



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Rodrigo Filipe Nunes Ribeiro

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Small Molecule Modulators of the Circadian Rhythm: From Identification & Development to Pharmacological Potentials in Clock-related Disorders” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação da Dra. Ana Patrícia Freitas Rei, do Dr. João Manuel Baliza Santiago Maia e da Professora Doutora Maria Manuel da Cruz Silva apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Setembro de 2019

Rodrigo Filipe Nunes Ribeiro

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Small Molecule Modulators of the Circadian Rhythm: From Identification & Development to Pharmacological Potentials in Clock-related Disorders” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação da Dra. Ana Patrícia Freitas Rei, do Dr. João Manuel Baliza Santiago Maia e da Professora Doutora Maria Manuel da Cruz Silva e apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Setembro de 2019

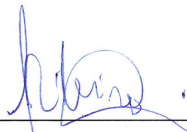


UNIVERSIDADE DE
COIMBRA

Eu, Rodrigo Filipe Nunes Ribeiro, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2014203334, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Small Molecule Modulators of the Circadian Rhythm: From Identification & Development to Pharmacological Potentials in Clock-related Disorders” apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

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

Coimbra, 4 de setembro de 2019.



(Rodrigo Filipe Nunes Ribeiro)

Agradecimentos

Aos meus pais e aos meus avós, a quem devo tudo o que construí até hoje, todos os bons valores transmitidos, todo o apoio incondicional, e por acreditarem sempre em mim, um obrigado nunca será suficiente.

À Rute, por ter sido o meu crucial porto de abrigo ao longo de todos estes anos, e por acreditar mais em mim e dar mais valor às minhas conquistas que, muitas vezes, eu próprio.

Ao Bern e André, a quem agradeço todo o apoio, os momentos de descontração e por me lembrarem sempre o verdadeiro significado de uma grande amizade.

Ao Cercal, todas as suas coletividades, e às velhas e grandes amizades, por nunca me deixarem esquecer que a humildade, a boa educação, a amizade, a entreatajuda e o espírito de sacrifício serão sempre os valores mais importantes.

Aos meus grandes colegas, futuros farmacêuticos de sucesso, obrigado por estes 5 anos incríveis, foram certamente apenas o início.

À Professora Doutora Maria Manuel Silva, agradeço toda a enorme disponibilidade, o conhecimento, os conselhos e todo o apoio prestado. Obrigado pela oportunidade única de conhecer o incrível mundo da Investigação e todos os desafios associados.

À Patrícia, Matilde e Ana Catarina, pelos três meses incríveis de aprendizagem, e por toda a disponibilidade, preocupação, conhecimento transmitido e confiança depositada em mim e no meu trabalho, que me permitiu crescer todos os dias, tanto a nível pessoal como profissional. Um obrigado à Bluepharma e a todos os colaboradores com o qual tive o prazer de contactar.

Ao Dr. João Maia e toda a equipa da Farmácia Machado, pela boa disposição, todo o apoio a nível profissional e pessoal e por me terem ajudado a ser um verdadeiro Farmacêutico e a crescer, ainda mais, enquanto pessoa.

À Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra e a todos os seus docentes, pela formação de excelência, pelos valores, pelo orgulho transmitido pelas Ciências Farmacêuticas e pelo sonho depositado em mim.

'The only limit to our realization of tomorrow will be our doubts of today.'

Franklin D. Roosevelt

Índice

Parte I - Relatório de Estágio em Indústria Farmacêutica

Lista de Abreviaturas	8
1. Introdução.....	9
2. Análise SWOT	10
2.1. Pontos Fortes.....	11
2.1.1. Acolhimento, integração e ambiente de trabalho;	11
2.1.2. Formações internas.....	11
2.1.3. Diversidade de tarefas realizadas no âmbito dos Assuntos Médicos	12
2.1.4. Pesquisa e avaliação de novas ideias de produto.....	15
2.1.5. Contextualização e acompanhamento de projetos	16
2.1.6. Incentivo à auto-aprendizagem, autonomia e sentido crítico.....	16
2.1.7. Colaboração com outros setores e departamentos	16
2.2. Pontos Fracos	17
2.2.1. Duração do estágio em Indústria Farmacêutica	17
2.2.2. Atividades do setor centradas na gestão de ensaios de bioequivalência para medicamentos genéricos.....	17
2.3. Oportunidades.....	18
2.3.1. Possibilidade de contacto com vertente não convencional das Ciências Farmacêuticas	18
2.3.2. Desenvolvimento e aplicação de competências informáticas	18
2.3.3. Uso corrente da Língua Inglesa em comunicações e realização de tarefas	19
2.3.4. Dinâmica de trabalho por <i>Timelines</i> e gestão de prioridades	19
2.4. Ameaças	19
2.4.1. Contexto regulamentar bastante abrangente e dinâmico dos ensaios clínicos.....	19
3. Conclusão.....	20
4. Bibliografia:	21
5. Anexo.....	22

