



**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
EGAS MONIZ**

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

O PAPEL DA MELATONINA

Trabalho submetido por
Filipe Manuel Carvalho Botas
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Outubro de 2014



INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

O PAPEL DA MELATONINA

Trabalho submetido por
Filipe Manuel Carvalho Botas
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho orientado por
Doutor António Lourenço Cunha Monteiro

Outubro de 2014

Agradecimentos

Chegar ao fim desta etapa só foi possível graças ao meu empenho individual, mas também a professores, familiares e amigos e por isso manifesto a minha gratidão a todos os que estiveram envolvidos neste objectivo e que contribuíram para o seu sucesso.

Ao Instituto e a todos os professores pela disponibilidade que sempre demonstraram durante estes 5 anos.

Ao meu orientador, Doutor António Cunha Monteiro, pelo apoio e confiança que demonstrou desde do início.

À minha família, pelo apoio incondicional que me deu durante estes 5 anos, em especial ao meu pai José Botas, à minha mãe Edite Carvalho e ao meu irmão Jorge Botas.

À minha namorada, Andreia Diz pela paciência, incentivo e apoio mesmo nos momentos mais difíceis.

A todos os meus colegas e amigos que conheci e que me continuam a acompanhar, Sara Garrido, Tatiana Silva, Vitória Polido e Alexandre Rebocho, pela amizade, apoio e companheirismo

Um agradecimento especial ao Gonçalo Paralta, Frederico Duarte e Ana Bastos, que contribuíram para o meu crescimento e enriquecimento pessoal, e pelos quais tenho uma grande consideração.

Obrigado a todos.

Resumo

A melatonina é uma molécula lipofílica, produzida essencialmente pela glândula pineal. A sua síntese e libertação são determinadas pela presença, ou não, de luz, sendo máxima na sua ausência. Os níveis desta hormona diminuem com a idade, devido a uma redução da capacidade da glândula pineal ou por outras substâncias, como medicamentos. A acção fisiológica advém da sua interacção, sobretudo com receptores de membrana acoplados a proteína G, MT₁ e MT₂ e o seu metabolismo ocorre, principalmente, no fígado. Inicialmente, a melatonina estava associada à reorganização do sistema circadiano endógeno, promoção do sono e à regulação dos ciclos reprodutivos sazonais, sendo que actualmente, para além do importante papel na regulação do ritmo circadiano, do sono e da reprodução, revelou uma elevada capacidade antioxidante, actividade neuroprotectora e anticancerígena. A melatonina tem sido utilizada como suplemento alimentar ou medicamento, principalmente para os distúrbios do sono, não demonstrando toxicidade, nem dependência, mesmo em doses elevadas. Apesar das múltiplas propriedades da molécula, demonstradas em ensaios *in vitro* e *in vivo*, ou ensaios clínicos, a evidência terapêutica, até agora obtida, é largamente insuficiente para comprovar a sua utilização. São por isso necessários realizar mais ensaios clínicos para comprovar a sua eficácia e determinar a dose ideal para cada condição.

Palavras-chave: melatonina, ritmos circadianos, sono, antioxidante

Abstract

Melatonin is a lipophilic molecule, mainly produced by the pineal gland. Its synthesis and release are determined by the presence or absence of light, being maximum in its absence. This hormone levels decrease with age, due to a reduced ability of the pineal gland or other substances, such as drugs. The physiological action results from its interaction, especially with membrane receptors coupled to G, the MT₁ and MT₂ protein metabolism occurs primarily in the liver. Initially, melatonin was associated with the reorganization of the endogenous circadian system, promoting sleep and the regulation of seasonal reproductive cycles and currently, in addition to the role in the regulation of circadian rhythms, sleep and reproduction, the hormone revealed a high antioxidant, anticancer activity and neuroprotective capacity. Melatonin has been used as a supplement or medication, especially for sleep disorders and shows no toxicity or addiction, even at high doses. Despite multiple properties of the molecule, shown at *in vitro* and *in vivo* assays, or in clinical trials, the therapeutic evidence obtained so far is largely insufficient to demonstrate its benefits. There are therefore required to perform more clinical trials to establish their effectiveness and to determine the optimal dosage for each condition.

Keywords: melatonin, circadian rhythms, sleep, antioxidant

Índice Geral

Agradecimentos	3
Resumo	4
Abstract.....	5
Índice de Figuras	7
Índice de Tabelas	8
Lista de Abreviaturas.....	9
1. Introdução.....	11
2. Melatonina: Desde da síntese ao seu metabolismo	13
2.1. Síntese.....	13
2.2. Libertação	17
2.3. Metabolização.....	18
3. Melatonina: Receptores e mecanismo de transdução de sinal	19
3.1. Receptores MT ₁ e MT ₂	20
3.2. Quinona redutase II (receptor “MT ₃ ”).....	22
3.3. Receptores nucleares.....	23
4. Acção da melatonina no ciclo sono-vigília	24
4.1. Arquitectura do sono normal vs insónia	24
4.2. Melatonina na regulação dos ritmos circadianos: ciclo sono-vigília.....	27
4.3. O uso de melatonina exógena na regulação do sono e do ritmo circadiano	30
5. A melatonina como antioxidante.....	36
5.1. Relação entre mitocôndria, papel antioxidante e doenças neurodegenerativas	39
5.2. O papel antioxidante: Uma ponte para a neuroprotecção	40
5.3. Stress oxidativo: outras implicações.....	42
6. A melatonina na inibição do cancro.....	46
7. Conclusão	53
8. Bibliografia.....	54

Índice de Figuras

Figura 1: Representação esquemática da síntese de melatonina	13
Figura 2: Mecanismo fisiológico responsável pela síntese de melatonina	15
Figura 3: Mecanismo geral da influência da luz azul (446-477nm), sobre o núcleo supraquiasmático e a sua inibição na síntese de melatonina	17
Figura 4: Receptores de melatonina associados ao mecanismo de tradução de sinal e resposta celular	19
Figura 5: Hipnograma normal de uma pessoa adulta jovem	25
Figura 6: Regulação do sono pelo processo Circadiano e Homeostático	26
Figura 7: A sincronização dos ritmos circadianos através do núcleo supraquiasmático pela luz ambiental e por estímulos não fóticos.....	28
Figura 8: Cascata antioxidante da melatonina	37
Figura 9: A redução química do O ₂ e a formação de ROS/RNS	38
Figura 10: As várias funções da melatonina (M), nas células do folículo ovárico, especialmente no ovócito (óvulo) e nas células da granulosa	44

Índice de Tabelas

Tabela 1: Tratamento não farmacológico da insónia	35
--	----

Lista de Abreviaturas

ACTH – Hormona Adrenocorticotrófica

ADN – Ácido desoxirribonucleico

AFMK – N¹-acetil-N²-formil-5-metoxiquinuramina

AMK – N¹-acetil-5-metoxiquinuramina

c3-OHM – 3-hidroxi melatonina cíclica

cAMP – Monofosfato de adenosina cíclico (“cyclic adenosine monophosphate”)

CAT – Catalase

CGRif – Células ganglionares retinianas intrinsecamente fotossensíveis

ERs – Receptores de estrogénio (“estrogen receptors”)

FDA – *Food and Drug Administration*

FIG – Folheto intergeniculado

FIV – Fertilização *in vitro*

GABA – Ácido γ -aminobutírico (“gamma-aminobutyric acid”)

GPCR – Receptor acoplado à proteína G (“G protein-coupled receptor”)

GPx – Glutathione peroxidase

HIOMT – Hidroxindol-O-metil transferase

LCR – Líquido cefalorraquidiano

MPTP – Poro de permeabilidade transitória mitocondrial

MT₁/MT₂ – Receptores de transmembranares acoplados a proteínas G

NAT – N-acetiltransferase

“MT₃” – Enzima quinona redutase II

NDR – Núcleo dorsal da rafe

NMR – Núcleo mediano da rafe

NPY – Neuropeptido Y

NREM – Movimento não rápido dos olhos (“non-rapid eye movement”)

NSQ/ SNC – Núcleo supraquiasmático/ *suprachiasmatic nucleus*

PACAP – Péptido activador da adenilciclase pituitária

PVN – Núcleo paraventricular (“paraventricular nucleus”)

REM – Movimento rápido dos olhos (“rapid eye movement”)

ROS – Espécies reactivas de oxigénio (“reactive oxygen species”)

RNS – Espécies reactivas de nitrogénio (“*reactive nitrogen species*”)

ROR – Receptores órfão para retinóides

RZR – Receptores Z para retinóides

SEEMs – moduladores selectivos das enzimas de estrogénio (“*selective estrogen enzyme modulators*”)

SERMs – moduladores selectivos dos receptores do estrogénio (“*selective estrogen receptor modulators*”)

SIRT1 – Sirtuína 1

SNC – Sistema nervoso central

SOD – Superóxido dismutase

TGH – Tracto geniculohipotalâmico

TRH – Tracto retino-hipotalâmico

1. Introdução

A melatonina, N-acetil-5-metoxitriptamina, é uma pequena molécula lipofílica, sintetizada segundo um ritmo circadiano controlado pelo núcleo supraquiasmático (NSQ), sendo essencialmente secretada pela glândula pineal (Hardeland, 2009) (Jung-Hynes & Ahmad, 2009) (Zhang & Zhang, 2014).

Inicialmente, a melatonina estava associada sobretudo à reorganização do sistema circadiano endógeno, promoção do sono e regulação dos ciclos reprodutivos sazonais (Arendt, 1998). Hoje sabe-se que é uma molécula mais versátil, apresentado um papel neuroprotector, antioxidante, anti-inflamatório, anti-envelhecimento, anticancerígeno e também estão documentadas funções importantes na génese e agregação de plaquetas, na composição do sangue, no endotélio dos vasos, na actividade sexual, na temperatura corporal, entre outras (Rodrigues et al., 2014) (Vielma et al., 2014). Ultimamente, também tem sido estudada como uma possível ferramenta no tratamento de infecções causadas por bactérias, vírus e parasitas (Vielma et al., 2014). Uma publicação recente, aponta a melatonina como um potencial tratamento para pessoas infectadas pelo vírus Ébola, desempenhando uma importante função na diminuição da resposta imuno-inflamatória excessiva do organismo (Tan, Korkmaz, Reiter, & Lucien, 2014).

A sua síntese ocorre, sobretudo, na glândula pineal, sendo esta produção responsável pelos valores encontrados no plasma. Além disso, ocorre síntese de melatonina em muitos outros locais, como na retina e outros locais do olho, ovário, placenta, pele, leucócitos, tracto gastrointestinal, medula óssea, glândulas de Harder, glândulas endócrinas, mas o seu papel é autócrino ou parácrino (Hardeland, 2009) (Luchetti et al., 2010) (Maronde & Stehle, 2007) (Srinivasan, Spence, Pandi-Perumal, Brown, & Cardinali, 2011). Contudo, os estudos até à data incidiram sobretudo na melatonina produzida pela glândula pineal e pela retina. Actualmente sabe-se que na retina, a melatonina, tem uma acção local (Maronde & Stehle, 2007). Através de anticorpos, foi possível identificá-la num elevado número de células, para além das responsáveis pela sua síntese. Esta localização foi feita tanto em células endócrinas, como, no fígado, tiróide, pâncreas, ovário, placenta, endométrio e ainda, em células não endócrinas, como plaquetas, timo, células natural killer, cerebelo, entre outras (Kvetnoy, 1999). Em relação aos fluidos, para além do sangue, a melatonina foi detectada na saliva, fluido folicular do ovário, líquido cefalorraquidiano, bÍlis, sémen, entre outros (Take et al., 2009).

A síntese e libertação da melatonina é máxima durante o período escuro do dia e apresenta uma correlação positiva com a duração do mesmo, ou seja, noites mais longas são associadas a uma maior duração da secreção de melatonina (Ribelayga, Pévet, & Simonneaux, 2000). Durante a noite, os valores de melatonina na circulação sanguínea situam-se entre os 80-120 pg/ml, enquanto que, durante o dia, esses valores são baixos situando-se entre os 2-20 pg/ml (Jung-Hynes, Reiter, & Ahmad, 2010). Além disso, a melatonina apresenta uma variação circanual, sendo os picos noturnos mais amplos no Inverno que no Verão, o que permite a regulação da função reprodutiva, particularmente em reprodutores sazonais (Li et al., 2013).

Estes valores elevados de melatonina durante a noite diminuem com a idade, sendo uma das razões apontadas, a diminuição da inervação adrenérgica, assim como a diminuição do número de recetores β -adrenérgicos nos pinealócitos, que acabam por se traduzir numa diminuição da capacidade da glândula pineal (Jung-Hynes, Reiter, et al., 2010). Além disso, causas secundárias também têm sido mencionadas, como o uso de bloqueadores beta-adrenérgicos (ex. propranolol), por parte de muitos idosos. Estes bloqueadores impedem que a noradrenalina se ligue à glândula pineal e, deste modo, limitam a síntese de melatonina (Reiter, Tan, et al., 2009).

A síntese de melatonina na glândula pineal ou na retina é determinada pela presença, ou não, de luz. O ciclo claro-escuro, através do tracto retino-hipotalâmico, vai sincronizar o ritmo intrínseco do núcleo supraquiasmático do hipotálamo. O NSQ, por sua vez, regula o ritmo biológico para a secreção de melatonina. Por fim, as oscilações circadianas nas concentrações sanguíneas de melatonina vão organizar os ritmos circadianos e sazonais (Arendt, 1998) (Jasser, Blask, & Brainard, 2006).

A melatonina atravessa facilmente, tanto as membranas celulares, concentrando-se especialmente no núcleo e mitocôndria das células, assim como as barreiras fisiológicas, como a barreira hematoencefálica. Estas características, entre outras, podem ajudar a explicar a sua ampla distribuição em tecidos e órgãos, assim como em fluidos, e as suas inúmeras funções no organismo (Reiter, Rosales-Corral, Manchester, & Tan, 2013) (Srinivasan et al., 2011).

Um défice de produção de melatonina tem sido relacionado com distúrbios do ritmo circadiano do sono, doenças neurodegenerativas, alguns tipos de cancro, como o cancro da mama e da próstata, depressão, glaucoma entre outras (Pandi-Perumal et al., 2008).

2. Melatonina: Desde da síntese ao seu metabolismo

2.1. Síntese

Após a entrada na célula da glândula pineal por transporte activo, o L-triptofano vai sofrer várias reacções até dar origem à melatonina. Esta via metabólica do triptofano encontra-se descrita na Figura 1 (Silva, 2005).

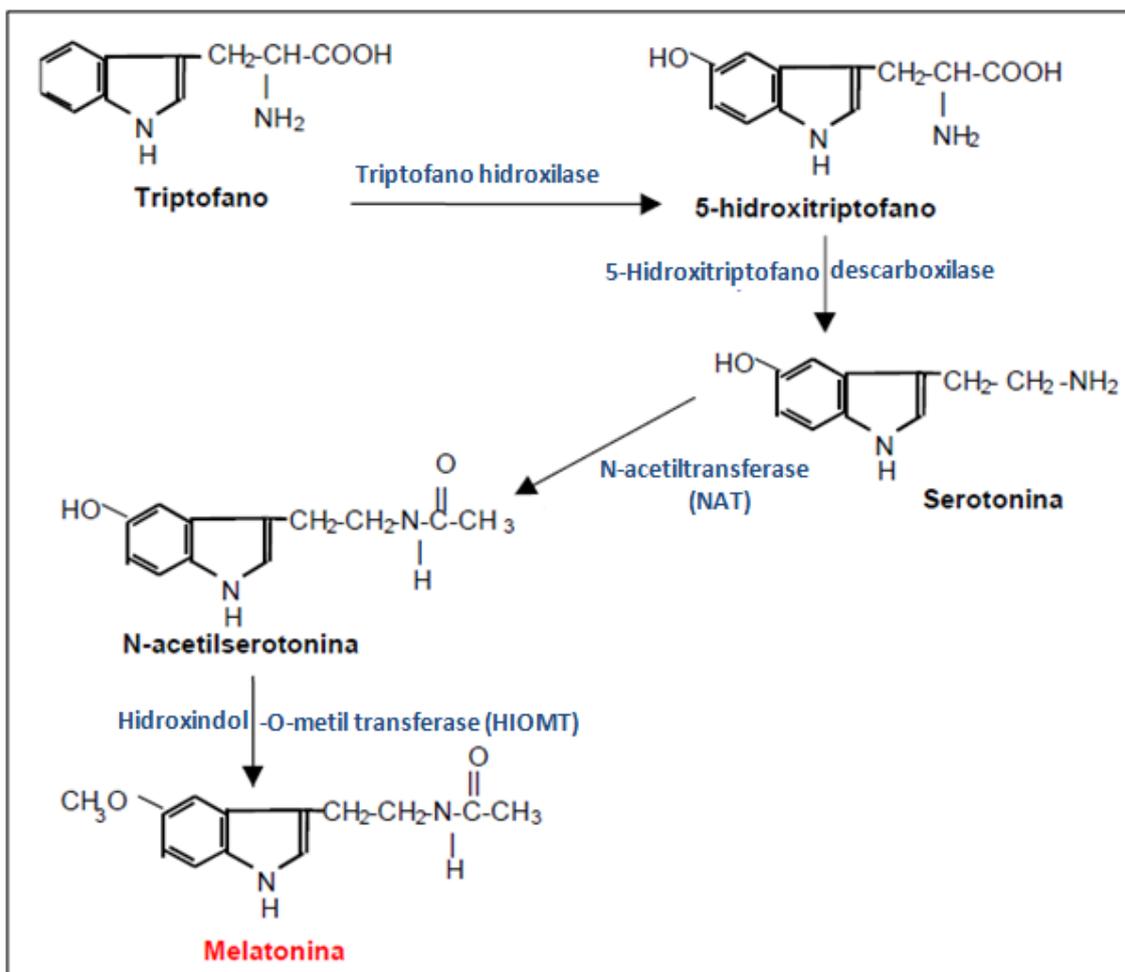


Figura 1 - Representação esquemática da síntese de melatonina (adaptado de (Silva, 2005))

Na verdade, podemos considerar que a síntese da melatonina começa a partir da acetilação da serotonina pela N-acetiltransferase (NAT), dando origem à N-acetilserotonina (Ribelayga et al., 2000) (Silva, 2005). Por sua vez, a N-acetilserotonina é O-metilada pela enzima hidroxindol-O-metil transferase (HIOMT) e dá origem à melatonina (Silva, 2005).

Apesar da secreção destas duas enzimas ser de natureza circadiana, a NAT sofre mais esta influência, podendo a sua concentração ser 100 vezes superior na fase escura comparativamente com a fase clara. A HIOMT apresenta um aumento menos pronunciado (1,5 vezes superior), mas participa na regulação sazonal da produção de melatonina (Ribelayga et al., 2000). Pelo facto da produção de melatonina ser o reflexo da actividade da enzima NAT, ela é considerada a enzima limitante na produção de melatonina (Ribelayga et al., 2000) (Singh & Jadhav, 2014). Uma diferença interessante nestas duas enzimas ocorre ao nível da sua estimulação. Enquanto a NAT tem estimulação adrenérgica da glândula pineal, na HIOMT a estimulação ocorre devido ao neuropeptido Y (NPY) (Ribelayga et al., 2000).

O núcleo supraquiasmático, centro primário de regulação do ritmo circadiano, é o responsável pela regulação da actividade da enzima NAT (Hastings, Maywood, & Reddy, 2008) (Moore, 1996).

Em relação ao mecanismo fisiológico celular de produção de melatonina, a luz, ao incidir na retina, gera uma informação visual que através do tracto retino-hipotalâmico é transmitida ao núcleo supraquiasmático, localizado no hipotálamo anterior. O NSQ funciona como um pacemaker circadiano e gera um sinal eléctrico circadiano, que vai ser transmitido ao núcleo paraventricular (PVN). Por sua vez, um sinal é transmitido do núcleo paraventricular para as células da coluna intermediolateral da medula espinhal. Posteriormente, através de fibras pré-ganglionares simpáticas, é transmitido ao gânglio cervical superior e por fim, os axónios simpáticos pós-ganglionares dos neurónios do gânglio cervical superior enviam o sinal à glândula pineal (Maronde & Stehle, 2007) (Moore, 1996) (Ribelayga et al., 2000). A Figura 2 esquematiza o mecanismo descrito.

