this ligand may be crucial as a lead compound in the development of novel therapies ^{11; 20; 47; 48}.

Table 3 - Natural ligands directly affecting RORs

| Compound | Chemical Structure | Target(s) |
|--|--|---|
| Cholesterol |  | ROR α agonist |
| Cholesterol Sulfate |  | ROR α agonist |
| 7α-Hydroxycholesterol |  | ROR α and ROR γ inverse agonist |

| | | |
|---|--|--|
| <p>Cerebrosterol (24S-hydroxycholesterol)</p> |  | <p>RORα and RORγ inverse agonist</p> |
| <p>Secosteroids e.g. 1,25(OH)$_2$D$_3$</p> |  | <p>RORα and RORγ inverse agonist</p> |
| <p>Neuroscogenin</p> |  | <p>RORα agonist</p> |
| <p>25S-Ruscogenin</p> |  | <p>RORα agonist</p> |
| <p>Biochanin A</p> |  | <p>RORα and RORγ inverse agonist</p> |
| <p>Genistein</p> |  | <p>RORα and RORγ inverse agonist</p> |

| | | |
|----------------------------|--|--|
| <p>Formonenetin</p> |  | <p>RORα and RORγ inverse agonist</p> |
| <p>Daidzein</p> |  | <p>RORα and RORγ inverse agonist</p> |
| <p>Nobiletin</p> |  | <p>RORα and RORγ inverse agonist</p> |

Natural ligands indirectly affecting RORs

Melatonin

Melatonin has been correlated with ROR in different moments. The natural ligands for ROR have been reviewed by Ladurner *et al.*²⁰, correlating ROR with steroids, terpenoids, polyketides, and cardiac glycosides, all of them structurally different from melatonin^{20; 29}. However, melatonin has been claimed as a natural product that, indirectly, affects ROR^{20; 29}.

The direct binding of melatonin to ROR β has been reported, however, the results were not reproducible and the report was retracted^{20; 29; 49}.

ROR α is frequently correlated with the melatonin processes and is often associated with the anti-inflammatory response and alleviation of oxidative stress²². ROR regulates immunity, development (especially of the nervous system), circadian rhythm, tumors, cellular metabolism, and oxidative stress, all processes correlated with the main targets associated with melatonin²¹. Nevertheless, no consensus has been reached since some studies report that melatonin can regulate the transcriptional activity of ROR's while others found that ROR's function is independent of melatonin-induced signals²¹.

ROR α may be correlated to melatonin function and may be involved in the diverse effects of melatonin²¹. A study made by Xu *et al.*²² hypothesizes that ROR α is also associated with melatonin in the cardioprotective effects against myocardial injury. The study is based on the role of melatonin and ROR α in physiological or pathological cardiac hypertrophy. Cardiac

hypertrophy is caused by pressure/volume overload and neurohormonal activation, and the increased heart mass is classified as physiological or pathological. Physiological cardiac hypertrophy is associated with endurance training, it is reversible, and leads to the prevention of diseases, enhancing cardiac function. However, pathological hypertrophy is a risk factor for chronic heart failure. The study concludes that, combined, ROR α mediates the beneficial role of melatonin in Transverse Aortic Constriction (TAC)-induced pathological hypertrophy *in vivo*, proving that ROR α mediates the cardioprotective effect of melatonin and its anti-hypertrophic and antioxidant effect in pathological hypertrophic hearts. However, it appears to depend on the transcriptional activation of MnSOD gene expression via direct binding to the RORE, alleviating oxidative stress. This study supports the role of melatonin-ROR α as an essential regulator of cardiac physiology/pathology, highlighting a possible protective role in cardiac diseases related to oxidative stress ²².