Parte II - Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

Lista de Abreviaturas	24
1. Introdução.....	25
2. Análise SWOT	26
2.1. Pontos Fortes.....	26
2.1.1. Integração e promoção da autonomia.....	26
2.1.2. Atividades de gestão e dinamização	27
2.1.3. Atendimento ao público.....	27
2.1.4. Fidelização e apoio aos utentes.....	28
2.1.5. Localização e protocolos	28
2.2. Pontos Fracos	29
2.2.1. Medicamentos manipulados	29
2.2.2. Receita manual e subsistemas de comparticipação.....	29
2.3. Oportunidades.....	30
2.3.1. Formações internas e externas	30
2.3.2. Consultas de nutrição e suplementação alimentar	31
2.4. Ameaças	31
2.4.1. Medicamentos esgotados e/ou sem <i>stock</i> na farmácia.....	31
2.4.2. Desconhecimento dos utentes e setor médico relativo à tecnologia do medicamento	32
3. Casos Clínicos.....	32
3.1. Caso Clínico I.....	32
3.2. Caso Clínico II.....	33
4. Conclusão.....	34
5. Bibliografia	35
6. Anexos	37

Parte III - Small Molecule Modulators of the Circadian Rhythm

List of Abbreviations	40
Resumo	42
Abstract	43
1. Introduction:.....	44
2. Development of potential small molecule clock modulators.....	47
2.1. Main strategies used to identify clock-modulating small molecules.....	47
2.2. Small molecule modulators of the circadian rhythm targeting:.....	50
2.2.1. Circadian clock core proteins	50
a) CRY1/2.....	50
b) REV-ERBs.....	52
c) RORs	53
c ₁) ROR γ	54
2.2.2. Circadian non-core proteins.....	56
2.3. Clock-Enhancing small Molecules (CEMs)	59
3. Pharmacological effects of small molecule modulators in circadian-related diseases & therapeutic potentials	60
3.1. Metabolic disorders	60
3.2. Cancer.....	61
3.3. Circadian misalignment disorders.....	62
3.4. Neuropsychiatric - sleep and mood - disorders	63
3.5. Inflammation and autoimmune disorders.....	64
3.6. Aging.....	64
4. Conclusion: <i>Emerging hazards & future perspectives</i>	65
5. References	67
6. Appendix	78

Parte I

Relatório de Estágio em Indústria Farmacêutica



Orientado por: Dra. Ana Patrícia Rei



FACULDADE DE FARMÁCIA
UNIVERSIDADE DE
COIMBRA

Lista de Abreviaturas

AIM - Autorização de Introdução de Mercado

AM - Assuntos Médicos

BD/BE - Biodisponibilidade/Bioequivalência

BE - Bioequivalência

CRO - *Contract Research Organization*

EC - Ensaio Clínico

EMA - *European Medicines Agency*

EPAR - *European public assessment reports*

FDA - *Food and Drug Administration*

GCP - *Good Clinical Practice*

I&D - Investigação e Desenvolvimento

ICH - *International Conference on Harmonisation*

IF - Indústria Farmacêutica

IMP - Investigational Medicinal Product

MG - Medicamentos Genéricos

SOP - *Standard Operating Procedures*

I. Introdução

O Estágio Curricular consiste na última unidade curricular presente no plano de estudos do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra e garante ao aluno a possibilidade de pôr em prática os conhecimentos adquiridos durante todo o curso, bem como o desenvolvimento de novas competências apenas passíveis de ser adquiridas em contexto profissional.

Desde o início do meu percurso académico que a complexidade e diversidade da Indústria Farmacêutica me cativou bastante, o que me levou a concorrer ao estágio curricular na Bluepharma Indústria Farmacêutica S.A.