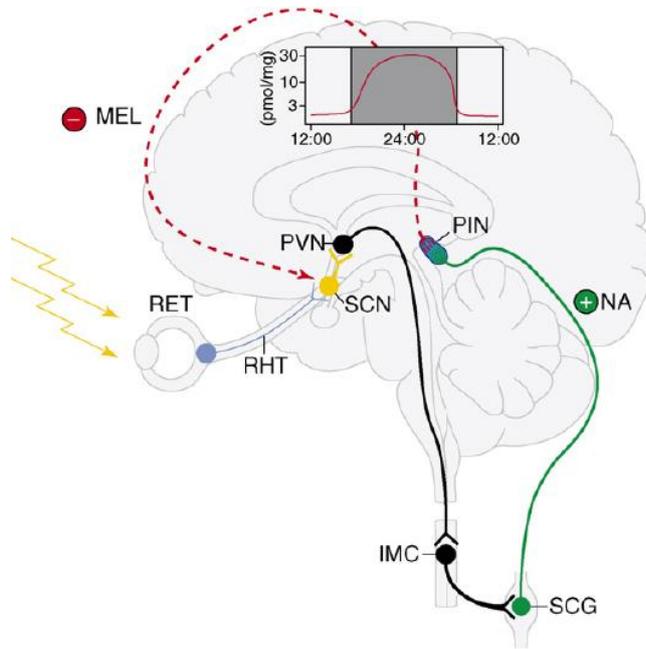


Figura 2 - Mecanismo fisiológico responsável pela síntese da melatonina. MEL: melatonina; PIN: glândula pineal; NA: noradrenalina; PVN: núcleo paraventricular; RET: neuroretina; RHT: tracto retino-hipotalâmico; IMC: coluna intermediolateral da medula espinhal; SCN: núcleo supraquiasmático; SCG: gânglio cervical superior (adaptado de (Maronde & Stehle, 2007))

Deste modo, à noite, sem a presença de luz, o núcleo supraquiasmático envia um sinal eléctrico que vai originar uma libertação de noradrenalina das terminações nervosas simpáticas pós-ganglionares que inervam a glândula pineal. A noradrenalina, por sua vez, vai chegar ao pinealócitos, que são as principais células responsáveis pela produção e secreção de melatonina. Ao interagir com os mesmos, através dos receptores adrenérgicos, vai induzir a produção de melatonina (Maronde & Stehle, 2007). Deste modo, pode estabelecer-se a seguinte relação: à noite, na escuridão, a actividade simpática é alta, assim como a actividade da enzima NAT e a produção de melatonina, enquanto que durante o dia, verifica-se o caso inverso, levando a níveis baixos desta hormona (Moore, 1996).

Apesar de ainda haver muito por desvendar em relação à fototransdução circadiana, sabe-se que a transmissão para o NSQ é feita, sobretudo, pelas células ganglionares retinianas intrinsecamente fotossensíveis (CGRif) e não pelos fotorreceptores clássicos da retina, os cones e bastonetes (Jasser et al., 2006). As CGRif correspondem a uma pequena população de células ganglionares que contêm o fotorpigmento melanopsina. Estas células parecem servir como fotorreceptores, pela distribuição anatómica que apresentam e o facto de apresentarem um pico de fotossensibilidade a um comprimento de onda, que está dentro ou muito próximo do ideal para estimular o sistema circadiano e desencadear a resposta de supressão de melatonina, que se situa entre 446-477nm (luz azul) (Jasser et al., 2006) (Kumbalasisiri &

Provencio, 2005). Deste modo, apesar da luz emitida noutros comprimentos de onda poder suprimir a secreção de melatonina, a luz azul faz essa supressão de forma mais energética (Jasser et al., 2006).

A presença dos vários tipos de fotorreceptores na retina, permite que pessoas cegas, devido à degeneração da camada externa da retina (cones e bastonetes), mantenham a visão circadiana e consigam regular o NSQ e os seus ritmos circadianos (Maronde & Stehle, 2007).

Já se verificou, de um modo simplista como funciona o mecanismo fisiológico responsável pela síntese de melatonina (Maronde & Stehle, 2007). Em relação ao mecanismo de transdução de sinal, a noradrenalina, ao chegar à glândula pineal, aos pinealócitos, vai interagir com os receptores adrenérgicos β_1 e α_1 , sobretudo com os β_1 . Esta interacção leva a um aumento de cAMP e cálcio intracelular. O aumento do cAMP leva ao aumento da proteína cinase A e esta, por sua vez, vai regular a síntese da NAT (Gupta, Spessert, & Vollrath, 2005). Como a libertação de noradrenalina é maior durante a noite, no período de escuridão, a actividade da enzima NAT, assim como a síntese de melatonina, também vão ser maiores (Gupta et al., 2005) (Ribelayga et al., 2000). Durante o dia, a luz leva a libertação do neurotransmissor inibitório, GABA, por parte do núcleo supraquiasmático e como tal, vai haver um efeito contraditório ao explicado anteriormente, como mostra a Figura 3 (Benarroch, 2008). Nessa mesma figura pode observar-se que a luz leva à libertação de glutamato e do péptido activador da adenilciclase pituitária (PACAP), por parte dos neurónios, levando deste modo a uma adaptação da expressão genes do relógio circadiano ao meio ambiente. O núcleo supraquiasmático leva, também, a uma regulação da síntese de melatonina, através da libertação do neurotransmissor GABA. Deste modo, o ciclo claro-escuro leva a alterações sanguíneas de melatonina. Estas mudanças circadianas nos valores de melatonina vão organizar os ritmos circadianos e sazonais, como o sono, além disso, regula o núcleo supraquiasmático, através da interacção com os receptores MT_1 e MT_2 (Benarroch, 2008) (Foster & Hankins, 2007).

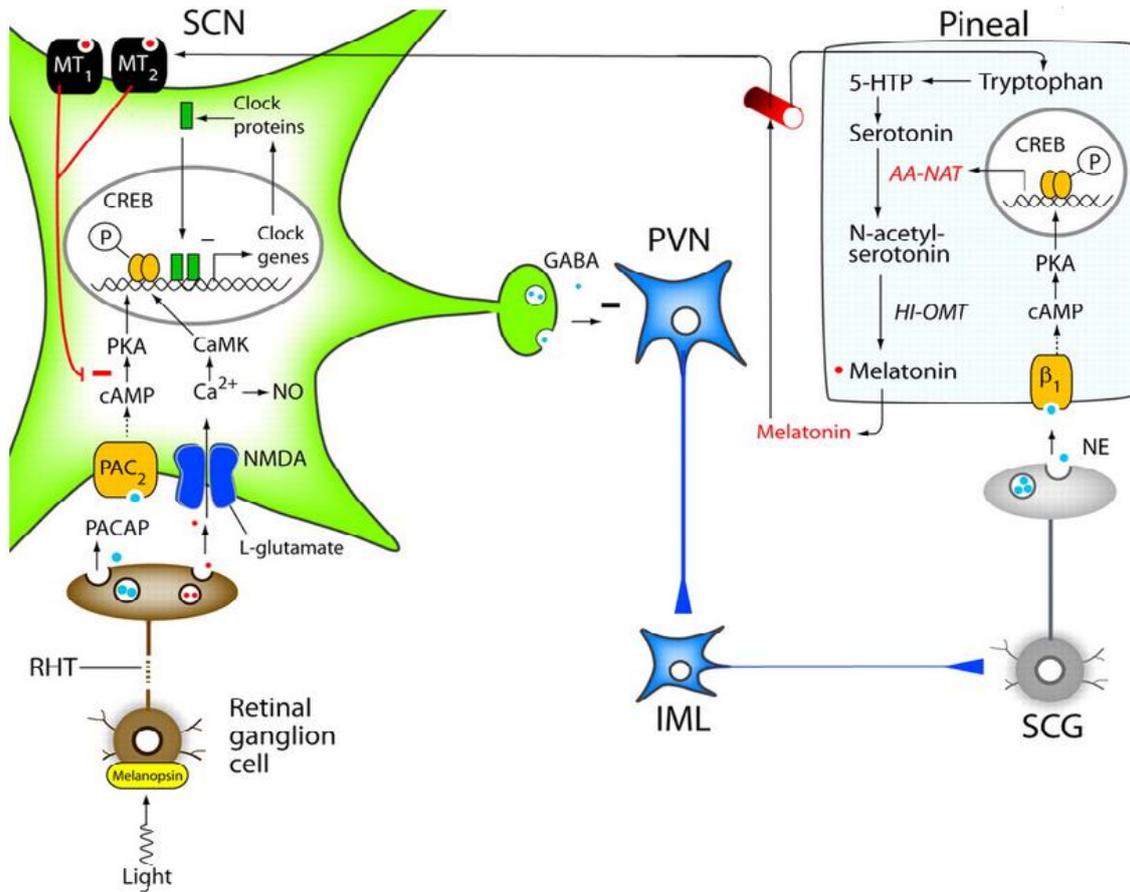


Figura 3 - Mecanismo geral da influência da luz azul (446-477nm), sobre o núcleo supraquiasmático e a sua inibição na síntese de melatonina. Abreviaturas: PACAP: péptido ativador da adenilciclase pituitária; NMDA: receptores de N-metil-D-aspartato; NO: óxido nítrico; PKA: proteína cinase A; CaMK: proteína cinase dependente da calmodulina; cAMP: monofosfato de adenosina cíclico; NE: noradrenalina; CREB: proteína de ligação ao elemento de resposta ao cAMP; AA-NAT= arilalquilamina N-acetiltransferase (adaptado de (Benarroch, 2008))

2.2. Liberação

Depois de sintetizada, a melatonina é libertada directamente para a circulação sanguínea e para líquido cefalorraquidiano (LCR), não ficando armazenada na glândula pineal (Silva, 2005) (Srinivasan et al., 2011). No plasma, a melatonina circula ligada a proteínas, tais como, a albumina, numa percentagem de aproximadamente 50-70%, mas também à hemoglobina e glicoproteína ácida alfa 1 (Leon-Blanco, Guerrero, Reiter, Calvo, & Pozo, 2003) (Silva, 2005) (Srinivasan et al., 2011). De seguida, distribui-se pela maioria dos tecidos do corpo, onde exerce as suas acções, que podem ser mediadas por receptores e/ou independentes de receptores (Pandi-Perumal et al., 2008).

2.3. Metabolização

Em relação à metabolização da melatonina, ela ocorre sobretudo no fígado, dando origem a 6-hidroximelatonina. Posteriormente, esta molécula sofre conjugação com o sulfato, acabando por ser excretada na urina na forma de 6-sulfatoximelatonina (Ma, Idle, Krausz, & Gonzalez, 2005) (Skene et al., 2001). Vários citocromos P450 estão envolvidos na formação da 6-hidroximelatonina, como é o caso do CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1 e CYP2C19, sendo que resultados experimentais sugerem que o CYP1A2, provavelmente, é o citocromo P450 mais importante no metabolismo e o CYP2C19, o menos importante (Ma et al., 2005). A melatonina também pode ser eliminada pela urina sem ser metabolizada, mas este tipo de excreção ocorre em pequenas quantidades (Take et al., 2009). Uma parte da melatonina pode também ser metabolizada no cérebro a N¹-acetil-N²-formil-5-metoxiquinuramina (AFMK) e posteriormente a N¹-acetil-5-metoxiquinuramina (AMK). Além disso, uma pequena parte da melatonina pode ser convertida, em algumas células, a N-acetilserotonina e a 3-hidroximelatonina cíclica (Silva, 2005).

No caso do AFMK e AMK, são também produtos de reacções que envolvem a melatonina e radicais livres, como se verá mais adiante (Hardeland, Tan, & Reiter, 2009). Estes produtos acabam também por ser excretados na urina, constituindo uma outra forma de eliminação da melatonina, neste caso, por um processo não mediado por receptores (Ma et al., 2006).

3. Melatonina: Receptores e mecanismo de transdução de sinal

A acção fisiológica da melatonina advém, em grande parte, da sua interacção com receptores de membrana acoplados a proteínas G, designados de MT₁ (Mel_{1a}) e MT₂ (Mel_{2b}), pela ligação a receptores nucleares da família ROR/RZR e por fim, a melatonina também exerce acções devido à ligação à enzima quinona redutase II, que anteriormente se definiam como receptores MT₃ (Figura 4) (Dubocovich & Markowska, 2005) (Li et al., 2013) (Slominski, Reiter, Schlabritz-Loutsevitch, Ostrom, & Slominski, 2012).

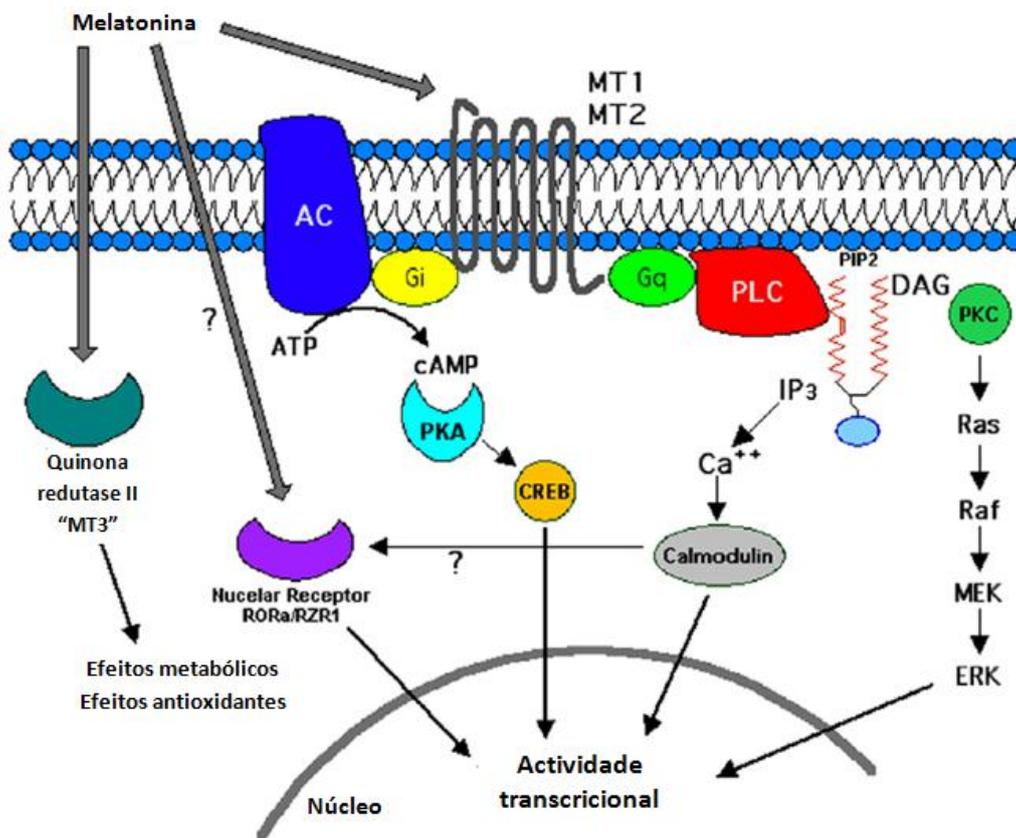


Figura 4 - Receptores de melatonina associados ao mecanismo de tradução de sinal e resposta celular (adaptado de (Slominski et al., 2012))

A ligação a receptores é essencial para as acções da melatonina, na fisiologia do ovário e retina, na regulação da pressão sanguínea, organização dos ritmos circadianos e sazonais, diferenciação dos osteoblastos, nos processos de indução ou formação de cancro, modulação da pigmentação da pele, envelhecimento, entre outras (Li et al., 2013) (Slominski et al., 2012).

Já se tinha verificado anteriormente, que a melatonina tem uma acção importante no cérebro, mais precisamente no núcleo supraquiasmático, mediada por receptores MT₁/MT₂ (Foster & Hankins, 2007) (Li et al., 2013). Contrariamente ao que se pensava, hoje sabe-se que os receptores de melatonina estão amplamente distribuídos, tanto no sistema nervoso central, como em tecidos periféricos do nosso organismo (Dubocovich & Markowska, 2005). Ou seja, esta localização dos receptores abrange, não só o núcleo supraquiasmático, hipotálamo e outras regiões do cérebro, como também, a glândula supra-renal, ovários, estômago, coração, testículos, pulmão, pele, sistema imunitário, glândula mamária, entre outros (Pandi-Perumal et al., 2008).

Como já foi mencionado anteriormente, um défice de produção de melatonina tem sido relacionado com doenças neurodegenerativas (ex: doença de Alzheimer, Parkinson), alguns tipos de cancro, (ex: o cancro da mama e da próstata), distúrbios do ritmo circadiano do sono, depressão e glaucoma. Convém realçar que essas mesmas patologias não se relacionam só com as alterações nos níveis fisiológicos de melatonina, mas também com as alterações na expressão de receptores de melatonina (Pandi-Perumal et al., 2008).

Além disso, a melatonina consegue exercer acções que não são mediadas por receptores, como é o caso do seu efeito antioxidante e, provavelmente, as acções hipnóticas directas (Dubocovich & Markowska, 2005) (Li et al., 2013).

3.1. Receptores MT₁ e MT₂

Actualmente, estes são os dois principais receptores de membrana que estão identificados e caracterizados (Boutin et al., 2008) (Singh & Jadhav, 2014) (Slominski et al., 2012). São membros da família dos receptores acoplados à proteína G (GPCRs), com sete domínios transmembranares, e diferem ligeiramente em termos de afinidade para o seu ligando, a melatonina (Kato et al., 2005). O receptor MT₂ apresenta menos afinidade para o seu ligando natural, comparativamente com o receptor MT₁ (Pandi-Perumal et al., 2008). Os receptores MT₁ estão localizados especialmente no sistema nervoso central (SNC), mas também são encontrados num grande número de tecidos periféricos (ovários, rins, testículos, retina, pâncreas, pele, fígado) (Witt-Enderby, Bennett, Jarzynka, Firestine, & Melan, 2003).

No SNC actuam, sobretudo, como supressores do impulso nervoso. Além disso, têm sido atribuídas outras acções, como a regulação da vasoconstrição periférica (Rodrigues et al., 2014). Por outro lado, os receptores MT₂ apresentam uma localização mais restrita, desempenhado um papel fundamental na retina. As suas acções estão, principalmente, relacionadas com a organização do ritmo circadiano, fisiologia da retina, dilatação dos vasos cardíacos e em respostas inflamatórias na microcirculação (Witt-Enderby et al., 2003). As últimas publicações sugerem que os mesmos também podem desempenhar um papel importante na regulação da temperatura corporal (Rodrigues et al., 2014). Uma diferença importante, sobretudo quando se analisar as propriedades oncostáticas da melatonina, é o facto de os receptores MT₁ serem expressos numa variedade de linhas celulares, incluindo a linha celular de cancro da mama humano MCF-7, enquanto que os receptores MT₂ não (Kiefer et al., 2005). Convém realçar porém, que todos os efeitos cronobióticos resultantes do núcleo supraquiasmático envolvem estes dois receptores (Hardeland, 2009).

Estes receptores estão acoplados a várias proteínas G, sendo as mais importantes a proteínas G_i, mais especificamente a G_{iα2} e G_{iα3}, e proteína G_q (Hardeland, 2009) (Slominski et al., 2012). As vias de transdução de sinal de receptores da melatonina são complexas e dependem do tipo de célula e do tecido (Hardeland, 2009) (Pandi-Perumal et al., 2008). A ligação da melatonina a estes dois receptores envolve alterações na actividade da adenilciclase (AC), fosfolipase C (PLC), guanilciclase e nos canais de cálcio e potássio (Singh & Jadhav, 2014).