Another study by Zang *et al.*¹⁹ proved that ROR α overexpression had beneficial effects against cerebral ischemia/reperfusion (CI/R) injury and that melatonin treatment significantly decreased CI/R injury. The study concluded that ROR α is a novel endogenous negative regulator of CI/R injury and a mediator of melatonin's neuroprotection, with suppressing effects against CI/R – stimulated oxidative stress and cellular apoptosis. Melatonin-ROR α axis signaling may be considered an important approach in the development of targets for ischemia and stroke management. This study supports the relevance of ROR α function and the involvement of melatonin-ROR α through diverse effects ¹⁹.

A study by Yasui *et al.*⁵⁰ highlighted the prominent role of ROR α in the development of cerebellar Purkinje cells. Mice missing this receptor showed cerebellar atrophy and ataxia. Melatonin did not imply cerebellar development, suggesting that ROR α functions are independent of melatonin signaling ^{21; 50}.

In circadian rhythm, ROR β is overexpressed in sites that regulate the circadian clock, including SCN and the pineal gland. However, ROR β appears to be less prominent in melatonin signaling. A study by Masana *et al.*⁵¹ proved the role of this receptor in the sensorial processes and the behavioral change in the absence of ROR β . However, and although the mRNA levels of the receptor in the pineal gland were similar to the ones in melatonin production, there was an absence of RORE in the promoter, suggesting that the ROR β receptor may not influence melatonin synthesis ^{21; 51}.

Ladurner *et al.*²⁰ concluded that melatonin's influence in ROR transcriptional activity appears to be cell-type-specific, and melatonin may modulate ROR expression through the

influence of this hormone in the circadian rhythm²⁰. Ma *et al.*²¹ concluded that there is no consensus if ROR is a nuclear receptor of melatonin or not. However, it was proved that melatonin can, in some expression patterns and functions of ROR, be associated with these receptors to some degree²¹. For a definitive understanding of the role of ROR and melatonin, more studies should be conducted in this area, providing a more profound understanding of the relation between this nuclear receptor and the hormone.

Future perspectives

Circadian rhythm is interconnected with a wide range of diseases and plays a fundamental role in behavior, physiology, and metabolism. Profound knowledge of the mechanisms, ligands, and modulators that influence the circadian clock in the regulation of diseases may present a unique guide for the development of novel therapies. The circadian rhythm and chronotherapy are increasing their importance in the treatment of diseases, such as sleep disorders, neurodegenerative diseases, cancer, aging, or mood-related psychiatric disorders^{1; 5}.

In the case of melatonin, and specifically of melatonin receptors agonists, the described MT1 and MT2 crystal structures allowed the discovery of new ligands, mainly based on the orthosteric binding site of the receptors, mimicking the structural features of melatonin. The process of mimicking melatonin even allowed the discovery of three drugs approved for the market but the association with large-scale virtual screening using the 3D crystal structure provided the discovery of new chemotypes of melatonergic ligands with previously unreported activities. However, the discovery of antagonists, especially for the MT1 subtype, remains a major challenge¹³.

The approval of melatonin as the active substance in Circadin[®], a prolonged-release formulation for the treatment of insomnia over the age of 55 years¹², and the approval of the three melatonin receptors agonists, Valdoxan[®] and Thymanax[®] for depression (with agomelatine as the active substance); Rozerem[®] for delayed sleep onset (with ramelteon as the active substance) and Hetlio^z[®] for non-24 hour sleep-wake disorder (with tasimelteon as the active substance), demonstrates the major role of MT1 and MT2 receptors and melatonin in addressing different pathologies¹³⁻¹⁸.

Since NR have diverse roles in the regulation of metabolism, there is significant potential in ligands that regulate RORs and REV-ERBs activity to help treat metabolic

disorders³. ROR is a promising therapeutic target in several diseases as mentioned before. Recent studies focused on the review of natural and synthetic ligands to this receptor, foretelling the essential role that RORs may have in the development of new therapies, emerging as an opportunity for further research^{1; 20; 21}. In the management of metabolic syndromes, ROR antagonists may provide a novel therapeutic target⁷.