A Bluepharma é uma Indústria Farmacêutica, sediada em Coimbra, que desde o início da sua atividade, em 2001, apostou na produção dos próprios medicamentos com o objetivo de melhorar a economia do país e facilitar o acesso à saúde. Para isso, ao longo dos anos, a Bluepharma tem investido na Investigação e Desenvolvimento de medicamentos, tendo aumentado a qualidade e inovação dos seus métodos de fabrico, alcançando o direito à comercialização de vários medicamentos genéricos (MG)^{1,2}.

É de salientar a notória aposta da Bluepharma em atividades de investigação, desenvolvimento e inovação, tendo sido reconhecida com o 2º lugar entre as empresas farmacêuticas que, em Portugal, apresentam maior investimento em I&D relativamente à percentagem do volume de negócio, não esquecendo a distinção como a melhor empresa nacional exportadora no âmbito dos *European Business Awards 2014/2015*^{3,4}.

O meu estágio na Bluepharma teve início no dia 7 de janeiro, terminou a 29 de março e decorreu no Departamento de Investigação e Inovação, mais concretamente no setor de Assuntos Médicos, sob a orientação da Dra. Ana Patrícia Rei. A função principal dos AM consiste na coordenação do desenvolvimento clínico necessário para a aprovação de um novo medicamento, dentro do qual se destaca a gestão de ensaios clínicos de fase I.

As atividades e respetivos conhecimentos adquiridos na frequência do estágio, assim como todos os detalhes relevantes para a minha prestação no mesmo, serão abordados neste relatório no formato de análise SWOT (**Tabela I**).

2. Análise SWOT

Uma análise SWOT - 'Strengths', 'Weakness', 'Opportunities' and 'Threats' - é uma ferramenta simples, inicialmente criada para analisar o posicionamento competitivo de uma empresa e auxiliar o desenvolvimento do seu plano estratégico. Atualmente, é bastante usada como ferramenta para avaliar um projeto, uma organização e/ou uma atividade, tendo como objetivo identificar os seus fatores organizacionais e internos - pontos fortes, pontos fracos - e ambientais e externos - oportunidades, ameaças. Assim, a análise SWOT é uma estratégia adequada para medir os fatores que caracterizaram e distinguiram positivamente o meu Estágio (Pontos Fortes), realçando também os aspetos desvantajosos que o afetaram negativamente (Pontos Fracos), sem esquecer os detalhes externos que tanto contribuíram vantajosamente para a sua melhoria (Oportunidades) bem como os que poderão ter ameaçado a progressão do mesmo (Ameaças) ^{5,6}.

Tabela I – Análise SWOT

Pontos Fortes	Pontos Fracos
<ul style="list-style-type: none">- Acolhimento, integração e ambiente de trabalho.- Formações internas.- Diversidade de tarefas realizadas no âmbito dos Assuntos Médicos.- Pesquisa e avaliação de novas ideias de produto.- Contextualização e acompanhamento de projetos.- Incentivo à auto-aprendizagem, autonomia e sentido crítico.- Colaboração com outros setores e departamentos.	<ul style="list-style-type: none">- Duração do estágio em indústria farmacêutica.- Atividades do setor centradas na gestão de ensaios de bioequivalência para medicamentos genéricos.
Oportunidades	Ameaças
<ul style="list-style-type: none">- Possibilidade de contacto com vertente não convencional das ciências farmacêuticas.- Desenvolvimento e aplicação de competências informáticas.- Uso corrente da língua inglesa em comunicações e realização de tarefas.- Dinâmica de trabalho por <i>Timelines</i> e gestão de prioridades.	<ul style="list-style-type: none">- Contexto regulamentar bastante abrangente e dinâmico dos ensaios clínicos.

2.1. Pontos Fortes

2.1.1. Acolhimento, integração e ambiente de trabalho;

A Bluepharma primou, desde o início do Estágio Curricular, pela preocupação no acolhimento dos novos colaboradores.

No primeiro dia fomos recebidos com uma reunião de apresentação e de contextualização geral da Bluepharma e das suas respetivas normas gerais de funcionamento. Para que pudessemos conhecer os vários departamentos e as infraestruturas da empresa, procedemos à visita guiada na qual fomos apresentados aos vários colaboradores, com especial destaque para o departamento no qual viríamos a trabalhar.