Os efeitos clássicos destes receptores ocorrem, sobretudo, pela ligação a proteínas G_i. Quando a melatonina se liga aos receptores MT₁ e MT₂ acoplados a estas proteínas G, vai haver uma diminuição da actividade da adenilciclase (AC), levando a uma diminuição de cAMP. A diminuição do segundo mensageiro (cAMP) leva a uma diminuição da actividade da proteína cinase A (PKA) (Hardeland, 2009) (Slominski et al., 2012). Esta diminuição da PKA, leva a uma diminuição da fosforilação do factor nuclear CREB (proteína de ligação ao elemento de resposta ao cAMP) (Figura 4) (Pandi-Perumal et al., 2008) (Slominski et al., 2012). Este é o mecanismo de tradução de sinal mais comum destes dois receptores, mas dependendo do tecido, órgãos e espécie, outros mecanismos podem ser desencadeados. Por exemplo nos linfócitos, estes receptores vão mediar respostas celulares pelo aumento da actividade da fosfolipase C, levando deste modo ao aumento das concentrações de segundos mensageiros, o trifosfato de inositol (IP3) e diacilglicerol (DAG) (Alarma-Estrany & Pintor, 2007).

Os receptores M_1 também conseguem regular canais iónicos, como é o caso do canal de potássio $kir3$, levando á saída do potássio da célula (Brydon et al., 1999) (Witt-Enderby et al., 2003). Em algumas células, os receptores MT_1 estão acoplados a proteínas Gq, e deste modo vão levar a um aumento da actividade da fosfolipase C. O aumento da actividade desta enzima vai levar á formação de segundos mensageiros, o trifosfato de inositol (IP3) e diacilglicerol (DAG). Por sua vez, o trifosfato de inositol ao ligar-se ao retículo endoplasmático e mitocôndrias, vai levar á libertação de Ca^{2+} . O cálcio funciona como terceiro mensageiro, exercendo efeito sobre a proteína Calmodulina, proteína-cinase dependente da calmodulina e proteína Calreticulina (Slominski et al., 2012). Através da calmodulina e do Ca^{2+} , a melatonina vai mediar acções, como a regulação do citoesqueleto e da enzima óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) (Benitez-King & Antón-Tay, 1993) (Viaro, Nobre, & Evora, 2000). Esta enzima está envolvida, entre outras acções, em processos, tais como: regulação transmissão sináptica no sistema nervoso central e pressão sanguínea, assim como relaxamento do músculo liso (Viaro et al., 2000).

3.2. Quinona redutase II (receptor “ MT_3 ”)

O receptor MT_3 ainda não foi encontrado em humanos, só em hamsters e outros vertebrados (Hardeland, 2009) (Slominski et al., 2012). Contrariamente ao que se tinha especulado inicialmente, nos humanos, não existe um terceiro receptor de membrana, MT_3 . Existe sim, um terceiro local de ligação da melatonina chamado “ MT_3 ”, que foi identificado como sendo a enzima citosólica quinona redutase II (Boutin et al., 2008) (Pandi-Perumal et al., 2008) (Slominski et al., 2012). Estes receptores “ MT_3 ” localizam-se no cérebro, coração, fígado, rim, pulmão, intestino, músculo e tecido adiposo castanho e possivelmente no olho (Pandi-Perumal et al., 2008). O seu papel nas funções da melatonina ainda não é claro, sendo a protecção contra o stress oxidativo a principal acção identificada até a data (Luchetti et al., 2010) (Srinivasan et al., 2011). Estudos recentes em animais sugerem que a ligação da melatonina a estes receptores possivelmente modula outras acções como, a regulação da pressão intra-ocular e respostas inflamatórias na microvasculatura (Doghranji, 2007).

3.3. Receptores nucleares

Apesar de não ser unânime entre investigadores, a evidência actual confirma que a melatonina medeia algumas acções pela ligação a receptores nucleares da família ROR/RZR (receptores órfão para retinóide e receptores Z para retinóides), mais especificamente, RZR α , RZR β , ROR α 2 e ROR α (Hardeland, 2009) (Slominski et al., 2012). A controvérsia assenta, sobretudo, no facto de a melatonina interagir directamente com esses receptores ou se essa interacção ocorre via receptores de membrana, sobretudo o receptor MT₁ (Ram et al., 2002).

A localização depende em muito do subtipo do receptor. Enquanto os receptores RZR β estão praticamente limitados ao tecido neuronal, os receptores RZR α / ROR α são expressos em muitos tecidos, como tálamo, bulbos olfactórios, cerebelo, tecido adiposo, fígado, cartilagem, pele, testículos, entre outros (Smirnov, 2001).

Até à data, os mesmos parecem estar envolvidos em algumas acções exercidas pela melatonina, como modulação imunológica, sobretudo ao nível dos leucócitos e no aumento da actividade de enzimas antioxidantes. Além disso, o receptor RZR α parece ter um papel importante ao nível do núcleo supraquiasmático, levando a uma regulação positiva do gene *bmal*₁, que está envolvido no ritmo circadiano (Hardeland, 2009) (Luchetti et al., 2010).

4. Acção da melatonina no ciclo sono-vigília

A melatonina tem um efeito cronobiótico, conseguindo alterar/ajustar o relógio endógeno em detrimento do fotoperíodo ambiental e deste modo, influenciar os ritmos circadianos da temperatura corporal e o ciclo sono-vigília. Consegue ainda organizar funções fisiológicas sazonais, como a reprodução (Arendt, 2006). A informação sazonal transportada pela melatonina permite a reprodutores sazonais antecipar as estações e sincronizar o seu ciclo reprodutivo com as mesmas. Por exemplo, os roedores são animais que se reproduzem nas estações com dias longos, por outro lado, os ovinos são reprodutores de dias curtos (Reiter, Tan, et al., 2009).

4.1. Arquitectura do sono normal vs insónia

O sono é um estado fisiológico transitório e reversível, que ocorre em alternância com a vigília. É um processo que envolve complexos mecanismos fisiológicos e a sua duração e qualidade são importantes para a qualidade de vida (World Health Organization, 2004). Nos últimos anos, tem-se assistido a uma valorização do sono sobretudo pela sua associação com o desenvolvimento de várias doenças e condições crónicas. O défice de sono tem sido associado com o risco aumentado para o desenvolvimento de diabetes tipo 2, obesidade, doenças cardiovasculares e depressão (Brown, Basheer, Mckenna, Strecker, & Robert, 2012) (Greer, Goldstein, & Walker, 2013) (Karthikeyan et al., 2014) (Nutt, Wilson, & Paterson, 2008) (Somers et al., 2008). Para a maioria da população adulta o ideal é dormir 7-8h por noite (Shneerson, 2009).

O sono normal é dividido em dois estados: movimento não rápido dos olhos (NREM) e movimento rápido dos olhos (REM) (Colten & Altevogt, 2006) (Shneerson, 2009). Actualmente, está definido que o sono mais lento, ou sono não REM contém 3 fases: N1, N2 e N3 (Iber, Ancoli-Israel, Chesson, & Quan, 2007) (Keenan & Hirshkowitz, 2011). Durante estas fases, o sono vai-se tornando progressivamente mais profundo: N1 (sonolência), N2 (sono leve) e N3 (sono profundo ou de ondas delta) (Keenan & Hirshkowitz, 2011). A perda da fase N3 do sono NREM tem sido associada à sonolência diurna, além disso, parece ser a fase responsável pela renovação e reparo do corpo (Shneerson, 2009).

Por outro lado, temos o sono com actividade cerebral mais rápida, ou sono REM (Colten & Altevogt, 2006). Neste estado de sono existem alterações fisiológicas acentuadas, como atonia muscular, activação cortical, aumento da frequência respiratória, movimentos rápidos dos olhos (Tobaldini et al., 2013). O sono REM tem um papel na conservação da energia cerebral, regulação da temperatura corporal, consolidação da memória (Brown et al., 2012). Além disso, é no sono REM que ocorrem os sonhos (Colten & Altevogt, 2006).

Num indivíduo normal, estes dois estados de sono, REM e NREM, alternam-se ciclicamente ao longo da noite (Figura 5) (Colten & Altevogt, 2006) (Keenan & Hirshkowitz, 2011). No total ocorrem 4-6 ciclos por noite, durando cada um 70-110 minutos. Com o decorrer da noite, assiste-se a um encurtamento da fase delta, o sono REM torna-se mais longo e a fase N2 começa a representar a maioria do sono NREM. Hoje sabe-se que irregularidades na distribuição das fases do sono, assim como ausências das mesmas, podem dever-se a factores como: ritmo circadiano, alimentação, actividade física, idade e podem levar a distúrbios do sono (Colten & Altevogt, 2006).

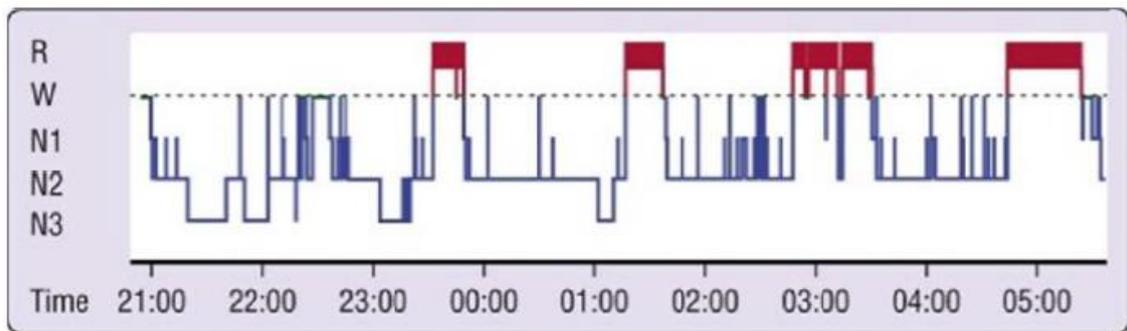


Figura 5 - Hipnograma normal de uma pessoa adulta jovem. Abreviaturas: R= sono REM; W=vigília; N1, N2 e N3= fases do sono não REM (adaptado de (Keenan & Hirshkowitz, 2011)).

O distúrbio do sono mais frequente é a insónia e está relacionando com uma diminuição do número de horas de sono ou qualidade do mesmo. A insónia pode ser classificada como dificuldade em iniciar o sono (insónia inicial), dificuldade em manter o sono (insónia intermédia), despertar precoce (insónia terminal), e por fim, pelo sono de má qualidade ou sono não reparador. As consequências podem ser, cansaço diurno, falta de energia, comprometimento cognitivo, a longo prazo, défice de concentração ou

perda de memória, transtornos psiquiátricos, entre outras (Brown et al., 2012) (Nutt et al., 2008).

Na prática clínica, faz-se também uma classificação quanto à duração e etiologia da insônia. Quanto à duração, podemos dividir em insônia aguda, se for inferior a quatro semanas ou crônica, se a sua duração permanecer para além das quatro semanas e com os sintomas a ocorrerem, pelo menos, em três noites por semana (Cavadas & Ribeiro, 2011). Em relação à etiologia, a insônia pode ser classificada em insônia primária, quando a sua existência é independente de outras condições física ou mental conhecida, ou secundária, quando é sintoma de outra doença ou efeito adverso do uso de substâncias como álcool, medicamentos, entre outras (Brown et al., 2012) (Cavadas & Ribeiro, 2011).

Em relação à regulação do ciclo sono-vigília, ela ocorre pela interação entre um processo homeostático (processo S) e um processo circadiano (processo C) (Figura 6) (Colten & Altevogt, 2006) (Doghramji, 2007) (Muindi, Zeitzer, & Heller, 2014).

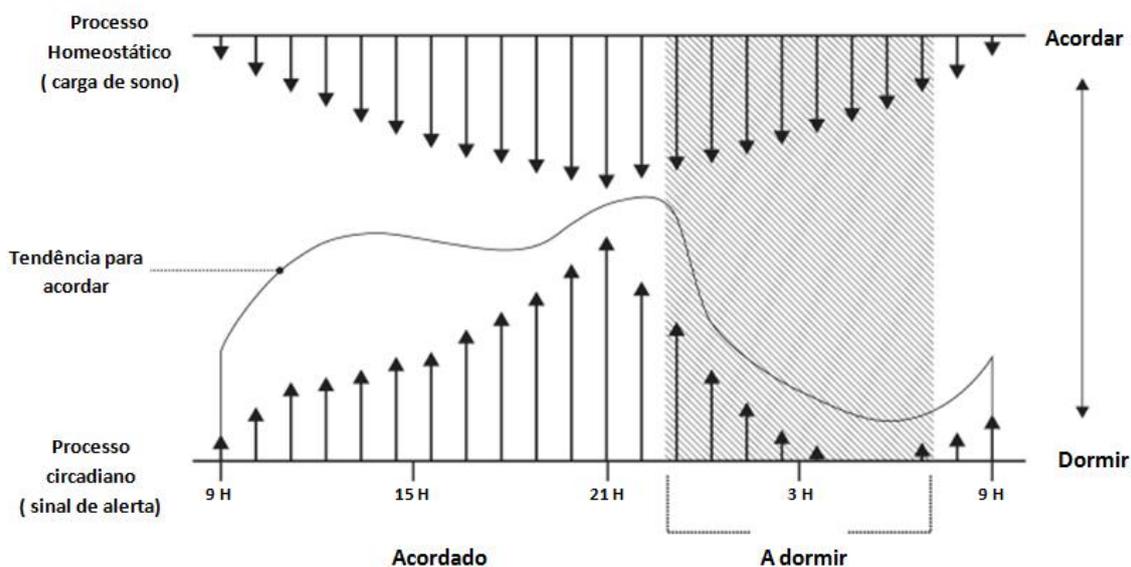


Figura 6 - Regulação do sono pelo processo Circadiano e Homeostático (adaptado de (Doghramji, 2007))

Por um lado, temos o processo homeostático, que promove o sono, por outro, o processo circadiano regulado pelo núcleo supraquiasmático, que mantém a vigília/alerta. Na realidade, o que acontece é uma acumulação da necessidade ou “pressão” do sono durante o momento em que se está acordado, que posteriormente se vai dissipar durante o sono (Colten & Altevogt, 2006) (Doghramji, 2007). O processo

circadiano aumenta ao longo do dia, até duas a três horas antes de se adormecer e serve para neutralizar o processo homeostático. No início do sono, assiste-se a uma diminuição do sinal de alerta, em parte causada pelo aumento dos níveis plasmáticos de melatonina. Esta diminuição do sinal de alerta faz com que o processo homeostático prevaleça, uma vez que não encontra oposição (Doghramji, 2007). Para além da regulação do ciclo sono-vigília pela diminuição do sinal de alerta induzido pelo núcleo supraquiasmático, a melatonina parece ter acções directas sobre o sono (Colten & Altevogt, 2006).

4.2. Melatonina na regulação dos ritmos circadianos: ciclo sono-vigília

O ciclo sono-vigília é um ritmo circadiano gerado e modulado endogenamente, pelo núcleo supraquiasmático, considerado o relógio biológico central nos mamíferos e sincronizado com base em factores fisiológicos internos e factores externos, sendo o mais importante, o ciclo claro-escuro ambiental (Reppert & Weaver, 2001). O facto de ser um ritmo circadiano significa que é um ritmo biológico que tem uma duração de, aproximadamente, 24 horas (Rawashdeh & Maronde, 2012).

O núcleo supraquiasmático é constituído por várias células, que funcionam como osciladores circadianos autónomos e que têm a capacidade de regular os ritmos circadianos através da expressão de vários genes, chamados de “clock genes”: *Period (Per)*; *Clock*; *Cryptochrome (Cry)* e *Bmal1* (Reppert & Weaver, 2001). É através da oscilação circadiana da expressão dos “clock genes” que é controlada a expressão de genes que participam nas nossas funções celulares, ao longo das 24 horas (Seron-Ferre, Valenzuela, & Torres-Farfan, 2007).

Apesar do núcleo supraquiasmático se auto-regular, através de mecanismos internos neurológicos e de regular a expressão destes genes através de mecanismos de feedback negativo e positivo, a periodicidade dos ritmos circadianos tende a afastar-se das 24 horas, caso não exista uma sincronização (Reppert & Weaver, 2001) (Rawashdeh & Maronde, 2012).

Para que seja mantida a periodicidade dos ritmos circadianos é necessário uma adaptação constante ao meio ambiente (*entrainment*), através de sinais ambientais, também chamados sincronizadores temporais externos ou “*Zeitgebers*”, sendo o mais importante o ciclo claro-escuro (Rawashdeh & Maronde, 2012).

A sincronização do núcleo supraquiasmático é feita por três vias aferentes diferentes, envolvendo informação luminosa e estímulos não fóticos (Figura 7). A principal via de sincronização já foi mencionada anteriormente e refere-se à transmissão da informação visual pelo tracto retino-hipotalâmico (TRH), a partir das células ganglionares retinianas intrinsecamente fotossensíveis (CGRif) contendo o fotopigmento melanopsina, sendo o glutamato o principal neurotransmissor envolvido nesta via. Por outro lado, o tracto retino-hipotalâmico também se projecta para o folheto intergeniculado (FIG), que processa essa informação luminosa, juntamente com a não luminosa que provém do núcleo dorsal da rafe (NDR). Depois de processada, essa informação vai chegar ao núcleo supraquiasmático pelo tracto geniculohipotalâmico (TGH), constituindo uma outra via de sincronização. Por fim, ocorre a sincronização exclusivamente não fótica através dos neurónios serotoninérgicos provenientes do núcleo dorsal da rafe (NDR) e núcleo mediano da rafe (NMR) (Dibner, Schibler, & Albrecht, 2010) (Reppert & Weaver, 2001).

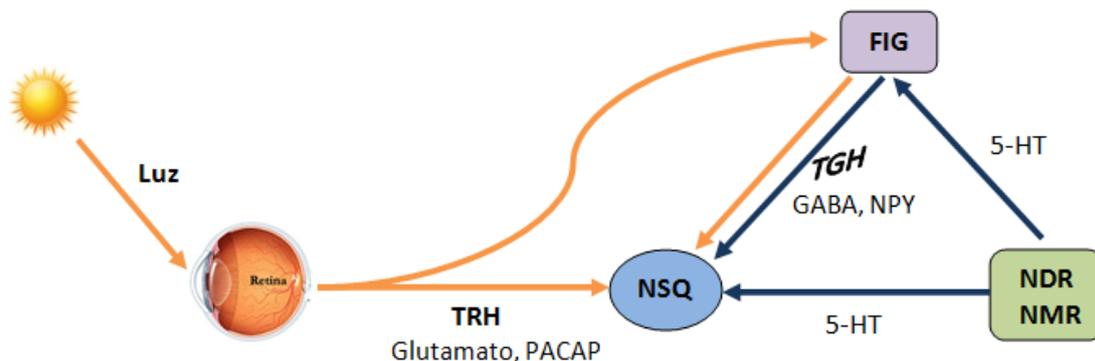


Figura 7 - A sincronização dos ritmos circadianos através do núcleo supraquiasmático pela luz ambiental (setas laranjas) e por estímulos não fóticos (setas azuis). GABA: ácido γ -aminobutírico; NDR: núcleo dorsal da rafe; NMR: núcleo mediano da rafe; TGH: tracto geniculohipotalâmico; FIG: folheto intergeniculado; 5-HT: serotonina (adaptado de (Dibner et al., 2010))

Nos mamíferos, o núcleo supraquiasmático, depois de processar as flutuações do meio ambiente, transmite essas informações sobre o tempo para relógios periféricos, que se localizam na maioria dos tecidos periféricos como retina, fígado, coração e glândula adrenal, mas também em áreas do cérebro fora do NSQ, formando um sistema de temporização circadiana (Brown, Pandi-Perumal, Trakht & Cardinali, 2009) (Seron-

Ferre et al., 2007). As vias eferentes e os mecanismos pelos quais o núcleo supraquiasmático regula a ritmicidade dos tecidos alvos ainda não são bem compreendidos, sabendo-se no entanto, que a hormona antidiurética (vasopressina), os neurotransmissores GABA e o glutamato estão envolvidos em algumas dessas vias (Kalsbeek, Perreau-Lenz & Buijs, 2006) (Reppert & Weaver, 2001).