Different ligands, synthetic and natural, have been studied to determine their role in the regulation of ROR and the regulation of the circadian rhythm. ROR α , for its major role in circadian rhythm control, is the main target of these agonists, antagonists, and inverse agonists of RORs. In the synthetic ligands it's worth mentioning T0901317 as the first discovered synthetic ligand, SR3335 in the treatment of obesity and SRI078 in the treatment of autism spectrum disorder^{1; 3; 30-34}. As natural ligands of the ROR receptors, cholesterol and cholesterol sulfate are worth mentioning for their agonistic effect in the ROR α receptor, however, "cerebrosterol" may present a major role in brain development, especially in young children^{20; 43}. Nobiletin, one of the most prominent ROR α /ROR γ agonists, and for its effects in bile acid regulation, metabolic syndrome and circadian related diseases, but also the novel role as an anti-cancer molecule, demands further studies, with NOB as a strong candidate as the lead compound in drug discovery processes^{11; 20; 47; 48}.

A disruption of the circadian clock impacts health, with the potential to induce and develop a clock-related disease. The circadian rhythm and the related mechanisms have been studied and used in the development of novel drugs, with more specific properties and with a wide range of mechanisms for the treatment of pathologies. Melatonin plays one of the major roles in the regulation of this complex mammalian clock, however, further research proved that other receptors-like REV-ERBs and especially RORs may present unique approaches in the development of new lead compounds. Although the ligands of ROR still need further research, compounds with different effects and mechanisms in the receptor, natural or synthetic, have been exponentially more relevant in clock-related diseases. In a near future, with the constant necessity of novel and innovative treatments, these compounds present themselves as possible new and relevant compounds in the complex process of drug discovery and treatment of clock-related diseases, but also in the treatment of other current unmet medical needs.

References

1. RIBEIRO, Rodrigo F. N.; CAVADAS, Cláudia; SILVA, Maria Manuel C. - Small-molecule modulators of the circadian clock: Pharmacological potentials in circadian-related diseases. **Drug Discovery Today**. ISSN 18785832. 2021). doi: 10.1016/j.drudis.2021.03.015.
2. NIH - Circadian Rhythms Fact Sheet. **National Institutes of General Medical Sciences**. 2012) 1–2.
3. KOJETIN, Douglas J.; BURRIS, Thomas P. - REV-ERB and ROR nuclear receptors as drug targets. **Nature Reviews Drug Discovery**. ISSN 14741784. 13:3 (2014) 197–216. doi: 10.1038/nrd4100.
4. JETTEN, Anton M. - Retinoid-related orphan receptors (RORs): critical roles in development, immunity, circadian rhythm, and cellular metabolism. **Nuclear receptor signaling**. ISSN 15507629. 7:2009). doi: 10.1621/nrs.07003.
5. CHA, Hyo Kyeong *et al.* - Small molecule modulators of the circadian molecular clock with implications for neuropsychiatric diseases. **Frontiers in Molecular Neuroscience**. ISSN 16625099. 11:January (2019). doi: 10.3389/fnmol.2018.00496.
6. ZISAPEL, Nava - New perspectives on the role of melatonin in human sleep, circadian rhythms and their regulation. **British Journal of Pharmacology**. ISSN 14765381. 175:16 (2018) 3190–3199. doi: 10.1111/bph.14116.
7. JETTEN, Anton M.; KANG, Hong Soon; TAKEDA, Yukimasa - Retinoic acid-related orphan receptors α and γ : Key regulators of lipid/glucose metabolism, inflammation, and insulin sensitivity. **Frontiers in Endocrinology**. ISSN 16642392. 4:JAN (2013) 1–8. doi: 10.3389/fendo.2013.00001.
8. JAGANNATH, Aarti *et al.* - The genetics of circadian rhythms, sleep and health. **Human Molecular Genetics**. ISSN 14602083. 26:R2 (2017) R128–R138. doi: 10.1093/hmg/ddx240.
9. HUANG, Shenzhen *et al.* - Recent advances in modulators of circadian rhythms: an update and perspective. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**. ISSN 14756374. 35:1 (2020) 1267–1286. doi: 10.1080/14756366.2020.1772249.
10. XIE, Zizhen *et al.* - A review of sleep disorders and melatonin. **Neurological Research**. ISSN 17431328. 39:6 (2017) 559–565. doi: 10.1080/01616412.2017.1315864.
11. HE, Baokun *et al.* - The Small Molecule Nobiletin Targets the Molecular Oscillator to Enhance Circadian Rhythms and Protect against Metabolic Syndrome. **Cell Metabolism**.