As formações iniciais, enquadradas no programa geral para os recém colaboradores da BLPH, proporcionou um enquadramento importante e uma visão global do funcionamento de uma indústria farmacêutica, tendo, assim, desempenhado um papel importante na nossa integração no mundo da IF, mais concretamente na realidade da Bluepharma.

Ao longo do restante Estágio, proporcionaram-se várias atividades, como por exemplo, a sessão de acolhimento com o CEO, a formação em Recursos Humanos e o aniversário dos 18 anos, que nos permitiram, enquanto estagiários, conhecer cada vez melhor a história, os valores e os objetivos atuais e futuros da empresa, permitindo perceber a “*big picture*” do nosso trabalho corrente.

Na minha perspetiva, o ambiente diário no qual trabalhei, envolto de simpatia e disponibilidade das várias pessoas com quem contactei, foi absolutamente determinante para a minha prestação na Bluepharma. Destaque para o profissionalismo, competência e espírito de melhoria contínua, aliado ao clima de cooperação, união, compromisso e amizade que senti no dia-a-dia do setor de AM, o que foi essencial para que pudesse crescer tanto a nível profissional, no desempenho de tarefas, como a nível pessoal, trazendo comigo novos e diferentes valores para o futuro.

Algo específico que valorizei e considero, em boa verdade, um dos pontos mais fortes do meu estágio curricular é, sem dúvida, a importância dada ao trabalho que realizei, o que me motivou a executar as tarefas que a mim tinha alocadas com ainda maior rigor.

2.1.2. Formações internas

Enquanto estagiário foi bastante importante a adaptação à realidade da Indústria Farmacêutica, ao seu funcionamento e particularidades que a tornam uma atividade única no mundo industrial. Para isso, as formações internas, integrantes do plano de acolhimento de novos colaboradores, desempenharam um papel essencial, fornecendo-me valências úteis e práticas

para o meu quotidiano, dentro das quais saliento: Sistema informático; Sistema documental e de gestão de processos; Boas Práticas de Fabrico (BPF); Ambiente, saúde e segurança no trabalho; Melhoria contínua; Farmacovigilância; Investigação, desenvolvimento e inovação (IDI) e Sistema de gestão integrado.

Além das formações gerais destinadas aos novos colaboradores, tive a possibilidade de frequentar formações mais dirigidas ao departamento de Investigação e Inovação, como foi o caso da formação em Propriedade Intelectual e em Pesquisa Bibliográfica, ferramentas úteis para o trabalho que viria a desenvolver.

2.1.3. Diversidade de tarefas realizadas no âmbito dos Assuntos Médicos

A atividade do setor de AM encontra-se essencialmente centrada na gestão de ensaios clínicos de fase I, na sua larga maioria de bioequivalência, servindo estes de suporte à submissão dos pedidos de Autorização de Introdução de Mercado (AIM) para medicamentos genéricos, efetuados pela Bluepharma ou respetivo parceiro comercial. Assim sendo, foi essencial para o sucesso do meu trabalho o estudo das Boas Práticas Clínicas (GCP), mais concretamente da Guideline ICH E6 (R2). Esta tem como objetivo unificar as normas gerais dos ensaios clínicos para a União Europeia, Japão e Estados Unidos, garantindo os padrões éticos e de qualidade para o desenho, condução, monitorização, auditoria, documentação e relato dos ensaios. O cumprimento desta mesma norma assegura os direitos, segurança e bem-estar dos sujeitos envolvidos e que os dados do ensaio sejam credíveis e fidedignos ⁷. Tive, ainda, oportunidade de testar os conhecimentos adquiridos numa formação online elaborada pela Novartis intitulada de "GCP Compliance Training for HCPs V2.0" tendo sido certificado com um resultado de 92% (**Anexo I**).

Para obter AIM de MG é necessário que a Bluepharma demonstre a Bioequivalência *in vivo*, isto é, que os produtos que desenvolve, além de equivalentes farmacêuticos ou alternativas farmacêuticas, após administração na mesma dose molar, apresentem biodisponibilidades similares ao produto referência dentro de certos limites estabelecidos passíveis de assegurar a sua comparabilidade *in vivo* em termos de eficácia e segurança^{8,9}.