O neurotransmissor GABA, libertado pelos neurónios pós sinápticos do NSQ, vai-se ligar ao núcleo paraventricular e leva a uma inibição da síntese da melatonina pela glândula pineal (Figura 3). Deste modo, as flutuações sanguíneas da melatonina, causadas pelo ciclo claro-escuro ambiental, são consideradas a principal via de regulação dos relógios periféricos circadianos (Benarroch, 2008) (Reppert & Weaver, 2001). Além disso, a melatonina regula directamente o núcleo supraquiasmático, através dos receptores MT₁ e MT₂ presentes no mesmo (Dubocovich & Markowska, 2005) (Reppert & Weaver, 2001). A ligação da melatonina aos receptores MT₁ e MT₂ do núcleo supraquiasmático leva a uma inibição da actividade eléctrica dos seus neurónios e, deste modo, a mudanças de fase dos ritmos circadianos (Hardeland, 2009) (Reppert & Weaver, 2001). Em ratos, a vasopressina libertada pelo núcleo supraquiasmático parece ter um papel ao nível do eixo hipotálamo-hipófise, levando a um aumento hormona adrenocorticotrófica (ACTH) que, posteriormente, estimula a glândula supra-renal a produzir cortisol. A flutuação dos níveis de cortisol é outra via de regular os relógios periféricos (Reppert & Weaver, 2001).

Em suma, o relógio central (NSQ) exerce uma sincronização directa sobre os relógios periféricos, através de sinais neuronais e regulação da síntese de hormonas, sendo a melatonina a mais estudada. Além disso, os relógios periféricos podem sofrer a influência de outros *Zeitgebers*, como a temperatura do corpo e alimentação (Rawashdeh & Maronde, 2012) (Seron-Ferre et al., 2007).

Assim como o núcleo supraquiasmático, os relógios periféricos exibem oscilações nos genes de relógio, “clock genes”, dos quais vão resultar produtos proteicos que vão ter um papel fundamental na geração e regulação dos ritmos circadianos (Seron-Ferre et al., 2007).

A explicação anterior permite ter uma visão geral do sistema de temporização circadiana e perceber onde se situa a melatonina, assim como a seu papel. Para além da sua acção na regulação do sistema circadiano, a melatonina parece levar ao início e/ou manutenção do sono, devido a acções directas em áreas do cérebro responsáveis pela regulação do sono (Doghramji, 2007) (Rawashdeh & Maronde, 2012).

O aumento dos níveis de melatonina é acompanhado de uma diminuição do sinal de alerta, importante no sono, mas também por um aumento da sedação, abaixamento da temperatura corporal central e uma redução da pressão arterial (Doghramji, 2007) (Harris, Burgess & Dawson, 2001) (Simko & Pechanova, 2009).

Em relação à redução da pressão arterial, nos últimos anos, têm sido realizados estudos em humanos (ensaios clínicos), que demonstraram que o uso prolongado de melatonina pode ser eficaz na redução da pressão arterial, em pessoas hipertensas. Além disso, verificou-se que um subconjunto das pessoas que sofrem de hipertensão apresenta perturbações na função do núcleo supraquiasmático, contudo, o mecanismo que está subjacente a esta acção ainda não foi desvendado (Simko & Pechanova, 2009).

Em relação ao papel termorregulador da melatonina, sabe-se que a diminuição da temperatura corporal está relacionada com o aumento dos níveis endógenos de melatonina durante a noite, no entanto, os mecanismos responsáveis por esta acção também ainda não foram compreendidos (Harris et al., 2001).

Enquanto outros ritmos, como a temperatura, podem ser mascarados por vários factores, a melatonina praticamente só é influenciada pela presença de luz. Pela razão apresentada, o ritmo circadiano da melatonina é considerado o melhor marcador de fase do relógio biológico endógeno (Cajochen, Krauchi & Wirz-Justice, 2003).

4.3. O uso de melatonina exógena na regulação do sono e do ritmo circadiano

Devido á capacidade da melatonina em modular o processo circadiano e o facto de apresentar efeitos hipnóticos directos, começou-se a estudar o uso da melatonina exógena no tratamento de diferentes distúrbios do sono relacionados com o ritmo circadiano, ou seja, causados por um desajuste do ciclo de sono-vigília, em relação ao ciclo claro-escuro (ex: trabalhos por turnos, “jet lag”), assim como, em outros distúrbios de sono (ex: insónia) (Cajochen et al., 2003) (Doghramji, 2007).

Apesar do grande número de ensaios clínicos e da popularidade da melatonina no tratamento dos distúrbios do sono, os resultados obtidos não são esclarecedores e o seu uso clínico permanece controverso (Doghramji, 2007). Os estudos apresentados, permitem dar uma noção da eficácia ou não da melatonina nos distúrbios de sono e são sobretudo meta-análises de ensaios clínicos, uma vez que são os estudos que apresentam uma maior robustez, ao nível de evidência científica, ou então ensaios clínicos, estudos

que se apresentam logo a seguir na hierarquização da evidência científica (Oxford Centre for Evidence-based Medicine, 2014). Em relação à dose de melatonina utilizada nos vários ensaios clínicos, esta variou entre 0,1 e 10 mg (Doghranji, 2007).

A análise da melatonina nos distúrbios do sono foi realizada, com base na seguinte classificação: pessoas com distúrbios primários do sono, pessoas com distúrbios secundários do sono e pessoas que sofrem de restrição de sono (Buscemi et al., 2004) (Buscemi et al., 2006) (Ferracioli-Oda, Qawasmi, & Bloch, 2013). Distúrbios primários do sono são distúrbios que não estão associados a uma condição médica, outra perturbação mental, ou à prescrição de medicamentos e outras substâncias (Ferracioli-Oda et al., 2013). Por outro lado, os distúrbios secundários do sono tratam-se de distúrbios associados a uma condição médica, neurológica ou ao consumo de medicamentos ou outras substâncias. Finalmente, a condição de restrição de sono está associada a alterações no sono pelo ritmo circadiano, pela condição de vida dos indivíduos (trabalhadores de turnos) e situação de jet lag (Buscemi et al., 2006).

Em relação aos distúrbios primários do sono, existem várias publicações como meta-análises, que confirmam a eficácia da melatonina exógena no tratamento destes distúrbios (Brzezinski et al., 2005) (Ferracioli-Oda et al., 2013). A meta-análise mais recente, realizada com 19 estudos e 1683 participantes (adultos e crianças), que apresentavam distúrbios primários do sono, demonstrou que as pessoas que tomaram melatonina melhoraram significativamente os parâmetros sono, comparativamente com as pessoas que receberam placebo. Os resultados estatísticos comprovaram uma melhoria dos parâmetros: latência do sono (intervalo de tempo desde do momento zero até á fase 2), tempo total de sono e qualidade do sono, nas pessoas que tomaram melatonina. Além disso, verificou-se que a diminuição da latência do sono e o aumento do tempo total de sono foram melhorados quando se aumentou a duração e a dose de melatonina. Este estudo também concluiu que os resultados obtidos com a melatonina, nos parâmetros do sono, em termos absolutos, foram inferiores aos obtidos em estudos anteriores, com tratamentos farmacológicos para a insónia (Ferracioli-Oda et al., 2013).

Por outro lado, uma meta-análise utilizando 16 estudos e 425 participantes, conclui que a melatonina usada num curto período de tempo (4 semanas ou menos), não é eficaz a tratar a maioria dos distúrbios primários do sono, embora haja alguma evidência que sugere que o seu uso é eficaz a tratar o síndrome de atraso na fase de sono, uma outra alteração dos padrões do ciclo sono-vigília (Buscemi et al., 2005). Essas mesmas conclusões foram reportadas por uma meta-análise baseada em 139

publicações, realizada pela Agency for Healthcare Research and Quality (AHRQ) (Buscemi et al., 2004).

Em relação aos distúrbios secundários do sono, os estudos continuam a ter como grande limitação a duração. Os resultados sugerem que a melatonina não demonstra eficácia, quando utilizada a curto prazo, em situações de distúrbios secundários (Buscemi et al., 2004). No entanto, em patologias em que os níveis endógenos desta hormona se apresentem diminuídos, a utilização da melatonina exógena pode ser benéfica na qualidade e duração do sono (Buck, 2003). Em relação a distúrbios do sono associados a indivíduos com problemas neurológicos, uma meta-análise revelou que a melatonina diminuiu a latência do sono, bem como um aumento no tempo total do sono e reduziu o número de vezes que o indivíduo acordou, por noite (Braam et al., 2009).

Apesar de controverso, existe muita evidência que sugere que a melatonina pode ajudar a prevenir e a tratar o “jet lag”, adequando o sono à exposição à luz. Tanto em estudos realizados em ratos, como em humanos, a administração de uma dose diária de melatonina, entre 0,5 a 5mg, demonstrou actividade na readaptação do ritmo circadiano e indução do sono (Srinivasan, Spence, Pandi-Perumal, Trakht, & Cardinali, 2008).

O “jet lag” é um fenómeno que ocorre quando se viaja através de vários fusos horários, sem a devida capacidade de adaptação do nosso sistema de temporização circadiano aos mesmos e que se caracteriza por um conjunto de sintomas, como, alterações no ciclo sono-vigília, fadiga durante o dia, perda de apetite, redução das capacidades cognitivas (Srinivasan et al., 2010).

No primeiro estudo controlado com placebo, administrou-se aos passageiros que iam atravessar diferentes fusos horários, uma dose de 5 mg, três dias antes e quatro dias depois, à noite. Neste estudo, tanto as medições subjectivas (sintomas de “jet lag” e parâmetros de sono), como medições objectivas dos níveis de cortisol e da melatonina endógena foram restabelecidos mais rapidamente no grupo tratado com a hormona (Arendt, Aldhous & Marks, 1986). Posteriormente, uma meta-análise de 10 ensaios realizados com a melatonina, concluiu que a administração da melatonina entre 0,5 a 5 mg era eficaz nos distúrbios do “jet lag” (Brown et al., 2009). Pelo facto de muitas publicações terem demonstrado que a administração oral de melatonina (0,5 a 5 mg) contribui para a redução dos sintomas de “jet lag”, ela tem sido utilizada por muitos médicos como um tratamento farmacológico (Srinivasan et al., 2010).

Contudo, há quem se oponha ao seu uso, devido à evidência que existe contraditória à sua eficácia. Um exemplo dessa evidência é uma meta-análise realizada

pela AHRQ, que não conclui a eficácia da utilização de melatonina em distúrbios de sono relacionados com o “jet lag” e trabalhadores de turnos (Buscemi et al., 2004) (Doghramji, 2007).

Num aspecto, os vários estudos estiveram em sintonia, concluindo que a melatonina parece ser segura na população, nas doses e período estudados. Além disso, apresenta um baixo potencial de dependência, assim como poucos efeitos adversos, sendo os mais comuns: sonolência, náuseas, dor de cabeça, tontura (Buscemi et al., 2004) (Ferracioli-Oda et al., 2013). Os estudos que demonstraram eficácia da melatonina nos distúrbios do sono e que defendem o seu uso na prática clínica realçam estas características, como uma vantagem em relação aos outros medicamentos utilizados, como as benzodiazepinas (Ferracioli-Oda et al., 2013).

Apesar de alguns estudos questionarem a sua eficácia, a melatonina tem vindo a ser utilizada nas últimas duas décadas, para tratar alguns distúrbios de sono, sendo classificada pela FDA como suplemento alimentar. Em Portugal, o Infarmed classifica a melatonina como suplemento alimentar, quando o seu teor se encontra abaixo do 2mg e como medicamento, quando o seu teor é igual ou superior a 2 mg (Bragança, 2012) (Doghramji, 2007).

Hoje em dia, também são estudados agonistas da melatonina (ex: Ramelteon, agomelatina, LY 156735, Tasimelteon), no tratamento da insónia e distúrbios de sono relacionados com o ritmo circadiano (Brown et al., 2009) (Rawashdeh & Maronde, 2012). A utilização de compostos agonistas da melatonina está relacionada com a maior selectividade que estes apresentam para os receptores MT₁ e MT₂, tendo também uma maior duração da acção (Doghramji, 2007) (Srinivasan et al., 2010). Em 2005, o Ramelteon foi aprovado como medicamento, nos Estado Unidos, para o tratamento da insónia, particularmente a insónia inicial, sendo o único deste grupo a ser comercializado (Doghramji, 2007) (Liu & Wang, 2012). Esta substância actua, ao nível cerebral, nos receptores MT₁ e MT₂, e demonstrou eficácia na redução da latência do sono e aumento dos períodos de sono, sendo a dose recomenda de um comprimido de 8 mg uma vez por dia, 30 minutos antes de ir para a cama (Cavadas & Ribeiro, 2011) (Doghramji, 2007) (Takeda Pharmaceuticals North America, 2014). Assim como a melatonina, o Ramelteon não parece desenvolver tolerância e apresenta poucos efeitos adversos, no entanto ainda não se encontra disponível em Portugal, estando a sua utilização restrita aos EUA e Japão (Cavadas & Ribeiro, 2011).

Nas crianças e adolescentes, a suplementação de melatonina exógena tem sido utilizada, sobretudo em distúrbios sono, associados a patologias, como o Autismo, Síndrome de X-Frágil, Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperactividade, havendo várias publicações que comprovam a sua eficácia nas mesmas (Sánchez-Barceló, Mediavilla & Reiter, 2011) (Wirojatan et al., 2009). Analisando alguns estudos, pode-se concluir que anormalidades na produção, metabolismo, e nos receptores da melatonina têm sido relacionadas com estas patologias, surgindo daí a justificação e necessidade de repor esta hormona, nestas populações especiais (Hastings & Felt, 2012) (Melke et al., 2008) (Wirojatan et al., 2009).

Em crianças e adolescentes, aparentemente saudáveis, mas que dormem mal, ou seja, tenham dificuldade a iniciar ou a manter o sono deve-se, em primeiro lugar, mudar os comportamentos e hábitos, promovendo uma boa educação e higiene do sono (Cummings, 2012). Na grande maioria dos casos, existe uma etiologia controlável, e a educação e a higiene do sono, assim outros tratamentos não-farmacológicos, como a terapia cognitivo-comportamental, a terapia de controlo de estímulos, a terapia de restrição, a intervenção paradoxal, a terapia de relaxamento e a consolidação do sono, conseguem resolver (Tabela 1) (Buscemi et al., 2005) (Cavadas & Ribeiro, 2011). Apesar da segurança e eficácia demonstradas em ensaios clínicos, realizados nestas faixas etárias, a melatonina só deve ser considerada como uma opção, numa situação de insónia crónica, quando as medidas não farmacológicas se mostram ineficazes e após uma avaliação do médico (Buck, 2003) (Cummings, 2012) (Hastings & Felt, 2012) (Smits et al., 2003). Mais uma vez, a utilização de melatonina exógena só faz sentido em crianças que apresentem um comprometimento na produção da melatonina, secreção ou na sua ligação ao NSQ, que se traduz em distúrbios crónicos e que afectam tanto o início como a duração do sono (Buck, 2003).

As medidas não-farmacológicas mencionadas anteriormente, são válidas para todos distúrbios do sono nos adultos, especialmente para a insónia (Buscemi et al., 2005) (Cavadas & Ribeiro, 2011) (Dowson, Moore & Tinney, 2008).

A insónia secundária é o distúrbio de sono mais frequente nos adultos, sendo a sua prevalência muito superior à insónia primária e estando a sua incidência a aumentar. Apresenta causas diversas, que vão desde de doenças, medicação, álcool, cafeína, a causas ambientais. Vários ensaios têm comprovado a eficácia do tratamento não-farmacológico nos parâmetros do sono, além disso, quando associados ao tratamento farmacológico específico (benzodiazepinas e agonistas dos receptores das

benzodiazepinas), provocam um efeito mais duradouro que a terapêutica farmacológica isolada (Cavadas & Ribeiro, 2011) (Dowson et al., 2008).

Tabela 1-Tratamento não farmacológico da insónia (adaptado de (Cavadas & Ribeiro, 2011))

Terapia cognitivo-comportamental	<ul style="list-style-type: none"> • Desmistificar as expectativas irrealistas sono (por exemplo, <i>Preciso de nove horas de sono por noite</i>) • Desmistificar sobre as causas da insónia (por exemplo, <i>eu tenho um desequilíbrio químico que provoca a minha insónia</i>) • Ampliar as consequências (por exemplo, <i>Eu não posso fazer nada após uma má noite de sono</i>) • Melhorar a ansiedade e perda de controlo sobre a capacidade de dormir (por exemplo, <i>Eu tenho medo de perder o controle sobre a minha capacidade de dormir</i>)
Educação e higiene do sono	<ul style="list-style-type: none"> • Informar o paciente sobre o sono normal (cada paciente tem o seu sono particular): tipos de sono, funções, duração e variação ao longo do ciclo da vida. • Evitar olhar constantemente para as horas ao deitar • Evitar excesso de líquidos ou refeições pesadas à noite • Evitar cafeína, nicotina e álcool quatro a seis horas antes de ir para a cama, e minimizar o seu uso diário • Manter um ambiente calmo, escuro, seguro e confortável no quarto quando se for deitar. Evitar um ambiente ruidoso, com luz e temperatura adequada durante o sono • Deitar e acordar todos os dias à mesma hora (± 30 min), incluindo fins-de-semana • Evitar exercício vigoroso três a quatro horas antes de se deitar • Evitar dormir durante o dia
Terapia de Controlo de estímulo	<ul style="list-style-type: none"> • Usar a cama só para dormir e para a actividade sexual • Evitar actividades que o despertem antes de ir dormir, como fazer telefonemas à noite, trabalhar ou ver televisão • Ir para a cama apenas quando sentir sono • Se não for capaz de adormecer após quinze a vinte minutos, deve-se levantar e ir para outra parte da casa, ler ou fazer tarefas calmas e voltar para a cama só quando sentir sono • Colocar o alarme para despertar à mesma hora todos os dias incluindo fim-de-semana
Terapia de Restrição do sono	<ul style="list-style-type: none"> • Reduzir o tempo na cama à quantidade total de sono actual • Aumentar quinze minutos o tempo na cama, todas as semanas, quando a eficiência do sono for, pelo menos, 90%.
Intenção paradoxal	<ul style="list-style-type: none"> • Manter-se acordado o maior tempo possível até começar a sentir vontade de dormir, respeitando a higiene do sono
Terapias de relaxamento	<ul style="list-style-type: none"> • Treinar o relaxamento muscular progressivo • Biofeedback • Meditação • Exercícios leves/alongamentos • Respiração profunda
Consolidação do sono	<ul style="list-style-type: none"> • Deve ter uma hora fixa de deitar e acordar • Deve ser determinada a média de tempo total de sono • O tempo mínimo de sono não deve ser inferior a 5 horas

5. A melatonina como antioxidante

Esta acção da melatonina foi descoberta em 1993, quando se verificou que a mesma tinha a capacidade de eliminar, fortemente, o radical hidroxilo (OH^\bullet) (Tan, Chen, Poeggeler, Manchester, & Reiter, 1993). Poucos anos depois e envolvendo alguns dos investigadores responsáveis pela descoberta anterior, chegou-se a uma nova descoberta, não menos interessante. Descobriu-se um novo metabolito, chamado de 3-hidroxi-melatonina cíclica, resultante da reacção da melatonina com o radical OH^\bullet . Este metabolito final, foi formado e identificado, tanto em sistemas *in vitro*, como extraído das análises de urina de ratos e humanos. Assim como a melatonina endógena, a 3-hidroxi-melatonina cíclica ($\text{c}_3\text{-OHM}$) também apresenta capacidade de neutralizar os radicais livres (Reiter, Tan, Mayo, Sainz, & Leon, 2003) (Tan et al., 1998).

Hoje sabe-se que esta capacidade não se limita ao radical hidroxilo, sendo capaz de neutralizar muitos outros radicais livres (Reiter, Paredes, Manchester, & Tan, 2009).