ISSN 19327420. 23:4 (2016) 610–621. doi: 10.1016/j.cmet.2016.03.007.

12. **Circadin | European Medicines Agency** - [Consult. 29 jun. 2021]. Disponível em: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/circadin>

13. BOUTIN, Jean A. *et al.* - Melatonin receptor ligands: A pharmaco-chemical perspective. **Journal of Pineal Research**. ISSN 1600079X. 69:3 (2020) 1–18. doi: 10.1111/jpi.12672.

14. **Hetlioz | FDA** - atual. 2009. [Consult. 18 jul. 2021]. Disponível em: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/daf/index.cfm?event=overview.process&AppNo=205677>

15. **Hetlioz | European Medicines Agency** - [Consult. 18 jul. 2021]. Disponível em: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/hetlioz>

16. **Thymanax | European Medicines Agency** - [Consult. 18 jul. 2021]. Disponível em: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/thymanax>

17. **Valdoxan | European Medicines Agency** - [Consult. 18 jul. 2021]. Disponível em: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/valdoxan>

18. **Rozerem | FDA** - [Consult. 18 jul. 2021]. Disponível em: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/daf/index.cfm?event=overview.process&AppNo=021782>

19. ZANG, Minhua *et al.* - The circadian nuclear receptor ROR α negatively regulates cerebral ischemia–reperfusion injury and mediates the neuroprotective effects of melatonin. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**. ISSN 1879260X. 1866:11 (2020) 165890. doi: 10.1016/j.bbadis.2020.165890.

20. LADURNER, Angela; SCHWARZ, Patrik F.; DIRSCH, Verena M. - Natural products as modulators of retinoic acid receptor-related orphan receptors (RORs). **Natural Product Reports**. ISSN 14604752. 38:4 (2021) 757–781. doi: 10.1039/d0np00047g.

21. MA, Haozhen *et al.* - ROR: Nuclear Receptor for Melatonin or Not? **Molecules**. ISSN 14203049. 26:9 (2021) 2693. doi: 10.3390/molecules26092693.

22. XU, Longwei *et al.* - Melatonin differentially regulates pathological and physiological cardiac hypertrophy: Crucial role of circadian nuclear receptor ROR α signaling. **Journal of Pineal Research**. ISSN 1600079X. 67:2 (2019) 1–21. doi: 10.1111/jpi.12579.

23. EMET, Mucahit *et al.* - Bir melatonin derlemesi, reseptörleri ve ilaçları. **Eurasian Journal of Medicine**. ISSN 13088742. 48:2 (2016) 135–141. doi: 10.5152/eurasianjmed.2015.0267.