Assim, as bases de dados desempenham um papel de extrema importância na atividade corrente dos AM, tendo estas sido objeto de formação interna no setor, uma vez que as mesmas garantem o acesso a dados fidedignos dos produtos referência absolutamente essenciais para o desenvolvimento do respetivo medicamento genérico.

Os sites da FDA (*Food and Drug Administration*) e da EMA (*European Medicines Agency*), nomeadamente as suas bases de dados de medicamentos, contêm documentos com

informações de relevo para o setor de AM relativas aos produtos aprovados nestes espaços. São exemplos destes importantes documentos os *European public assessment reports (EPAR)* para os produtos centralizados da EMA e, por exemplo, *Summary Review, Medical Review(s), Pharmacology Review(s)* e *Clinical Pharmacology Biopharmaceutics Review(s)* no caso da FDA.

Além destes documentos, tanto a EMA como a FDA contêm *Product specific bioequivalence guidance* e *Product-Specific Guidances for Generic Drug Development* respetivamente, com recomendações para a condução de estudos BD/BE, que incluem o número e tipo de estudos, desenho proposto, dosagens, condições especiais de sujeitos, analitos a ser medidos, entre outras, sendo uma base excepcional para o desenvolvimento de MG por parte da IF, facilitando conseqüentemente o acesso das populações a medicamentos de qualidade a preços competitivos.

Por sua vez, a plataforma *Cortellis* desenvolvida pela *Clarivate Analytics*, através de múltiplas ferramentas de pesquisa, permite obter uma elevada perceção de mercado para o produto, molécula, forma farmacêutica, doença, entre outros, através da monitorização de novas patentes concedidas, listagem de produtos e respetivas formulações e/ou associações em pipeline, análise de ensaios clínicos programados, em desenvolvimento e terminados. Além disso, ainda permite ter acesso a uma análise de atratividade de mercado através de uma previsão de vendas fidedigna.

O website *ClinicalTrials.gov* é a maior fonte mundial de ensaios clínicos conduzidos em todo o mundo e de acesso livre fornecido pela *U.S. National Library of Medicine*. Sendo a *Bluepharma* maioritariamente promotora de ensaios clínicos de Fase I, esta plataforma tem um papel importante fornecendo dados sobre os ensaios realizados pelos inovadores, como o desenho, objetivo, número de participantes, *endpoints*, bem como ensaios em pipeline que podem indicar futuros novos mercados e/ou indicações para o produto.

Assim, estas e outras bases de dados, como por exemplo, a já tradicional *Pubmed*, foram essenciais para algumas tarefas correntes, nomeadamente para o desenvolvimento de *Project Order Clarifications*, documento que compila informação detalhada sobre molécula e respetivo produto em análise, desde a dosagem e indicações terapêuticas, às características físico-químicas, dados de farmacocinética, farmacodinâmica, segurança, ensaios clínicos de fase I realizados e respetivos resultados, assim como a informação presente nas guidances de BE da EMA e FDA, já referidas.

A *Bluepharma*, enquanto promotor de EC, tem o dever de implementar um sistema de controlo da qualidade durante todas as etapas do ensaio, o que inclui não só um desenho e gestão eficaz do ensaio, mas também uma recolha e processamento de dados e documentos.

Assim, foi-me possibilitado a análise e revisão da documentação crucial para a gestão de ensaios clínicos, como: documento resumo para aprovação do ensaio pelas autoridades regulamentares (no caso concreto de ensaios a decorrer em Portugal esta aprovação diz respeito à autoridade máxima do medicamento - Infarmed - e à Comissão de Ética para a Investigação Clínica); protocolo clínico; contrato entre Bluepharma (promotor), CROs (*Contract Research Organization*) e Biolaboratório; documentação de envio dos *Investigation Medical Products* (teste e referência); relatórios de monitorização - Site Initiation Visit (SIV), Monitoring Visit (MOV) e *Close-Out Visit* (COV); Resultados preliminares; e, por fim, *Study Final Report*.