Posteriormente, verificou-se que $\text{c}_3\text{-OHM}$ ao neutralizar os radicais tóxicos, dá origem a um novo metabolito chamado de $\text{N}^1\text{-acetil-N}^2\text{-formil-5-metoxiquinuramina}$ (AFMK). O AFMK também apresenta uma elevada capacidade em eliminar os radicais livres, e quando reage com os mesmos, origina o $\text{N}^1\text{-acetil-5-metoxiquinuramina}$ (AMK). O AMK para além de neutralizar radicais livres tem apresentando acções importantes, envolvendo a ciclooxigenase, óxido nítrico e o metabolismo mitocondrial (Hardeland et al., 2009). Deste modo, a melatonina acaba por funcionar como pró-fármaco, uma vez que os seus metabolitos têm acções tais como a própria hormona (Reiter, Paredes, et al., 2009). Apesar de ter sido em sistemas químicos e não em condições fisiológicas, verificou-se que uma única molécula de melatonina consegue eliminar colectivamente 10 produtos radicalares (Reiter, Paredes, et al., 2009) (Srinivasan et al., 2011).

Pelo facto da capacidade em neutralizar o oxigénio e os reagentes à base de azoto não pertencer só à melatonina, mas também aos seus metabolitos gerados, assiste-se a uma maior protecção das células perante o stress oxidativo (Reiter, Paredes, et al., 2009) (Zhang & Zhang, 2014). A esta sequência é designada de cascata antioxidante da melatonina, a qual encontra-se ilustrada na Figura 8 (Reiter, Paredes, et al., 2009).

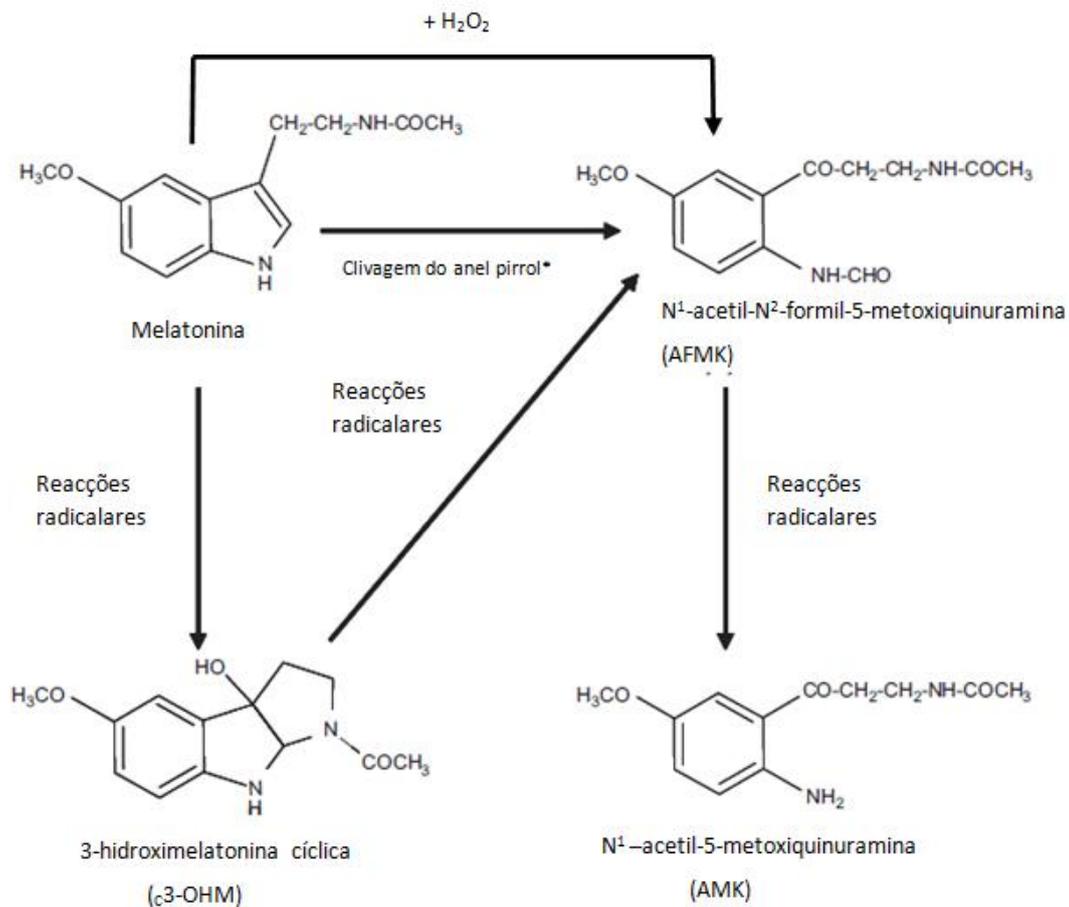


Figura 8 - Cascata antioxidante da melatonina. Quando a melatonina interage com radicais origina 3-hidroxi-melatonina cíclica (c_3 -OHM) e N^1 -acetil- N^2 -formil-5-metoxiquinuramina (AFMK). Posteriormente forma-se N^1 -acetil-5-metoxiquinuramina (AMK), que assim como os seus precursores têm a capacidade de neutralizar radicais tóxicos (adaptado de (Reiter, Paredes, et al., 2009)). Tan et al. descreveram ainda uma nova via metabólica de formação de AFMK, a partir da interacção da melatonina com o H_2O_2 , que é um precursor de $OH\cdot$. Caso esta reacção ocorra in vivo, pode ser um mecanismo complementar á acção das enzimas glutationa peroxidase e catalase na eliminação do H_2O_2 intracelular (Tan et al., 2000)

É sobretudo na mitocôndria, durante a fosforilação oxidativa que envolve uma cadeia de transporte de electrões, que alguns electrões se perdem e vão reduzir o oxigénio molecular, formando espécies reactivas de oxigénio (ROS) e espécies reactivas de nitrogénio (RNS). Estas espécies reactivas são radicais livres e reagentes tóxicos capazes de provocar danos no ADN, mas também em lípidos, proteínas e genes neuronais e mitocondriais (Lee et al., 2013) (Reiter et al., 2003).

A Figura 9 mostra como a partir da redução de O_2 , se pode formar espécies reactivas radicalares de oxigénio, à base de azoto e não radicalares, que estão na origem do stress oxidativo em células e tecidos (Reiter, Paredes, et al., 2009).

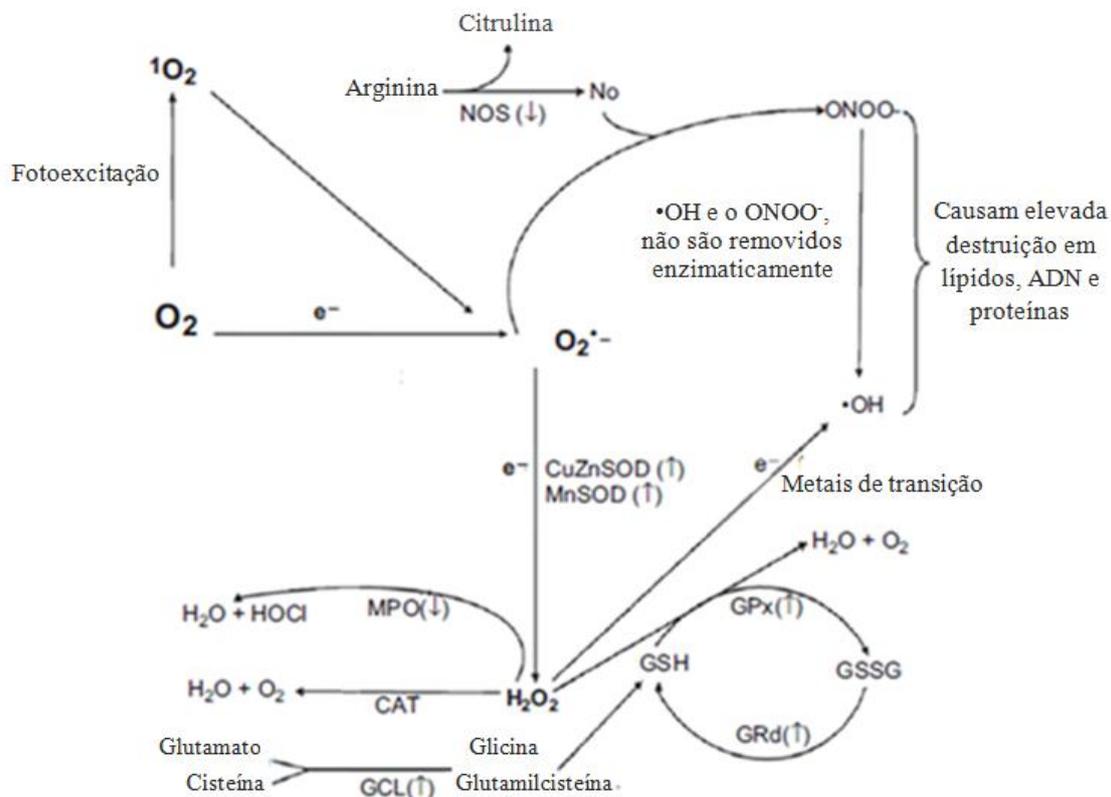


Figura 9 – A redução química do O_2 e a formação de ROS/RNS. A presente figura mostra os vários metabolitos que se formam a partir de um precursor comum que é o O_2 , assim como as várias enzimas envolvidas. Sendo que, as enzimas antioxidantes têm a sua acção aumentada na presença de melatonina, e as pro-oxidantes, a sua acção diminuída, representado por \uparrow e \downarrow , respectivamente. Destacam-se pelo seu elevado grau de toxicidade, assim como a sua difícil eliminação, o radical $\cdot OH$ e $ONOO\cdot$. As diferentes siglas correspondem: CuZnSOD = superóxido dismutase de cobre/zinco; MnSOD = superóxido dismutase de magnésio; GPx = glutathione peroxidase; GRd, glutathione reductase; GSH = glutathione reduzida; GSSG = glutathione oxidada; NOS = óxido nítrico sintase; CAT = catalase; GCL = glutamato-cisteína ligase; MPO = mieloperoxidase (adaptado de (Reiter, Paredes, et al., 2009))

Até à data, podemos definir 4 vias para explicar o papel antioxidante da melatonina. Duas já foram referidas anteriormente, e dizem respeito à sua capacidade em neutralizar directamente ROS & RNS e o seu efeito sobre as enzimas, aumentando a acção das antioxidantes (CAT, SOD e GPx) e diminuindo a acção das pro-oxidantes (Figura 9). Além disso, conseguem aumentar a eficácia de outros agentes antioxidantes,

e diminuir a perdas de electrões durante a fosforilação oxidativa, responsáveis pela formação de ROS & RNS (Reiter, Paredes, et al., 2009) (Reiter, Tan, et al., 2009). Deste modo, podemos dizer que a melatonina tem acções antioxidantes directas e indirectas (Reiter et al., 2003) (Vielma et al., 2014). Em relação aos mecanismos subjacentes a estas acções, pensa-se que as acções antioxidantes directas, sobre as espécies radicalares, não são mediadas por receptores, enquanto que as acções sobre as enzimas envolvem receptores de membrana ou outros locais de ligação da melatonina, no núcleo ou no citosol (Reiter, Tan, et al., 2009).

Hoje em dia, encontram-se disponíveis mais de 1000 publicações que confirmam a capacidade da melatonina, assim como dos seus metabolitos, em reduzir o stress oxidativo/nitrosativo *in vivo*, e utilizando concentrações, tanto fisiológicas, como farmacológicas (Reiter, Paredes, et al., 2009) (Reiter, Tan, et al., 2009) (Zhang & Zhang, 2014).

5.1. Relação entre mitocôndria, papel antioxidante e doenças neurodegenerativas

Um organito celular que merece especial atenção é a mitocôndria, uma vez que é onde se formam mais radicais livres endogenamente e porque, hoje sabe-se que, deficiências na cadeia de electrões podem levar a doenças relacionadas com a mitocôndria. Ou seja, a incorreta função da mitocôndria tem sido associada a algumas doenças neurodegenerativas como, Parkinson, Alzheimer, Huntington, Esclerose Múltipla, Ataxia de Friedreich e outras como diabetes, doenças cardiovasculares, desordens psiquiátricas (Calabrese et al., 2005) (Peschke, 2008) (Reiter et al., 2003) (Srinivasan et al., 2011). No caso das doenças cardiovasculares, um factor de risco importante é a hipertensão arterial. Para além da capacidade em diminuir a pressão arterial, verificada anteriormente, a melatonina através da sua acção antioxidante apresenta aqui outro mecanismo para explicar o seu efeito anti-hipertensor. Além disso, a melatonina pode exercer efeitos vasodilatadores e hipotensores pela preservação da função endotelial e pelo aumento da produção e diminuição da degradação de óxido nítrico (Simko & Pechanova, 2009).

Alterações hereditárias e adquirida parecem levar ao mau funcionamento da cadeia transportadora de electrões, que por sua vez leva a um aumento das espécies

reactivas de oxigénio e nitrogénio (ROS & RNS) e alterações dos níveis fisiológicos do cálcio. Estes acontecimentos levam à abertura do poro de permeabilidade transitória mitocondrial (MPTP), assim como a danos na mitocôndria ao nível do ADN, lípidos e proteínas, diminuindo deste modo, a função da mesma, podendo terminar em morte celular por apoptose (Calabrese et al., 2005) (Srinivasan et al., 2011). Estas alterações na cadeia transportadora de electrões (ETC)/ processo de fosforilação oxidativa (OXPHOS), assim como o mau funcionamento de enzimas do ciclo de Krebs e alterações na produção de ATP, têm sido apontadas como as principais causas de disfunção da mitocôndria e têm sido associadas a patogénese de várias doenças neurodegenerativas, assim como, factores causais do processo de envelhecimento, eventos de isquémia/reperfusão, entre outros (Srinivasan et al., 2011).

Através de experiências *in vivo* e *in vitro*, sabe-se hoje que a melatonina exerce um papel de protecção na mitocôndria, através de um enorme leque de mecanismos. Entre eles, está o aumento da actividade de enzimas como, a superóxido dismutase e glutathione peroxidase; a acção directa na neutralização dos ROS & RNS; regulação da expressão de genes mitocondriais; estabilização da membrana interna (local onde ocorre a fosforilação oxidativa), regulação directa do poro de permeabilidade transitória mitocondrial (MPTP) e aumento do rendimento da cadeia transportadora de electrões, e como tal, de ATP e da respiração aeróbia. Estas acções da melatonina contribuem não só para proteger este metabolito do dano oxidativo, mas também para aumentar o rendimento do mesmo (Zhang & Zhang, 2014). Além disso, tem-se referido a mitocôndria como um dos maiores alvos da melatonina (Reiter et al., 2003) (Wang, 2009) (Zhang & Zhang, 2014). Esta afirmação assenta no facto das concentrações encontradas serem mais elevadas neste local, comparativamente com outras partes da célula, e maiores do que as concentrações séricas de melatonina (Reiter et al., 2003) (Zhang & Zhang, 2014).

5.2. O papel antioxidante: Uma ponte para a neuroprotecção

Para além da acção benéfica, tanto na protecção, como na função da mitocôndria e da actividade antioxidante sobre espécies reactivas de oxigénio/nitrogénio, a melatonina tem demonstrado outras acções neuroprotectoras como: redução da inflamação, preservação da organização do citoesqueleto neuronal e actividade anti-apoptótica

(Cervantes, Morali, & Letechipía-Vallejo, 2008). Estudos recentes têm demonstrado que a progressão das doenças neurodegenerativas envolve a activação de proteínas, denominadas Caspases e está directa ou indirectamente relacionado com a apoptose (Vickers, Gonza & Wolan, 2014). Pelo facto de a morte neuronal, por apoptose, ser um recurso comum da maioria das doenças neurodegenerativas, realçou-se aqui a actividade anti-apoptótica da melatonina, em detrimento das demais acções neuroprotectoras (Friedlander, 2003) (Wang, 2009).

Estudos recentes têm demonstrado que a melatonina inibe a via intrínseca da apoptose, na mitocôndria (Wang, 2009). Além disso, tem-se sugerido que o valor terapêutico da melatonina em doenças neurodegenerativas, como Parkinson, Alzheimer e Doença de Huntington, deve-se à sua capacidade em inibir a apoptose, activando os mecanismos sobrevivência da célula (Srinivasan et al., 2011) (Wang, 2009).

Estes resultados relativos à actividade anti-apoptótica da melatonina são sobretudo importantes ao nível do sistema nervoso central. O cérebro, pela quantidade de energia (ATP) que necessita e pelo facto de consumir 20% do oxigénio da nossa respiração, está muito exposto ao stress oxidativo/nitrosativo, tornando-o um dos mais predispostos ao envelhecimento, assim como muitas doenças neurodegenerativas. Além disso, contribui para essa vulnerabilidade, a inexistência de regeneração neuronal e o facto de apresentar uma grande quantidade de fosfolípidos com ácidos gordos poliinsaturados, que facilmente se oxidam e dão origem a radicais livres (Cervantes et al., 2008) (Lee et al., 2013).

Na doença de Alzheimer, a melatonina demonstrou ter capacidade em inibir o aparecimento de anomalias nas células neuronais, em humanos. Para além disso, verificou-se que, nesta doença, os níveis de secreção desta hormona encontram-se diminuídos, provocando alterações no ritmo circadiano. Pensa-se que esta diminuição acontece devido a uma degeneração da retina, no núcleo supraquiasmático ou na glândula pineal (Kostoglou-Athanassiou, 2013).

Pode-se ainda encontrar na melatonina duas características únicas e que não foram encontradas noutros antioxidantes. A primeira diz respeito ao facto de ser selectivamente absorvida pelas membranas das mitocôndrias (Srinivasan et al., 2011). A segunda refere-se à presença de uma cascata antioxidante que actua de forma sinérgica na neutralização de radicais livres, podendo ser uma vantagem em relação a outros antioxidantes neuroprotectores (Cervantes et al., 2008) (Zhang & Zhang, 2014).

A eficácia associada a uma baixa toxicidade, em humanos, animais e células cultivadas, tem apontado a melatonina como um instrumento terapêutico para várias doenças associadas à disfunção da mitocôndria, contudo, são necessários mais estudos, sobretudo controlados com placebos, para comprovar o valor terapêutico desta molécula nestas doenças (Srinivasan et al., 2011) (Wang, 2009).

5.3. Stress oxidativo: outras implicações

O stress oxidativo e a apoptose causados pela acumulação de produtos tóxicos também contribuem para a imunossenescência. Assim como nas doenças neurodegenerativas, a idade constitui um factor causal, levando neste caso a uma deterioração do sistema imunitário. A imunossenescência corresponde a uma diminuição da capacidade funcional de células *natural killer*, granulócitos e macrófagos, aumentando deste modo a vulnerabilidade a infecções, doenças auto-imunes e cancro (Espino, Pariente, & Rodríguez, 2012). Para além da capacidade anti-apoptótica e antioxidante, referidas anteriormente, a melatonina parece inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-8 e TNF α , podendo ajudar a reduzir a inflamação aguda e crónica. Pelas acções benéficas que a melatonina apresenta no sistema imunológico, tem-se também equacionado a sua suplementação de modo a prevenir ou retardar a deterioração funcional que existe associada à idade (Espino et al., 2012) (Vielma et al., 2014).

A capacidade da melatonina em diminuir o stress oxidativo tem demonstrado ser extremamente importante na fisiologia do sistema reprodutor feminino, sobretudo ao nível do ovário. Além disso, contribui também para acções benéficas ao nível das gónadas masculinas (Reiter et al., 2013) (Reiter, Tan, et al., 2009) (Tamura et al., 2008).

Há muito tempo que se associa a melatonina produzida na glândula pineal à fisiologia dos ovários, devido à sua acção ao nível do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal, afectando em parte, a secreção das gonadotrofinas (hormona folículo-estimulante-FSH e hormona luteinizante-LH) (Bellastella, Bellis, Bellastella, & Esposito, 2014). Além disso, nas últimas duas décadas, descobriu-se que a melatonina, pela diminuição do stress oxidativo no ovário, contribui para acções como: desenvolvimento folicular, promoção da maturação ovocitária, preservação da integridade do óvulo, antes e no momento da ovulação e finalmente, desenvolvimento

embrionário (Reiter et al., 2013) (Reiter, Tan, et al., 2009) (Tamura et al., 2012) (Tamura, Takasaki, & Taketani, 2013). Estas acções são mediadas, quer pela melatonina produzida pela glândula pineal, como pela produzida pelo ovário nas células da granulosa (Reiter et al., 2013) (Tamura et al., 2013).