24. NIH - **Definition of Antagonist - NCI Dictionary of Cancer Terms - National Cancer Institute** atual. 2018. [Consult. 17 jul. 2021]. Disponível em: <https://www.cancer.gov>

/publications/dictionaries/cancer-terms/def/antagonist

25. NIH - Definition of Agonist - NCI Dictionary of Cancer Terms - National Cancer Institute. **National Cancer Institute**. 2013) 45735.
26. **Melatonin receptors | G protein-coupled receptors | IUPHAR/BPS Guide to PHARMACOLOGY** - [Consult. 18 jul. 2021]. Disponível em: <https://www.guidetopharmacology.org/GRAC/FamilyDisplayForward?familyId=39>
27. ZHANG, Yan *et al.* - ROR nuclear receptors: Structures, related diseases, and drug discovery. **Acta Pharmacologica Sinica**. ISSN 17457254. 36:1 (2015) 71–87. doi: 10.1038/aps.2014.120.
28. BURRIS, Thomas P. - Nuclear hormone receptors for heme: REV-ERB α and REV-ERB β are ligand-regulated components of the mammalian clock. **Molecular Endocrinology**. ISSN 08888809. 22:7 (2008) 1509–1520. doi: 10.1210/me.2007-0519.
29. LIU, Lei *et al.* - Melatonin Target Proteins: Too Many or Not Enough? **Frontiers in Endocrinology**. ISSN 16642392. 10:November (2019) 1–13. doi: 10.3389/fendo.2019.00791.
30. WANG, Yongjun *et al.* - Identification of SR1078, a Synthetic Agonist for the Orphan Nuclear Receptors ROR α and ROR γ . **ACS Chemical Biology**. 5:11 (2010) 1029–1034. doi: 10.1021/CB100223D.
31. KUMAR, Naresh *et al.* - The benzenesulfoamide T0901317 [N-(2,2,2-trifluoroethyl)-N-[4-[2,2,2-trifluoro-1-hydroxy-1-(trifluoromethyl)ethyl]phenyl]-benzenesulfonamide] is a novel retinoic acid receptor-related orphan receptor- α/γ inverse agonist. **Molecular Pharmacology**. ISSN 0026895X. 77:2 (2010) 228–236. doi: 10.1124/mol.109.060905.
32. WANG, Yongjun *et al.* - Therapeutic Effect of a Synthetic ROR α/γ Agonist in an Animal Model of Autism. **ACS Chemical Neuroscience**. ISSN 19487193. 7:2 (2016) 143–148. doi: 10.1021/acscchemneuro.5b00159.
33. BYUN, Jun Kyu *et al.* - Retinoic acid-related orphan receptor alpha reprograms glucose metabolism in glutamine-deficient hepatoma cells. **Hepatology**. ISSN 15273350. 61:3 (2015) 953–964. doi: 10.1002/hep.27577.
34. KUMAR, Naresh *et al.* - Identification of SR3335 (ML-176): A Synthetic ROR α Selective Inverse Agonist. **ACS Chemical Biology**. 6:3 (2010) 218–222. doi: 10.1021/CB1002762.
35. SOLT, Laura A. *et al.* - Suppression of TH17 differentiation and autoimmunity by a synthetic ROR ligand. **Nature** 2011 **472:7344**. ISSN 1476-4687. 472:7344 (2011) 491–494.

doi: 10.1038/nature10075.