Ao longo do estágio, ganhei consciência da importância da garantia da qualidade dos procedimentos no mundo da Indústria Farmacêutica. Para isso, a Bluepharma documenta os seus procedimentos internos em SOPs (*Standard Operating Procedures*). O setor de AM não é exceção, uma vez que chega mesmo a ser exigido pela norma de GCP que os seus documentos operacionais sejam “claros; concisos e consistentes”⁷. Foi absolutamente gratificante, aquando a revisão do SOP do circuito de *Investigational Medicinal Product* (IMP), ter integrado uma equipa dinâmica composta por pessoas dos AM, Departamento de Apoio ao Galénico, Gestão de Projetos, entre outros, tendo sido responsável por elaborar quatro Fluxogramas para as seguintes situações: Bluepharma como Promotor do Ensaio e fabricante do IMP; Fabricante do IMP e responsável pelo circuito do medicamento experimental; Apenas Fabricante do IMP; Apenas promotor do Ensaio Clínico. Considero a presença destes Fluxogramas uma mais valia para o SOP, visto que o completa com informação adicional no caso de excursões de temperatura, apresenta o circuito como um processo entre os vários setores, formulado na base de perguntas e respostas o que facilita a sua compreensão, e faz referência a outros SOPs associados de forma lógica e clara.

Penso que esta atividade foi dos pontos mais fortes do meu estágio curricular, uma vez que através dela consegui perceber o quão exigentes são os procedimentos na Indústria Farmacêutica - muito devido ao crescente desenvolvimento científico, bem como à cooperação que é necessária em muitos dos processos entre os profissionais de diferentes áreas - e o quão tênue pode ser a linha que separa as atividades dos diferentes departamentos.

Por último, no âmbito do desenho de ensaios clínicos, da Bluepharma enquanto promotor, fui responsável por analisar vários softwares de cálculo de número de sujeitos necessários para ensaios específicos de bioequivalência, que abrangessem vários tipos de ensaios, como ensaios *Crossover*, *Replicados* e *Paralelos*, e, além disso, que permitissem o cálculo consoante

determinados parâmetros predefinidos (*Power, Intra-subject Coeficiente Variability, Test/Reference Ratio* e *Lower and Upper Equivalence Limit*). Não obstante o número de sujeitos ser, normalmente, uma tarefa alocada à CRO aquando o pedido de cotação para o ensaio clínico, é relevante o uso desta ferramenta por parte do promotor, uma vez que permite analisar a viabilidade económica e operacional dos possíveis novos ensaios.

A folha de Excel "*Free Analysis Research Tool for Sample Size Iterative Estimation*", desenvolvida pelo professor David Dubins da Faculdade de Farmácia da Universidade de Toronto, oferece uma alternativa intuitiva, não obstante ser robusta e completa. É importante salientar que durante esta tarefa foi necessário contactar com entidades externas pedindo acesso a triais dos seus programas, bem como para esclarecer dúvidas relativas à utilização dos seus *softwares*.

2.1.4. Pesquisa e avaliação de novas ideias de produto

O setor de AM é parte integrante do departamento de Investigação e Inovação, tendo assim, uma forte componente investigacional maioritariamente relacionada com o desenvolvimento clínico de novos produtos e análise de ideias.

Dentro desta temática desenvolvi vários trabalhos de pesquisa e avaliação crítica. Os mais relevantes corresponderam à análise criteriosa de todo o historial de desenvolvimento clínico de produtos inovadores, pré e pós aprovação, com especial atenção para as dosagens, formulações, critérios de seleção de sujeitos e objetivos de cada EC. Esta análise é extremamente importante para qualquer Indústria Farmacêutica com atividade centrada no desenvolvimento de produtos genéricos, uma vez que qualquer nova indicação, nova dosagem e/ou nova formulação do produto referência pode alterar completamente o desenvolvimento e o respetivo mercado do genérico.

Um dos grandes objetivos da Bluepharma é ser reconhecida como uma empresa inovadora, daí a sua grande aposta no desenvolvimento de novos produtos e tecnologias inovadoras que permitem suprir as necessidades médicas não respondidas (designadas por “*unmet medical needs*”). Não posso deixar de mencionar um dos trabalhos mais desafiantes e gratificantes que realizei: a análise de aproximadamente dez casos de estudo, incluindo o desenvolvimento não clínico e clínico, e a elaboração de linhas temporais sumárias dos ensaios clínicos necessários para a aprovação dos vários produtos permitindo uma visual comparação dos requisitos clínicos para a obtenção de AIM para cada uma das formas farmacêuticas diferenciadoras.