A Figura 10 permite dar uma ideia das múltiplas acções da melatonina ao nível do folículo ovárico (Reiter et al., 2013). Durante o processo de ovulação, os macrófagos, leucócitos e células endoteliais vasculares do folículo contribuem para o aumento das espécies reactivas, sobretudo de oxigénio (ROS), as quais têm uma acção fisiológica durante a ruptura do folículo (Reiter et al., 2013) (Tamura et al., 2012) (Tamura et al., 2013). Contudo, quantidades em excesso de ROS podem levar ao stress oxidativo, que pode comprometer a qualidade dos ovócitos e condicionar o processo de luteinização das células da granulosa, podendo resultar, em último caso, em infertilidade (Tamura et al., 2012) (Tamura et al., 2013). A melatonina assume um papel importante, protegendo o óvulo (ovócito II), que se liberta do dano oxidativo, contribuindo para a formação de um embrião e feto saudável (Reiter et al., 2013).

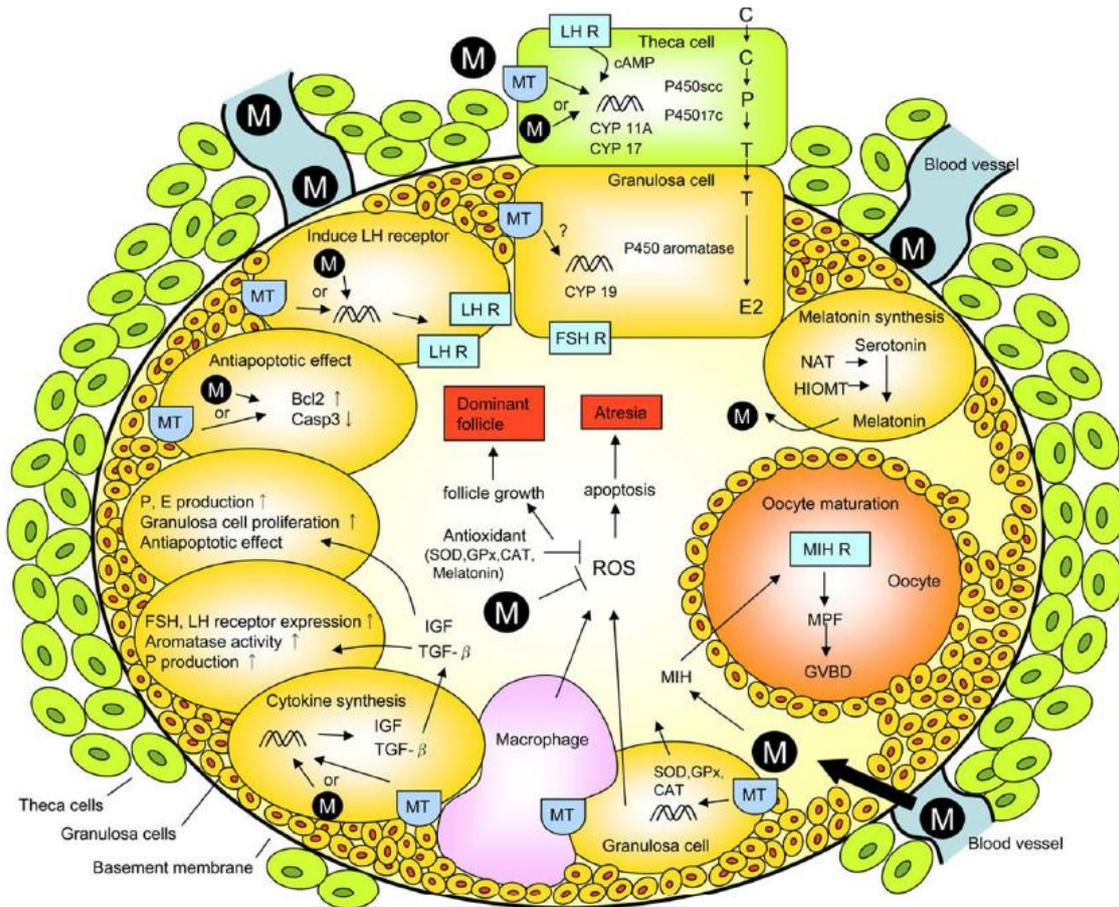


Figura 10 - As várias funções da melatonina (M), nas células do folículo ovárico, especialmente no ovócito (óvulo) e nas células da granulosa. A melatonina presente no fluido folicular, tanto provém da síntese pelas células da granulosa, como da corrente sanguínea. C, colesterol; LH R, receptor LH; FSH R, receptor de FSH; MIH, hormona indutora da maturação; MPF, factor promotor da maturação; GVBD, quebra da vesícula germinativa; IGF, factor de crescimento semelhante à insulina; TGF-β, factor de crescimento e transformação-beta (adaptado de (Reiter et al., 2013))

A própria gravidez contribui para o aumento do dano oxidativo e deste modo, as ações da melatonina na protecção feto, placenta e na mãe, associadas à sua segurança durante toda a gravidez, podem trazer um enorme potencial de aplicações. Ensaios clínicos feitos até ao momento têm demonstrado segurança, mesmo em doses elevadas, e eficácia, pelo facto da melatonina ter levado a uma diminuição da severidade da pré-eclâmpsia, uma condição do stress oxidativo, sendo este considerado o principal distúrbio nas grávidas, caracterizando-se por um aumento dos valores da tensão arterial (hipertensão), proteinúria e edema. Além disso, a melatonina também demonstrou uma diminuição das lesões provocadas pelos episódios de isquémia-reperusão no feto e

placenta. Estudos têm também revelado que mulheres com pré-eclâmpsia grave têm níveis de melatonina significativamente mais baixos, do que as mulheres com pré-eclâmpsia leve ou sem esta condição (Reiter, Tan, et al., 2009) (Tamura et al., 2008).

Além disso, alguns ensaios clínicos têm demonstrado benefícios da melatonina em mulheres inférteis, pelo facto de diminuir o dano oxidativo no folículo aumentando, deste modo, as taxas de fertilização e gravidez (Tamura et al., 2013) (Reiter, Tan, et al., 2009). Finalmente, estudos com mulheres tratadas com melatonina (3 mg/dia), também permitiram aumentar as taxas de sucesso de implantação e fertilização, na técnica de fertilização *in vitro* (FIV). Serão necessários mais estudos para comprovar a eficácia da melatonina e o seu uso no tratamento de mulheres submetidas a este procedimento, mas caso a sua utilidade se confirme, irá ajudar a ultrapassar algumas barreiras desta técnica, como o insucesso e o custo (Reiter et al., 2013) (Reiter, Tan, et al., 2009).

O stress oxidativo também contribui para a senescência da cartilagem, aumentando o risco de osteoartrite (Yudoh, Trieu, Nakamura, Hongo-masuko, & Kato, 2005). Ultimamente, verificou-se em estudos *in vivo*, que o uso de melatonina exógena contribui para o aumento da espessura da cartilagem articular e além disso, leva a um aumento da densidade mineral óssea. Estes efeitos têm sido associados ao papel antioxidante da melatonina e possibilitam outra potencial utilização da hormona, em doenças osteoarticulares, sobretudo em mulheres na menopausa (Rodrigues et al., 2014).

Como se verificou, a melatonina tem a capacidade de neutralizar radicais livres, exercendo logo aqui um papel crucial na protecção do ADN, contra os danos oxidativos causados pelos mesmos (Sliwinski et al., 2007). Os radicais livres têm a capacidade de interagir com membranas, proteínas, e ácidos nucleicos e muitas vezes os sistemas endógenos de defesa, como a superóxido dismutase, glutathione peroxidase e catalase, não conseguindo no entanto evitar lesões provocadas pelos mesmos no ADN. Em algumas situações, estas lesões acabam por iniciar um processo de carcinogénese (Cerutti, Ghosh, Oya, & Amstad, 1994).

Estudos têm demonstrado que a melatonina, para além de evitar as lesões provocadas pelos radicais livres, estimula e acelera a reparação das mesmas no ADN, no entanto, o mecanismo de reparação envolvido ainda não está descrito (Sliwinski et al., 2007). A acção antioxidante é considerada um mecanismo plausível para explicar o papel oncostático da melatonina, contudo, outros mecanismos têm sido mencionados para justificar esta actividade, como seguidamente será demonstrado.

6. A melatonina na inibição do cancro

Cohen et al. foram os primeiros a postular a hipótese de que a função pineal diminuída podia levar ao desenvolvimento de cancro de mama humano (Blask et al., 2005) (Cos & Sánchez-Barceló, 2000). Embora aqui se fale sobretudo na melatonina na inibição da progressão de tumores já estabelecidos, pelo facto de ser onde existe maior evidência científica, nos últimos anos têm surgido publicações que demonstram que a melatonina também pode reduzir a incidência e o crescimento de tumores (Reiter, 2004).

Esta capacidade de inibir a progressão dos tumores assenta, sobretudo, em três acções da melatonina. A sua acção antiproliferativa sobre as células tumorais, é a mais evidenciada, envolvendo mecanismo dependentes e/ou independentes de receptores. Dependendo do tipo de cancro, nomeadamente da origem do tecido tumoral, a antiproliferação induzida pela melatonina actua por um mecanismo específico. Por exemplo, no cancro da mama, no hepatoma ou no melanoma, esta acção anticancerígena é amplamente mediada pelo receptor MT_1 , enquanto que num glioma, a acção antioxidante da melatonina tem um papel mais importante na antiproliferação (Shiu, 2007). Para além da actividade antiproliferativa demonstrada pela melatonina, esta apresenta a capacidade de induzir a apoptose em muitas células cancerígenas (Sainz et al., 2003).

Para além disso, a melatonina parece também inibir a disseminação e a formação de novas lesões tumorais, ou seja, metástases. Esta acção pode ser explicada pela capacidade da mesma em aumentar a produção de moléculas de adesão na superfície celular. Especificamente, na linha de células do cancro da mama MCF-7, a hormona diminui a migração e a invasão pelo aumento a expressão de duas proteínas de adesão da superfície celular, a E-caderina e a integrina- $\beta 1$ (Cos & Sánchez-Barceló, 2000). Outro modo de inibir a invasão de células cancerígenas e formação de metástases consiste em evitar a quebra da matriz intracelular, ou seja, através da estimulação da proteína cinase associada a Rho (ROCK), a melatonina regula a dinâmica do citoesqueleto, levando a uma maior fixação das células (Ortíz-López, Morales-Mulia, Ramírez-Rodríguez, & Benítez-King, 2009).

Apesar da melatonina exibir propriedades oncostáticas, actuando como agente antiproliferativo, inibidor das metástases e indutor da apoptose, por outro lado, o mecanismo de acção real, que explica a sua actividade anti-tumoral, ainda não foi

compreendido. Após a realização de ensaios pré-clínicos, vários mecanismos têm sido apresentados (Jung & Ahmad, 2006) (Leon-Blanco et al., 2003).

Vários estudos têm apontado a inibição da absorção ácido linoleico como um possível mecanismo, pelo qual a melatonina inibe a proliferação de células tumorais (Blask et al., 2005) (Blask et al., 2014) (Dauchy et al., 2009). O ácido linoleico é um ácido gordo poliinsaturado essencial, do tipo ómega-6, largamente consumido na dieta ocidental e considerado o principal ácido gordo promotor da proliferação celular maligna. Em muitos tumores, sobretudo os que envolvem carcinogénese mamária, há uma entrada de ácido linoleico nas células tumorais, através de um transportador de ácidos gordos específico, dependente de cAMP (Blask et al., 2014).

Num dos estudo que permitiu chegar a uma explicação biológica racional para o aumento do risco de cancro da mama, em trabalhadores do sexo feminino, que faziam turnos de noite, foi possível verificar que a melatonina ao interagir com o receptor de membrana MT₁, inibia a adenilciclase e provocava uma redução da formação de cAMP. O resultado final foi o fecho do transportador de ácidos gordos e, como tal, um bloqueio da entrada de ácido linoleico para as células de cancro da mama MCF-7. Além disso, também se verificou que estímulos como a exposição à luz durante a escuridão e o aumento da idade, que contribuem para um decréscimo das concentrações fisiológicas de melatonina nocturna, podem promover o crescimento de células cancerígenas (Blask et al., 2005).

Em suma, quando os níveis de melatonina em circulação são baixos, sobretudo durante o dia, o ácido linoleico facilmente entra nas células tumorais, onde é oxidado pela 15-lipoxigenase dando origem ao agente mitótico, ácido 13-hidroxi-octadecadienoico (13-HODE). O passo seguinte é a activação da via MEK-ERK 1/2, o que leva a um aumento da proliferação celular e crescimento tumoral. Por outro lado, quando os níveis de melatonina no sangue são elevados, nomeadamente durante a noite, o ácido linoleico tem a sua absorção bloqueada, assim como o seu metabolismo (Blask et al., 2005) (Blask et al., 2014).

Um outro estudo demonstrou que, assim como a melatonina, o ácido eicosapentaenóico (EPA) e o ácido linoleico conjugado (CLA), parecem inibir o crescimento e o metabolismo de vários tumores de roedores e humanos, através do bloqueio da captação de ácido linoleico e produção do agente mitótico, 13-HODE. Na perfusão de células tumorais do cancro da mama (MCF-7), implantadas em ratos, com estas três substâncias em separado, verificou-se que ao fim de 5 minutos, tanto a

produção do ácido linoleico no tecido tumoral, como a produção de 13-HODE caíram para zero (Dauchy et al., 2006).

Resultados similares foram encontrados quando se utilizou uma suplementação de melatonina em células de leiomiossarcoma humano. Verificou-se que a administração, em ratos, de uma dose farmacológica de melatonina na água, a longo prazo, provocou inicialmente uma estabilização do tumor, seguida de uma regressão. Por outro lado, uma dose fisiológica de melatonina, administrada durante um curto espaço de tempo, levou a uma diminuição da proliferação tumoral. Os resultados deste estudo comprovaram, mais uma vez, que os efeitos inibitórios, a curto e longo prazo da melatonina, envolveram o mecanismo da absorção/metabolismo do ácido linoleico (Dauchy et al., 2009).

Outro mecanismo proposto, que limita a sobrevivência de células cancerígenas pela melatonina, envolve a regulação da telomerase (Leon-Blanco et al., 2003) (Reiter, 2004).

A telomerase é uma ribonucleoproteína que sintetiza sequências específicas e repetidas de ADN à extremidade 3' dos cromossomas (em humanos TTAGGG), ou seja, estende os telómeros e deste modo mantem a integridade e estabilidade da estrutura cromossômica (Leon-Blanco et al., 2003). Normalmente, uma célula divide-se entre 50 a 70 vezes, até ficar senescente e sofrer apoptose e isto deve-se a um encurtamento progressivo, a cada divisão celular, dos telómeros, sendo a actividade da telomerase insignificante. Contudo, esta enzima é activada, na maioria dos cancros humanos, o que tem tornado a telomerase num alvo terapêutico para o tratamento desta patologia (Leon-Blanco et al., 2003) (Vinagre et al., 2014).

O primeiro estudo a relacionar a melatonina com a inibição da actividade da telomerase foi realizado com a linha celular de adenocarcinoma de mama humano, MCF-7. Foi realizado um ensaio *in vivo*, onde ratos receberam um xenoenxerto MCF-7 e o grupo em estudo recebeu melatonina suplementar (0,1 mg/ml) na água, durante cinco semanas. O resultado foi uma redução, tanto no peso do tumor, como no número de metástases, comparativamente com o grupo não tratado com melatonina. Utilizando o ensaio TRAP, verificou-se uma significativa redução da actividade da telomerase nos ratos que receberam suplementação de melatonina. Além disso, neste estudo realizou-se um ensaio *in vitro*, onde se cultivaram células MCF-7 tratadas com diferentes concentrações de melatonina. Apesar dos resultados terem sido dose-dependente, mesmo uma concentração fisiológica de melatonina (1nM), teve a capacidade de alterar factores essenciais ao funcionamento e actividade da enzima telomerase, conseguindo

diminuir a expressão quer da sua subunidade catalítica (TERT), como da subunidade TR (Leon-Blanco et al., 2003).

Além disso, a melatonina demonstrou actividade anti-estrogénica e isto pode explicar a sua capacidade em suprimir a proliferação celular, num número de diferentes tipos de células hormona-dependentes, especialmente no cancro da mama (Reiter, 2004). Os estrogénios têm sido referidos como moléculas inductoras de carcinogénese, contudo ainda não está esclarecido se são os próprios estrogénios e os seus metabolitos, que actuam como agentes mutagénicos ou se esta acção é conseguida indirectamente, através do aumento da proliferação de células epiteliais (Sánchez-Barceló et al., 2005).

Na realidade, podemos descrever três mecanismos que explicam esta acção anti-estrogénica da melatonina. O primeiro mecanismo refere-se à sua capacidade em regular a produção gonadal de estrogénios, levando a uma diminuição dos níveis circulantes de estrogénios (estradiol) (Sánchez-Barceló et al., 2005). O segundo mecanismo refere-se à capacidade da melatonina diminuir a expressão dos receptores de estrogénio (ERs), mais especificamente o ER α , apresentando um comportamento parecido ao grupo de fármacos moduladores selectivos dos receptores do estrogénio (SERMs). A melatonina, ao ligar-se ao receptor MT₁, que está acoplado a proteína G_i, mais especificamente à G_{ai2}, leva a uma diminuição da adenilciclase e subsequentemente de cAMP, culminando numa diminuição da fosforilação e activação do ER α . Em suma, a melatonina vai provocar uma diminuição na activação transcricional do ER α (Kiefer et al., 2005) (Sánchez-Barceló et al., 2005). Utilizando uma linha celular de células do cancro da mama ER α -negativas, como MDA-MB-231, verificou-se que apesar do receptor MT₁ associado a uma proteína G_{ai} ser expresso, não se verificou qualquer efeito na inibição do crescimento desta linha celular por parte da melatonina (Mao et al., 2014). Finalmente, o terceiro mecanismo que reforça esta capacidade anti-estrogénica da melatonina, refere-se à sua capacidade em inibir enzimas, como é o caso da aromatase, que converte androgénios em estrogénios. Pela diminuição que a mesma induz na regulação de algumas enzimas, podemos dizer que a melatonina tem um comportamento parecido aos moduladores selectivos das enzimas de estrogénio (SEEMs) (Sánchez-Barceló et al., 2005).

Existem duas reflexões interessantes em relação à associação da melatonina com os estrogénios. A primeira é que os estrogénios demonstraram ter a capacidade de regular positivamente a actividade da enzima telomerase e como tal, pode-se estar a falar de um mecanismo indirecto de inibição da mesma. Ou seja, pela capacidade anti-

estrogénica da melatonina, pode-se potenciar dois mecanismos que levam a uma acção anti-tumoral (Sánchez-Barceló et al., 2005). Outra observação, não menos interessante, é o facto de se saber que concentrações elevadas de estrogénio contribuem para uma diminuição da resposta imunológica. Se a melatonina leva a uma diminuição de estrogénios, conseqüentemente existirá um maior reforço imunológico. Este pode ser um mecanismo para explicar as propriedades imunológicas da melatonina (Kovacs, Messingham, & Gregory, 2002) (Sánchez-Barceló et al., 2005).

O último mecanismo sobre o papel oncostático da melatonina refere-se á inibição da proteína sirtuína 1 (SIRT1) (Jung-Hynes & Ahmad, 2009) (Jung-Hynes, Reiter, et al., 2010).