36. KALLEN, Joerg *et al.* - Crystal Structure of the Human ROR α Ligand Binding Domain in Complex with Cholesterol Sulfate at 2.2 Å. **Journal of Biological Chemistry**. ISSN 00219258. 279:14 (2004) 14033–14038. doi: 10.1074/jbc.M400302200.
37. BITSCH, Francis *et al.* - Identification of natural ligands of retinoic acid receptor-related orphan receptor α ligand-binding domain expressed in Sf9 cells - A mass spectrometry approach. **Analytical Biochemistry**. ISSN 00032697. 323:1 (2003) 139–149. doi: 10.1016/j.ab.2003.08.029.
38. JIN, Lihua *et al.* - Structural basis for hydroxycholesterols as natural ligands of orphan nuclear receptor ROR γ . **Molecular Endocrinology**. ISSN 08888809. 24:5 (2010) 923–929. doi: 10.1210/me.2009-0507.
39. SOROOSH, Pejman *et al.* - Oxysterols are agonist ligands of ROR γ t and drive Th17 cell differentiation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. ISSN 10916490. 111:33 (2014) 12163–12168. doi: 10.1073/pnas.1322807111.
40. WANG, Yongjun *et al.* - Modulation of retinoic acid receptor-related orphan receptor α and γ activity by 7-oxygenated sterol ligands. **Journal of Biological Chemistry**. ISSN 00219258. 285:7 (2010) 5013–5025. doi: 10.1074/jbc.M109.080614.
41. HANYU, Osamu *et al.* - Cholesterol sulfate induces expression of the skin barrier protein filaggrin in normal human epidermal keratinocytes through induction of ROR α . **Biochemical and Biophysical Research Communications**. ISSN 0006291X. 428:1 (2012) 99–104. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.10.013.
42. HU, Xiao *et al.* - Sterol metabolism controls TH17 differentiation by generating endogenous ROR γ agonists. **Nature Chemical Biology**. ISSN 15524469. 11:2 (2015) 141–147. doi: 10.1038/nchembio.1714.
43. WANG, Yongjun *et al.* - A Second Class of Nuclear Receptors for Oxysterols: Regulation of ROR α and ROR γ activity by 24S-Hydroxycholesterol (Cerebrosterol). **Biochimica et biophysica acta**. 1801:8 (2010) 917. doi: 10.1016/j.BBALIP.2010.02.012.
44. SLOMINSKI, Andrzej T. *et al.* - RORo: And ROR γ are expressed in human skin and serve as receptors for endogenously produced noncalcemic 20-hydroxy- and 20,23-dihydroxyvitamin D. **FASEB Journal**. ISSN 15306860. 28:7 (2014) 2775–2789. doi: 10.1096/fj.13-242040.

45. HELLEBOID, Stéphane *et al.* - The identification of naturally occurring neoruscogenin as a bioavailable, potent, and high-affinity agonist of the nuclear receptor ROR α (NR1F1). **Journal of Biomolecular Screening**. ISSN 10870571. 19:3 (2014) 399–406. doi: 10.1177/1087057113497095.
46. KOJIMA, Hiroyuki *et al.* - Isoflavones enhance interleukin-17 gene expression via retinoic acid receptor-related orphan receptors α and γ . **Toxicology**. ISSN 18793185. 329:2015) 32–39. doi: 10.1016/j.tox.2015.01.007.
47. NOHARA, Kazunari *et al.* - Nobiletin fortifies mitochondrial respiration in skeletal muscle to promote healthy aging against metabolic challenge. **Nature Communications**. ISSN 20411723. 10:1 (2019). doi: 10.1038/s41467-019-11926-y.
48. NOHARA, Kazunari *et al.* - Coordinate regulation of cholesterol and bile acid metabolism by the clock modifier nobiletin in metabolically challenged old mice. **International Journal of Molecular Sciences**. ISSN 14220067. 20:17 (2019). doi: 10.3390/ijms20174281.
49. BECKER-ANDRÉ, Michael *et al.* - Pineal gland hormone melatonin binds and activates an orphan of the nuclear receptor superfamily. **Journal of Biological Chemistry**. ISSN 00219258. 269:46 (1994) 28531–28534. doi: 10.1074/jbc.272.26.16707.
50. YASUI, Hiroyuki *et al.* - Global Knockdown of Retinoid-related Orphan Receptor α in Mature Purkinje Cells Reveals Aberrant Cerebellar Phenotypes of Spinocerebellar Ataxia. **Neuroscience**. ISSN 18737544. 462:2021) 328–336. doi: 10.1016/j.neuroscience.2020.04.004.
51. MASANA, Monica I. *et al.* - Behavioral characterization and modulation of circadian rhythms by light and melatonin in C3H/HeN mice homozygous for the ROR β knockout. **American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology**. ISSN 03636119. 292:6 (2007) 2357–2367. doi: 10.1152/ajpregu.00687.2006.