Foi realmente um enorme privilégio poder ter feito parte de um departamento que está em notório crescimento sustentável e que cada vez mais traz uma enorme vantagem competitiva à Bluepharma, não só em Portugal como no resto do mundo.

2.1.5. Contextualização e acompanhamento de projetos

O notório crescimento da Bluepharma é espelhado na diversidade de projetos em que a empresa está envolvida. Para um novo colaborador, a falta de “*background*” sobre os mesmos pode-se tornar uma ameaça em certas circunstâncias devido a, por exemplo, falta de conhecimento interno.

Felizmente, muito devido à dinâmica e personalidade do grupo de pessoas com o qual trabalhei, foi-me sempre transmitido todo o conhecimento anterior necessário relativo aos projetos em que estive envolvido, e também esclarecida qualquer questão mais específica que surgiu, o que facilitou deveras as minhas tarefas e me permitiu trabalhar com um propósito bem mais definido em mente, o que se torna bastante mais gratificante.

2.1.6. Incentivo à auto-aprendizagem, autonomia e sentido crítico

O estágio curricular no setor de AM da Bluepharma foi, sem dúvida, preponderante para o desenvolvimento da minha capacidade de auto-aprendizagem e autonomia. Não obstante todas as principais ferramentas me terem sido fornecidas nas respetivas formações internas do setor, a minha curiosidade e constante necessidade de saber mais levou a que em muitas tarefas recorresse a bibliografia adequada para me instruir a nível clínico, desde, por exemplo, os complexos tipos de desenho de ensaios clínicos à formulação de injetáveis complexos. Além disso, ao longo do estágio constatei a evolução na minha autonomia, procurando, cada vez mais, soluções fundamentadas para os vários problemas e dificuldades que iam surgindo, capacidade que me foi extremamente bem transmitida pela minha tutora, Dra. Ana Patrícia Rei.

Algo que também considero fundamental para qualquer farmacêutico de sucesso é o seu sentido crítico. Durante o estágio desenvolvi vários trabalhos que necessitaram de análise e seleção de informação relevante, requerentes de resposta simples a questões complexas, procurando dar a minha opinião sempre que considerei oportuno e relevante para o futuro dos projetos.

2.1.7. Colaboração com outros setores e departamentos

A colaboração com profissionais de outros setores foi bastante enriquecedora uma vez que me demonstrou a ligação que é necessária existir numa IF para que um projeto seja bem-sucedido.

Durante o decorrer do estágio tive a oportunidade de presenciar a necessária interligação de conhecimentos entre os vários especialistas na IF, como foi o caso das reuniões relativas ao SOP do circuito de IMP, mencionado previamente, numa pesquisa realizada para o

Desenvolvimento de Negócio, relativa à análise de Guidelines para a prática Clínica de vários produtos com potencial interesse para a Bluepharma, incluindo os respetivos nichos terapêuticos, potencial de associações e estudo comparativo entre produtos, e também numa apresentação preparada para o departamento de Gestão de Projetos relativa à dispersão de determinados comprimidos em molho de maçã e respetivos benefícios para doentes que apresentam dificuldades a deglutir, detalhando os estudos *in vitro* e *in vivo* necessários para confirmar a Bioequivalência após desintegração do *tablet* no molho.

2.2. Pontos Fracos

2.2.1. Duração do estágio em Indústria Farmacêutica

Um ponto fraco do estágio em Indústria Farmacêutica é realmente a sua curta duração. Uma IF é uma estrutura complexa e seria importante para um estagiário passar pelos diversos setores para perceber as suas dinâmicas e também para o ajudar a perceber o que pretende para a sua futura vida profissional. Além disso, mais tempo de estágio significaria também mais tempo para formações especializadas dentro de cada setor.

Ao fim de 3 meses, na parte final do estágio, é realmente quando o aluno se sente mais integrado e capaz no desempenho das suas tarefas, podendo ser positivo ver o nível que conseguiria atingir caso a duração do estágio fosse mais prolongada.

Apesar disso, é de realçar o esforço que a Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra faz para proporcionar aos seus alunos a possibilidade de frequentar este tipo de estágio, traduzindo-se numa vantagem competitiva no acesso ao mercado de trabalho relativamente aos alunos das outras faculdades do país.