As sirtuínas são proteínas da classe III da família das histonas desacetilases dependentes do NAD⁺ (HDACs) e estão relacionadas com a longevidade das células. Um dado interessante é que as sirtuínas diminuem com a idade, mas aumentam rapidamente em alguns cancros (Junqueira, 2010). Das sete sirtuínas existentes nos mamíferos, a mais bem estudada é a SIRT1, sabendo-se hoje está envolvida em muitos processos celulares, como a reparação do ADN, envelhecimento, resposta ao stress, levando a uma maior sobrevivência das células, pela inibição da apoptose ou senescência celular (Jung-Hynes & Ahmad, 2009). Ultimamente, chegou-se à conclusão que existe uma ligação entre a função metabólica da SIRT1 e o sistema de temporização circadiano, sendo que, a proteína SIRT1 parece ter também influencia na regulação de vários genes do ritmo circadiano (Jung-Hynes, Reiter, et al., 2010).

Além disso, a sua inibição parecer ter efeitos oncostáticos, sobretudo em cancros relacionados com a idade, sendo um bom exemplo, o cancro da próstata (Jung-Hynes, Huang, Reiter, & Ahmad, 2010). O envelhecimento contribui para um decréscimo nos níveis de melatonina e nesta fase, os valores de proteína SIRT1 que estariam diminuídos em indivíduos saudáveis, aparecem elevados em situações de transformações neoplásicas, dependentes da idade. Estes dois pressupostos podem levar a uma desregulação da ritmicidade circadiana e, deste modo, contribuir para alterações no ciclo celular e podendo culminar em cancro. A administração de melatonina exógena, sobretudo nos idosos onde as perturbações do ritmo circadiano são maiores, pode ser benéfica, pois inibe a proteína SIRT1 e assim, aumenta a probabilidade das células cancerígenas de sofrer apoptose (Jung-Hynes, Reiter, et al., 2010). Uma das acções oncostáticas anteriormente mencionada foi a capacidade da melatonina em induzir a apoptose em muitas células tumorais (Sainz et al., 2003). No entanto, o estudo referido

foi o primeiro a associar esta acção com a inibição da SIRT1 (Jung-Hynes, Reiter, et al., 2010).

Ensaio *in vitro* e *in vivo*, realizados posteriormente, reforçaram a hipótese inicial de que a melatonina pode diminuir o crescimento do cancro da próstata, através da inibição da proteína SIRT1. Um dos resultados mais interessantes obtidos neste estudo foi que, mesmo uma dose baixa de melatonina exógena (fisiologicamente realizáveis em humanos), mas cronicamente administrada, permitiu inibir o desenvolvimento do cancro da próstata nos ratos, sem qualquer efeito adverso registado (Jung-Hynes et al., 2011).

Os vários mecanismos descritos anteriormente sugerem que a actividade oncostática da melatonina é conseguida através de mecanismos epigenéticos, nomeadamente modificações ao nível dos ácidos nucleicos (Korkmaz, Sanchez-Barcelo, Tan, & Reiter, 2009).

A evidência, até à data, demonstra que o estilo de vida moderno tem exposto a população a distúrbios do ritmo circadiano, sobretudo devido à exposição de luz durante a noite (Jung-Hynes, Reiter, et al., 2010) (Proietti, Cucina, Reiter, & Bizzarri, 2013). Através de estudos epidemiológicos, têm-se demonstrado que as mulheres que trabalham em turnos da noite, e os indivíduos que trabalham mais horas à noite têm maior risco de cancro da mama e da próstata, respectivamente (Jung-Hynes, Reiter, et al., 2010). Estes distúrbios do ritmo circadiano são causados pela inibição da síntese/libertação de melatonina, pela exposição de luz à noite e, não só levam a alterações de sono e depressão, como também a um risco acrescentado de desenvolver cancro (Proietti et al., 2013). Isto acontece, não só para o cancro da mama e da próstata, mas para outros tipos de cancro como: endométrio, colon, linfoma de não-Hodgkin (Jung-Hynes, Reiter, et al., 2010). Apesar de existir muita evidência que reforça o papel da melatonina como agente preventivo ou de tratamento do cancro, também têm surgido autores que têm demonstrado estudos que contrariam esta hipótese. Exemplos são os recentes estudos elaborados por Wang et al. e Wu et al., que concluem que não existe uma associação evidente entre os níveis diminuídos de melatonina e o risco de cancro da mama. Os resultados surgem após a análise dos níveis do metabolito, 6-sulfatoximelatonina, na urina (Wang et al., 2014) (Wu et al., 2013) Contudo, estes estudos necessitam de uma análise mais aprofundada, pois diferenças biológicas podem levar a resultados diferentes. Por exemplo, num dos ensaios a amostra usada era de mulheres asiáticas e resultados empíricos têm demonstrado que as pessoas de

ascendência asiática, que trabalham em turnos da noite, são menos susceptíveis às alterações dos níveis fisiológicos de melatonina (Erren & Reiter, 2013).

Uma coisa é unânime entre todos os estudos, é necessária uma maior pesquisa para comprovar a utilidade da melatonina como agente único de tratamento do cancro ou como adjuvante para potenciar efeitos ou diminuir as reacções adversas de medicamentos utilizados em quimioterapia (Erren & Reiter, 2013) (Jung-Hynes, Reiter, et al., 2010) (Proietti et al., 2013) (Rondanelli, Faliva, Perna, & Antonello, 2013).

7. Conclusão

Apesar das múltiplas propriedades da melatonina, demonstradas em ensaios *in vitro* e *in vivo*, na maioria delas, a evidência clínica até agora obtida é largamente insuficiente para comprovar o seu uso terapêutico. Mais ensaios clínicos terão de ser efectuados para comprovar a sua eficácia, não só como agente imunomodulador, mas como oncostático, neuroprotector, anti-envelhecimento, entre outros.

A presença de uma cascata antioxidante que actua de forma sinérgica na neutralização de radicais livres, assim como a sua capacidade em atravessar membranas biológicas, parece ser uma vantagem em relação a outros antioxidantes e poderá justificar o seu uso em muitas doenças e condições, que estão relacionadas com o stress oxidativo.

A primeira linha de tratamento para distúrbios do sono é a melhoria da higiene do sono, assim como outras medidas não farmacológicas. Apesar da eficácia da melatonina ser questionada em alguns estudos, o seu uso parece justificar-se em alguns distúrbios de sono, sobretudo nos casos em que há um comprometimento na produção de melatonina ou ligação ao núcleo supraquiasmático, por causas patológicas ou não, assim como em distúrbios de sono associados a desordens no ritmo circadiano.

Nos vários estudos realizados a melatonina demonstrou ser segura e apresentar um apresenta um baixo potencial de dependência, assim como, poucos efeitos adversos.

8. Bibliografia

- Alarma-Estrany, P., & Pintor, J. (2007). Melatonin receptors in the eye: location, second messengers and role in ocular physiology. *Pharmacology & Therapeutics*, *113*(3), 507–522. doi:10.1016/j.pharmthera.2006.11.003
- Arendt, J. (1998). Melatonin and the pineal gland : influence on mammalian seasonal and circadian physiology. *Reviews of Reproduction*, *3*(1), 13–22.
- Arendt, J. (2006). Melatonin and human rhythms. *Chronobiology International*, *23*(1-2), 21–37. doi:10.1080/07420520500464361
- Arendt, J., Aldhous, M., & Marks, V. (1986). Alleviation of jet lag by melatonin : preliminary results of controlled double blind trial. *British Medical Journal*, *292*(6529), 1170.
- Bellastella, A., Bellis, A. De, Bellastella, G., & Esposito, K. (2014). Opposite influence of light and blindness on pituitary – gonadal function. *Frontiers in Endocrinology*, *4*(205), 1–4. doi:10.3389/fendo.2013.00205
- Benarroch, E. E. (2008). Suprachiasmatic nucleus and melatonin Reciprocal interactions and clinical correlations. *Neurology*, *71*(8), 594–598.
- Benitez-King, G., & Antón-Tay, F. (1993). Calmodulin mediates melatonin cytoskeletal effects. *Experientia*, *49*(8), 635–641.
- Blask, D. E., Brainard, G. C., Dauchy, R. T., Hanifin, J. P., Davidson, L. K., Krause, J. A., ... Zalatan, F. (2005). Melatonin-depleted blood from premenopausal women exposed to light at night stimulates growth of human breast cancer xenografts in nude rats. *Cancer Research*, *65*(23), 11174–11184. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-1945
- Blask, D. E., Dauchy, R. T., Dauchy, E. M., Mao, L., Hill, S. M., Greene, M. W., ... Davidson, L. (2014). Light exposure at night disrupts host/cancer circadian regulatory dynamics: impact on the Warburg effect, lipid signaling and tumor growth prevention. *PloS One*, *9*(8), e102776. doi:10.1371/journal.pone.0102776

Boutin, J. a, Marcheteau, E., Hennig, P., Moulharat, N., Berger, S., Delagrang, P., ... Ferry, G. (2008). MT3/QR2 melatonin binding site does not use melatonin as a substrate or a co-substrate. *Journal of Pineal Research*, 45(4), 524–531. doi:10.1111/j.1600-079X.2008.00631.x

Braam, W., Smits, M. G., Didden, R., Korzilius, H., Van Geijlswijk, I. M., & Curfs, L. M. G. (2009). Exogenous melatonin for sleep problems in individuals with intellectual disability: a meta-analysis. *Developmental Medicine and Child Neurology*, 51(5), 340–349. doi:10.1111/j.1469-8749.2008.03244.x

Bragança, F. (2012). Medicamentos e suplementos alimentares: diferenças na avaliação e monitorização. *Boletim de Farmacovigilância*, 16(1), 99.

Brown, G. M., Pandi-Perumal, S. R., Trakht, I., & Cardinali, D. P. (2009). Melatonin and its relevance to jet lag. *Travel Medicine and Infectious Disease*, 7(2), 69–81. doi:10.1016/j.tmaid.2008.09.004

Brown, R. E., Basheer, R., Mckenna, J. T., Strecker, R. E., & Robert, W. (2012). Control of sleep and wakefulness. *Physiological Reviews*, 92(3), 1087–1187. doi:10.1152/physrev.00032.2011.CONTROL

Brydon, L., Roka, F., Petit, L., Coppet, P. De, Barrett, P., Morgan, P. J., ... Jockers, R. (1999). Dual Signaling of Human Mella Melatonin Receptors via Gi2 , Gi3 , and Gq / 11 Proteins. *Molecular Endocrinology*, 13(12), 2025–2038.

Brzezinski, A., Vangel, M. G., Wurtman, R. J., Norrie, G., Zhdanova, I., Ben-Shushan, A., & Ford, I. (2005). Effects of exogenous melatonin on sleep: a meta-analysis. *Sleep Medicine Reviews*, 9(1), 41–50. doi:10.1016/j.smr.2004.06.004

Buck, M. L. (2003). A Monthly Newsletter for Health Care Professionals Children's Medical Center at the University of Virginia. *Pediatric Pharmacotherapy*, 9(11).

Buscemi, N., Vandermeer, B., Hooton, N., Pandya, R., Tjosvold, L., Hartling, L., ... Baker, G. (2006). Efficacy and safety of exogenous melatonin for secondary sleep disorders and sleep disorders accompanying sleep restriction: meta-analysis. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 332(7538), 385–393. doi:10.1136/bmj.38731.532766.F6

Buscemi, N., Vandermeer, B., Hooton, N., Pandya, R., Tjosvold, L., Hartling, L., ... Vohra, S. (2005). The efficacy and safety of exogenous melatonin for primary sleep disorders. A meta-analysis. *Journal of General Internal Medicine*, 20(12), 1151–1158. doi:10.1111/j.1525-1497.2005.0243.x

Buscemi, N., Vandermeer, B., Pandya, R., Hooton, N., Tjosvold, L., Hartling, L., ... Klassen, T. (2004). *Melatonin for Treatment of Sleep Disorders*. Agency for Healthcare Research and Quality.

Cajochen, C., Krauchi, K., & Wirz-Justice, A. (2003). Role of Melatonin in the Regulation of Human Circadian Rhythms and Sleep. *Journal of Neuroendocrinology*, 15(4), 432–437.

Calabrese, V., Lodi, R., Tonon, C., D'Agata, V., Sapienza, M., Scapagnini, G., ... Butterfield, D. A. (2005). Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and cellular stress response in Friedreich's ataxia. *Journal of the Neurological Sciences*, 233(1-2), 145–162. doi:10.1016/j.jns.2005.03.012

Cavadas, L. F., & Ribeiro, L. (2011). Abordagem Da Insónia Secundária Do Adulto Nos Cuidados de Saúde Primários. *Acta Médica Portuguesa*, 24(1), 135–144.

Cerutti, P., Ghosh, R., Oya, Y., & Amstad, P. (1994). The Role of the Cellular Antioxidant Defense in Oxidant Carcinogenesis. *Environmental Health Perspectives*, 102(10), 123–129.

Cervantes, M., Morali, G., & Letechipía-Vallejo, G. (2008). Melatonin and ischemia-reperfusion injury of the brain. *Journal of Pineal Research*, 45(1), 1–7. doi:10.1111/j.1600-079X.2007.00551.x

Colten, H. R., & Altevogt, B. M. (2006). *Sleep Disorders and Sleep Deprivation: An Unmet Public Health Problem*.

Cos, S., & Sánchez-Barceló, E. J. (2000). Melatonin and mammary pathological growth. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 21(2), 133–170. doi:10.1006/frne.1999.0194

Cummings, C. (2012). Melatonin for the management of sleep disorders in children and adolescents. *Paediatrics & Child Health*, 17(6), 331–333.

Dauchy, E. M., Dauchy, R. T., Davidson, L. K., Lynch, D. T., Krause, J. A., Blue, L. M., ... Blask, D. E. (2006). Human Cancer Xenograft Perfusion In Situ in Rats : A New Perfusion System that Minimizes Delivery Time and Maintains Normal Tissue Physiology and Responsiveness to Growth-inhibitory Agents. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 45(3), 38–44.

Dauchy, R. T., Blask, D. E., Dauchy, E. M., Davidson, L. K., Tirrell, P. C., Greene, M. W., ... Sauer, L. A. (2009). Antineoplastic effects of melatonin on a rare malignancy of mesenchymal origin: melatonin receptor-mediated inhibition of signal transduction, linoleic acid metabolism and growth in tissue-isolated human leiomyosarcoma xenografts. *Journal of Pineal Research*, 47(1), 32–42. doi:10.1111/j.1600-079X.2009.00686.x

Dibner, C., Schibler, U., & Albrecht, U. (2010). The mammalian circadian timing system: organization and coordination of central and peripheral clocks. *Annual Review of Physiology*, 72, 517–549. doi:10.1146/annurev-physiol-021909-135821

Doghramji, K. (2007). Melatonin and Its Receptors : A New Class of Sleep-Promoting Agents. *Journal of Clinical Sleep Medicine: JCSM: Official Publication of the American Academy of Sleep Medicine*, 3(5 Suppl), S17–S23.

Dowson, L., Moore, K., & Tinney, J. (2008). Sleep in Residential Care. A Literature Review. *National Ageing Research Institute*.

Dubocovich, M. L., & Markowska, M. (2005). Functional MT1 and MT2 Melatonin Receptors in Mammals. *Endocrine*, 27(2), 101–110.

Erren, T. C., & Reiter, R. J. (2013). Sleep duration, melatonin and breast cancer in the Singapore Chinese Health Study: on null results and their interpretation. *International Journal of Cancer*, 133(8), 2010–2011. doi:10.1002/ijc.28212

Espino, J., Pariente, J. a, & Rodríguez, A. B. (2012). Oxidative stress and immunosenescence: therapeutic effects of melatonin. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2012, 670294. doi:10.1155/2012/670294

Ferracioli-Oda, E., Qawasmi, A., & Bloch, M. H. (2013). Meta-analysis: melatonin for the treatment of primary sleep disorders. *PloS One*, 8(5), e63773. doi:10.1371/journal.pone.0063773

Foster, R. G., & Hankins, M. W. (2007). Circadian vision. *Current Biology*, 17(17), 746–751.

Friedlander, R. M. (2003). Apoptosis and Caspases in Neurodegenerative Diseases. *The New England Journal of Medicine*, 348(14), 1365–1375.

Greer, S. M., Goldstein, A. N., & Walker, M. P. (2013). The impact of sleep deprivation on food desire in the human brain. *Nature Communications*, 4, 2259. doi:10.1038/ncomms3259.The

Gupta, B. B. P., Spessert, R., & Vollrath, L. (2005). Molecular components and mechanism of adrenergic signal transduction in mammalian pineal gland: Regulation of melatonin synthesis. *Indian Journal of Experimental Biology*, 43(2), 115–149.

Hardeland, R. (2009). Melatonin: signaling mechanisms of a pleiotropic agent. *BioFactors*, 35(2), 183–192. doi:10.1002/biof.23

Hardeland, R., Tan, D.-X., & Reiter, R. J. (2009). Kynuramines, metabolites of melatonin and other indoles: the resurrection of an almost forgotten class of biogenic amines. *Journal of Pineal Research*, 47(2), 109–126. doi:10.1111/j.1600-079X.2009.00701.x

Harris, A. S., Burgess, H. J., & Dawson, D. (2001). The effects of day-time exogenous melatonin administration on cardiac autonomic activity. *Journal of Pineal Research*, 31(3), 199–205.

Hastings, E., & Felt, B. T. (2012). ADHD and Sleep Problems in Children. *Current Directions in ADHD and Its Treatment. InTech*, 61–88.

Hastings, M. H., Maywood, E. S., & Reddy, A. B. (2008). Two Decades of Circadian Time. *Journal of Neuroendocrinology*, 20(6), 812–819. doi:10.1111/j.1365-2826.2008.01715.x

Iber, C., Ancoli-Israel, S., Chesson, A. L., & Quan, S. F. (2007). *The AASM - Manual for the Scoring of Sleep and Associated Events: Rules, Terminology and Technical Specifications* (1st editio.). Westchester, Illinois: American Academy of Sleep Medicine.

Jasser, S. A., Blask, D. E., & Brainard, G. C. (2006). Light during darkness and cancer: relationships in circadian photoreception and tumor biology. *Cancer Causes & Control*, 17(4), 515–523. doi:10.1007/s10552-005-9013-6

Jung, B., & Ahmad, N. (2006). Melatonin in cancer management: progress and promise. *Cancer Research*, 66(20), 9789–9793. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-1776

Jung-Hynes, B., & Ahmad, N. (2009). SIRT1 controls circadian clock circuitry and promotes cell survival: a connection with age-related neoplasms. *The FASEB Journal*, 23(9), 2803–2809. doi:10.1096/fj.09-129148

Jung-Hynes, B., Huang, W., Reiter, R. J., & Ahmad, N. (2010). Melatonin resynchronizes dysregulated circadian rhythm circuitry in human prostate cancer cells. *Journal of Pineal Research*, 49(1), 60–68. doi:10.1111/j.1600-079X.2010.00767.x.Melatonin

Jung-Hynes, B., Reiter, R. J., & Ahmad, N. (2010). Sirtuins, melatonin and circadian rhythms: building a bridge between aging and cancer. *Journal of Pineal Research*, 48(1), 9–19. doi:10.1111/j.1600-079X.2009.00729.x

Jung-Hynes, B., Schmit, T. L., Reagan-Shaw, S. R., Siddiqui, I. a, Mukhtar, H., & Ahmad, N. (2011). Melatonin, a novel Sirt1 inhibitor, imparts antiproliferative effects against prostate cancer in vitro in culture and in vivo in TRAMP model. *Journal of Pineal Research*, 50(2), 140–149. doi:10.1111/j.1600-079X.2010.00823.x

Junqueira, C. S. da G. (2010). *O Papel da Restrição Calórica no Envelhecimento*. (Tese de Mestrado) Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, Portugal.

Kalsbeek, A., Perreau-Lenz, S., & Buijs, R. M. (2006). A network of (autonomic) clock outputs. *Chronobiology International*, 23(3), 521–535. doi:10.1080/07420520600651073

Karthikeyan, R., Marimuthu, G., Spence, D. W., Pandi-Perumal, S. R., BaHammam, A. S., Brown, G. M., & Cardinali, D. P. (2014). Should we listen to our clock to prevent type 2 diabetes mellitus? *Diabetes Research and Clinical Practice*. doi:10.1016/j.diabres.2014.07.029

Kato, K., Hirai, K., Nishiyama, K., Uchikawa, O., Fukatsu, K., Ohkawa, S., ... Miyamoto, M. (2005). Neurochemical properties of ramelteon (TAK-375), a selective MT1/MT2 receptor agonist. *Neuropharmacology*, 48(2), 301–310. doi:10.1016/j.neuropharm.2004.09.007

Keenan, S., & Hirshkowitz, M. (2011). Monitoring and Staging Human Sleep. In Elsevier Saunders (Ed.), *Principles and practice of sleep medicine* (5th edition, pp. 1602–1609).

Kiefer, T. L., Lai, L., Yuan, L., Dong, C., Burow, M. E., & Hill, S. M. (2005). Differential regulation of estrogen receptor alpha, glucocorticoid receptor and retinoic acid receptor alpha transcriptional activity by melatonin is mediated via different G proteins. *Journal of Pineal Research*, 38(4), 231–239. doi:10.1111/j.1600-079X.2004.00198.x

Korkmaz, A., Sanchez-Barcelo, E. J., Tan, D.-X., & Reiter, R. J. (2009). Role of melatonin in the epigenetic regulation of breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 115(1), 13–27. doi:10.1007/s10549-008-0103-5

Kostoglou-Athanassiou, I. (2013). Therapeutic applications of melatonin. *Therapeutic Advances in Endocrinology and Metabolism*, 4(1), 13–24. doi:10.1177/2042018813476084

Kovacs, E. J., Messingham, K. A. N., & Gregory, M. S. (2002). Estrogen regulation of immune responses after injury. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 193(1), 129–135.

Kumbalasisiri, T., & Provencio, I. (2005). Melanopsin and other novel mammalian opsins. *Experimental Eye Research*, 81(4), 368–375. doi:10.1016/j.exer.2005.05.004

Kvetnoy, I. M. (1999). Extrapineal melatonin: location and role within diffuse neuroendocrine system. *The Histochemical Journal*, 31(1), 1–12.

Lee, S.-Y., Lee, S.-J., Han, C., Patkar, A. a, Masand, P. S., & Pae, C.-U. (2013). Oxidative/nitrosative stress and antidepressants: targets for novel antidepressants. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 46, 224–235. doi:10.1016/j.pnpbp.2012.09.008

Leon-Blanco, M. M., Guerrero, J. M., Reiter, R. J., Calvo, J. R., & Pozo, D. (2003). Melatonin inhibits telomerase activity in the MCF-7 tumor cell line both in vivo and in vitro. *Journal of Pineal Research*, 35(3), 204–211.

Li, D. Y., Smith, D. G., Hardeland, R., Yang, M. Y., Xu, H. L., Zhang, L., ... Zhu, Q. (2013). Melatonin receptor genes in vertebrates. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(6), 11208–11223. doi:10.3390/ijms140611208

Liu, J., & Wang, L.-N. (2012). Ramelteon in the treatment of chronic insomnia: systematic review and meta-analysis. *International Journal of Clinical Practice*, 66(9), 867–873. doi:10.1111/j.1742-1241.2012.02987.x

Luchetti, F., Canonico, B., Betti, M., Arcangeletti, M., Pilolli, F., Piroddi, M., ... Galli, F. (2010). Melatonin signaling and cell protection function. *The FASEB Journal*, 24(10), 3603–3624. doi:10.1096/fj.10-154450

Ma, X., Idle, J. R., Krausz, K. W., & Gonzalez, F. J. (2005). Metabolism of melatonin by human cytochromes p450. *Drug Metabolism and Disposition*, 33(4), 489–494. doi:10.1124/dmd.104.002410.not

Ma, X., Idle, J. R., Krausz, K. W., Tan, D.-X., Ceraulo, L., & Gonzalez, F. J. (2006). Urinary metabolites and antioxidant products of exogenous melatonin in the mouse. *Journal of Pineal Research*, 40(4), 343–349. doi:10.1111/j.1600-079X.2006.00321.x

Mao, L., Yuan, L., Xiang, S., Zeringue, S. B., Dauchy, R. T., Blask, D. E., ... Hill, S. M. (2014). Molecular deficiency (ies) in MT1 melatonin signaling pathway underlies the melatonin-unresponsive phenotype in MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Journal of Pineal Research*, 56(3), 246–253. doi:10.1111/jpi.12117

Maronde, E., & Stehle, J. H. (2007). The mammalian pineal gland: known facts, unknown facets. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 18(4), 142–149. doi:10.1016/j.tem.2007.03.001

Melke, J., Goubran Botros, H., Chaste, P., Betancur, C., Nygren, G., Anckarsäter, H., ... Bourgeron, T. (2008). Abnormal melatonin synthesis in autism spectrum disorders. *Molecular Psychiatry*, 13(1), 90–98. doi:10.1038/sj.mp.4002016

Moore, R. Y. (1996). Neural control of the pineal gland. *Behavioural Brain Research*, 73(1-2), 125–130.

Muindi, F., Zeitzer, J. M., & Heller, H. C. (2014). Retino-hypothalamic regulation of light-induced murine sleep. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 8. doi:10.3389/fnsys.2014.00135

Nutt, D., Wilson, S., & Paterson, L. (2008). Sleep disorders as core symptoms of depression. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 10(3), 329–336.

Ortíz-López, L., Morales-Mulia, S., Ramírez-Rodríguez, G., & Benítez-King, G. (2009). ROCK-regulated cytoskeletal dynamics participate in the inhibitory effect of melatonin on cancer cell migration. *Journal of Pineal Research*, 46(1), 15–21. doi:10.1111/j.1600-079X.2008.00600.x

Oxford Centre for Evidence-based Medicine. (2014). Oxford Centre for Evidence-based Medicine – Levels of Evidence (March 2009). Acedido em 21 Agosto 2014, disponível em <http://www.cebm.net/oxford-centre-evidence-based-medicine-levels-evidence-march-2009/>

Pandi-Perumal, S. R., Trakht, I., Srinivasan, V., Spence, D. W., Maestroni, G. J. M., Zisapel, N., & Cardinali, D. P. (2008). Physiological effects of melatonin: role of melatonin receptors and signal transduction pathways. *Progress in Neurobiology*, 85(3), 335–353. doi:10.1016/j.pneurobio.2008.04.001

Peschke, E. (2008). Melatonin, endocrine pancreas and diabetes. *Journal of Pineal Research*, 44(1), 26–40. doi:10.1111/j.1600-079X.2007.00519.x

Proietti, S., Cucina, A., Reiter, R. J., & Bizzarri, M. (2013). Molecular mechanisms of melatonin's inhibitory actions on breast cancers. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 70(12), 2139–2157. doi:10.1007/s00018-012-1161-8

Ram, P. T., Dai, J., Yuan, L., Dong, C., Kiefer, T. L., Lai, L., & Hill, S. M. (2002). Involvement of the mt1 melatonin receptor in human breast cancer. *Cancer Letters*, 179(2), 141–150.

Rawashdeh, O., & Maronde, E. (2012). The hormonal Zeitgeber melatonin: role as a circadian modulator in memory processing. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 5, 27. doi:10.3389/fnmol.2012.00027

Reiter, R. J. (2004). Mechanisms of cancer inhibition by melatonin. *Journal of Pineal Research*, 37(3), 213–214. doi:10.1111/j.1600-079X.2004.00165.x

Reiter, R. J., Paredes, S. D., Manchester, L. C., & Tan, D.-X. (2009). Reducing oxidative/nitrosative stress: a newly-discovered genre for melatonin. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 44(4), 175–200. doi:10.1080/10409230903044914

Reiter, R. J., Rosales-Corral, S. A., Manchester, L. C., & Tan, D.-X. (2013). Peripheral reproductive organ health and melatonin: ready for prime time. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(4), 7231–7272. doi:10.3390/ijms14047231

Reiter, R. J., Tan, D., Manchester, L. C., Paredes, S. D., Mayo, J. C., & Sainz, R. M. (2009). Melatonin and Reproduction Revisited. *Biology of Reproduction*, 81(3), 445–456. doi:10.1095/biolreprod.108.075655

Reiter, R. J., Tan, D., Mayo, J. C., Sainz, R. M., & Leon, J. (2003). Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanisms and pathophysiological implications in humans. *Acta Biochimica Polonica*, 50(4), 1129–1146.

Reppert, S. M., & Weaver, D. R. (2001). Molecular analysis of mammalian circadian rhythms. *Annual Review of Physiology*, 63(1), 647–676.

Ribelayga, C., Pévet, P., & Simonneaux, V. (2000). HIOMT drives the photoperiodic changes in the amplitude of the melatonin peak of the Siberian hamster. *American*

Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 278(5), R1339–R1345.

Rodrigues, P., Daniele, R., Cristina, C., Fernando, L., Santos, R., Chada, E., & Soares, M. (2014). Ação da melatonina no tecido cartilaginoso. *Reproducao & Climaterio*, 8(1), 24–29.

Rondanelli, M., Faliva, M. A., Perna, S., & Antonello, N. (2013). Update on the role of melatonin in the prevention of cancer tumorigenesis and in the management of cancer correlates, such as sleep-wake and mood disturbances: review and remarks. *Aging Clinical and Experimental Research*, 25(5), 499–510. doi:10.1007/s40520-013-0118-6

Sainz, R. M., Mayo, J. C., Rodriguez, C., Tan, D. X., Lopez-Burillo, S., & Reiter, R. J. (2003). Melatonin and cell death: differential actions on apoptosis in normal and cancer cells. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 60(7), 1407–1426. doi:10.1007/s00018-003-2319-1

Sánchez-Barceló, E. J., Cos, S., Mediavilla, D., Martínez-Campa, C., González, A., & Alonso-González, C. (2005). Melatonin-estrogen interactions in breast cancer. *Journal of Pineal Research*, 38(4), 217–222. doi:10.1111/j.1600-079X.2004.00207.x

Sánchez-Barceló, E. J., Mediavilla, M. D., & Reiter, R. J. (2011). Clinical uses of melatonin in pediatrics. *International Journal of Pediatrics*, 2011, 892624. doi:10.1155/2011/892624

Seron-Ferre, M., Valenzuela, G. J., & Torres-Farfan, C. (2007). Circadian clocks during embryonic and fetal development. *Birth Defects Research. Part C, Embryo Today: Reviews*, 81(3), 204–214. doi:10.1002/bdrc.20101

Shiu, S. Y. W. (2007). Towards rational and evidence-based use of melatonin in prostate cancer prevention and treatment. *Journal of Pineal Research*, 43(1), 1–9. doi:10.1111/j.1600-079X.2007.00451.x

Shneerson, J. M. (2009). *Sleep Medicine: A Guide to sleep and its disorders*. (J. W. & Sons, Ed.) (Second Edi.).

Silva, S. de O. (2005). *Oxidação de melatonina e formação de N1-acetil-N2-formil-5 - metoxiquinuramina, possíveis efeitos biológicos*. (Tese de Doutorado) Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, Brasil.

Simko, F., & Pechanova, O. (2009). Potential roles of melatonin and chronotherapy among the new trends in hypertension treatment. *Journal of Pineal Research*, 47(2), 127–133. doi:10.1111/j.1600-079X.2009.00697.x

Singh, M., & Jadhav, H. R. (2014). Melatonin: functions and ligands. *Drug Discovery Today*. doi:10.1016/j.drudis.2014.04.014

Skene, D. J., Papagiannidou, E., Hashemi, E., Snelling, J., Lewis, D. F. V, & Fernandez, M. (2001). Contribution of CYP1A2 in the hepatic metabolism of melatonin : studies with isolated microsomal preparations and liver slices. *Journal of Pineal Research*, 31(4), 333–342.

Sliwinski, T., Rozej, W., Morawiec-Bajda, A., Morawiec, Z., Reiter, R., & Blasiak, J. (2007). Protective action of melatonin against oxidative DNA damage-chemical inactivation versus base-excision repair. *Mutation Research*, 634(1-2), 220–227. doi:10.1016/j.mrgentox.2007.07.013

Slominski, R. M., Reiter, R. J., Schlabritz-Loutsevitch, N., Ostrom, R. S., & Slominski, A. T. (2012). Melatonin membrane receptors in peripheral tissues: distribution and functions. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 351(2), 152–166. doi:10.1016/j.mce.2012.01.004

Smirnov, A. N. (2001). Nuclear Melatonin Receptors. *Biochemistry*, 66(1), 19–26.

Smits, M. G., Van Stel, H. F., Van der Heijden, K., Meijer, A. M., Coenen, A. M., & Kerkhof, G. A. (2003). Melatonin improves health status and sleep in children with idiopathic chronic sleep-onset insomnia: a randomized placebo-controlled trial. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry*, 42(11), 1286–1293.

Somers, V. K., White, D. P., Amin, R., Abraham, W. T., Costa, F., Culebras, A., ... Young, T. (2008). Sleep apnea and cardiovascular disease: an American Heart Association/American College of Cardiology Foundation Scientific Statement from the

American Heart Association Council for High Blood Pressure Research Professional Education Committee, Council on . *Journal of the American College of Cardiology*, 52(8), 686–717. doi:10.1016/j.jacc.2008.05.002

Srinivasan, V., Singh, J., Pandi-Perumal, S. R., Brown, G. M., Spence, D. W., & Cardinali, D. P. (2010). Jet lag, circadian rhythm sleep disturbances, and depression: the role of melatonin and its analogs. *Advances in Therapy*, 27(11), 796–813. doi:10.1007/s12325-010-0065-y

Srinivasan, V., Spence, D. W., Pandi-Perumal, S. R., Brown, G. M., & Cardinali, D. P. (2011). Melatonin in mitochondrial dysfunction and related disorders. *International Journal of Alzheimer's Disease*, 2011, 326320. doi:10.4061/2011/326320

Srinivasan, V., Spence, D. W., Pandi-Perumal, S. R., Trakht, I., & Cardinali, D. P. (2008). Jet lag: therapeutic use of melatonin and possible application of melatonin analogues. *Travel Medicine and Infectious Disease*, 6(1), 17–28. doi:10.1016/j.tmaid.2007.12.002

Take, G., Erdogan, D., Helvacioğlu, F., Göktas, G., Ozbey, G., Uluoglu, C., & Yücel, B. (2009). Effect of melatonin and time of administration on irradiation-induced damage to rat testes. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 42(7), 621–628.

Takeda Pharmaceuticals North America, I. (2014). Rozerem - Prescription sleep Aid. Acedido em 02 Outubro 2014, disponível em <http://www.rozerem.com/en/>

Tamura, H., Nakamura, Y., Terron, M. P., Flores, L. J., Manchester, L. C., Tan, D., ... Reiter, R. J. (2008). Melatonin and pregnancy in the human. *Reproductive Toxicology*, 25(3), 291–303. doi:10.1016/j.reprotox.2008.03.005

Tamura, H., Takasaki, A., & Taketani, T. (2013). Melatonin as a free radical scavenger in the ovarian follicle. *Endocrine Journal*, 60(1), 1–13.

Tamura, H., Takasaki, A., Taketani, T., Tanabe, M., Kizuka, F., Lee, L., & Tamura, I. (2012). The role of melatonin as an antioxidant in the follicle. *Journal of Ovarian Research*, 5(1), 1–9. doi:10.1186/1757-2215-5-5

- Tan, D., Korkmaz, A., Reiter, R. J., & Lucien, C. (2014). Ebola virus disease : potential use of melatonin as a treatment. *Journal of pineal research*, 1–4. doi:10.1111/jpi.12186
- Tan, D., Manchester, L. C., Reiter, R. J., Plummer, B. F., Hardies, L. J., Weintraub, S. T., & Shepherd, A. M. M. (1998). A Novel Melatonin Metabolite , Cyclic 3-Hydroxymelatonin: A Biomarker of in Vivo Hydroxyl Radical Generation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 253(3), 614–620.
- Tan, D. X., Manchester, L. C., Reiter, R. J., Plummer, B. F., Limson, J., Weintraub, S., & Qi, W. (2000). Melatonin directly scavenges hydrogen peroxide: a potentially new metabolic pathway of melatonin biotransformation. *Free Radical Biology and Medicine*, 29(11), 1177–1185.
- Tan, D.-X., Chen, L.-D., Poeggeler, B., Manchester, L. C., & Reiter, R. J. (1993). Melatonin: a potent, endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocrine Journal*.
- Tobaldini, E., Nobili, L., Strada, S., Casali, K. R., Braghiroli, A., & Montano, N. (2013). Heart rate variability in normal and pathological sleep. *Frontiers in Physiology*, 4. doi:10.3389/fphys.2013.00294
- Viaro, F., Nobre, F., & Evora, P. R. B. (2000). Expressão das Óxido Nítrico Sintetases na Fisiopatologia das Doenças Cardiovasculares. *Arq Bras Cardiol*, 74(4), 365–379.
- Vickers, C. J., Gonza, G. E., & Wolan, D. W. (2014). Discovery of a Highly Selective Caspase-3 Substrate for Imaging Live Cells. *ACS Chemical Biology*, 9(10), 2199–2203.
- Vielma, J. R., Bonilla, E., Chacín-Bonilla, L., Mora, M., Medina-Leendertz, S., & Bravo, Y. (2014). Effects of melatonin on oxidative stress, and resistance to bacterial, parasitic, and viral infections: a review. *Acta Tropica*, 137, 31–38. doi:10.1016/j.actatropica.2014.04.021
- Vinagre, J., Pinto, V., Celestino, R., Reis, M., Pópulo, H., Boaventura, P., ... Soares, P. (2014). Telomerase promoter mutations in cancer: an emerging molecular biomarker? *Virchows Archiv: An International Journal of Pathology*, 465(2), 119–133. doi:10.1007/s00428-014-1608-4

Wang, X. (2009). The anti-apoptotic activity of melatonin in neurodegenerative diseases. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 15(4), 345–357. doi:10.1111/j.1755-5949.2009.00105.x.The

Wang, X.-S., Tipper, S., Appleby, P. N., Allen, N. E., Key, T. J., & Travis, R. C. (2014). First-morning urinary melatonin and breast cancer risk in the Guernsey Study. *American Journal of Epidemiology*, 179(5), 584–593. doi:10.1093/aje/kwt302

Wirojanan, J., Jacquemont, S., Diaz, R., Bacalman, S., Anders, T. F., Hagerman, R. J., & Goodlin-Jones, B. L. (2009). The Efficacy of Melatonin for Sleep Problems in Children with autism , Fragile X Syndrome, or Autism and Fragile X Syndrome. *Journal of Clinical Sleep Medicine*, 5(2), 145–150.

Witt-Enderby, P. a, Bennett, J., Jarzynka, M. J., Firestine, S., & Melan, M. a. (2003). Melatonin receptors and their regulation: biochemical and structural mechanisms. *Life Sciences*, 72(20), 2183–2198. doi:10.1016/S0024-3205(03)00098-5

World Health Organization. (2004). WHO technical meeting on sleep and health European Centre for Environment and Health.

Wu, A. H., Stanczyk, F. Z., Wang, R., Koh, W., Yuan, J., & Yu, M. C. (2013). Sleep duration, spot urinary 6-sulfatoxymelatonin levels and risk of breast cancer among Chinese women in Singapore. *Interernational Journal of Cancer*, 132(4), 891–896. doi:10.1002/ijc.27653.Sleep

Yudoh, K., Trieu, N. Van, Nakamura, H., Hongo-masuko, K., & Kato, T. (2005). Potential involvement of oxidative stress in cartilage senescence and development of osteoarthritis: oxidative stress induces chondrocyte telomere instability and downregulation of chondrocyte function. *Arthritis Research & Therapy*, 7(2). doi:10.1186/ar1499

Zhang, H.-M., & Zhang, Y. (2014). Melatonin: a well-documented antioxidant with conditional pro-oxidant actions. *Journal of Pineal Research*, 57(2), 131–146. doi:10.1111/jpi.12162