2.2.2. Atividades do setor centradas na gestão de ensaios de bioequivalência para medicamentos genéricos

Como a Bluepharma ainda não comercializa medicamentos inovadores, não são realizadas, pelo setor de Assuntos Médicos, atividades relacionadas com o contacto com os profissionais de saúde e promoção dos produtos junto dos especialistas de determinada área terapêutica, atividade pelo qual tenho enorme curiosidade e considero cada vez mais relevante no setor Farmacêutico¹⁰.

Todavia, este facto que pode ser considerado um ponto menos forte, tornou-se, na verdade, numa oportunidade, uma vez que me permitiu uma aprendizagem em detalhe da parte clínica do desenvolvimento de um medicamento, desde a investigação ao próprio decurso de um ensaio clínico.

2.3. Oportunidades

2.3.1. Possibilidade de contacto com vertente não convencional das Ciências Farmacêuticas

As Ciências Farmacêuticas são parte integrante das Ciências da Saúde, sendo usualmente caracterizadas pela sua enorme abrangência e multidisciplinaridade. Felizmente, durante o Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, é conferido aos seus estudantes a possibilidade de aprendizagem sobre os conceitos base dos diferentes ramos, onde os Ensaio Clínicos não são exceção. No entanto, sendo uma área não exclusivamente farmacêutica, nomeadamente a gestão de EC, é compreensível que o respetivo plano de estudos seja limitado nesta temática.

Assim sendo, o Estágio enquanto unidade curricular, foi uma mais valia enorme que me proporcionou a possibilidade de adquirir conhecimentos relativos a uma área crucial da Indústria Farmacêutica, tendo sido bastante importante para definir os meus objetivos profissionais.

2.3.2. Desenvolvimento e aplicação de competências informáticas

Na realização das mais variadas tarefas foi-me proporcionada a possibilidade de, na maioria das situações, usar a plataforma que julguei ser a mais adequada, o que me permitiu explorar e aperfeiçoar as minhas competências informáticas na ótica do utilizador nas mais variadas ferramentas, desde a folha de cálculo Microsoft Excel®, Microsoft PowerPoint®, Microsoft Word® entre outros. Além disso, usufruí da plataforma usada para comunicações e planeamento de reuniões Microsoft Outlook® e ainda do Cisco Jabber® para comunicações internas.

As tarefas que exigiriam uma maior procura constante de soluções informáticas na sua realização foram: a criação de uma folha de cálculo para a monitorização de pedidos dos outros setores da Bluepharma aos Medical Affairs, na qual incluí fórmulas de cálculo automático de pedidos abertos e fechados no respetivo mês e atualização, também ela automática, de um gráfico mensal e anual do número de pedidos abertos e fechados por departamento; o desenho dos fluxogramas para vários SOPs dos AM; a experimentação de programas para o cálculo do número de sujeitos por ensaio clínico e de uma folha de cálculo Microsoft Excel® simples capaz de estudos de correlação *in vivo in vitro*.

2.3.3. Uso corrente da Língua Inglesa em comunicações e realização de tarefas

O domínio da Língua Inglesa é, no meu ponto de vista, uma competência que todo e qualquer Farmacêutico, independentemente da sua área de trabalho, tem o dever de desenvolver. O estágio em Indústria Farmacêutica, não só melhorou o meu nível linguístico, como também me deu a oportunidade de aprender os termos técnicos relevantes associados aos ensaios clínicos.

No setor dos Assuntos Médicos, todas as comunicações com parceiros, quer sejam portuguesas ou não, são feitas em Inglês, o que me permitiu um contacto diário com a língua durante a totalidade do estágio. Além disso, praticamente todas as minhas atividades, realizadas quer para clientes quer para outros membros da Bluepharma, foram escritas em Inglês.

2.3.4. Dinâmica de trabalho por *Timelines* e gestão de prioridades

A dinâmica de trabalho interna dos Assuntos Médicos, juntamente com o cariz extremamente prático do meu estágio curricular, permitiu que tivesse vários projetos em mãos ao mesmo tempo, o que me incitou a gerir o meu tempo útil de modo a dar resposta a todos os pedidos da melhor forma possível, tendo em conta as *timelines* propostas.

Esta gestão de prioridades foi uma ferramenta que foi extremamente bem transmitida por todos os colaboradores dos Assuntos Médicos e que, com o seu contributo, tive a possibilidade de desenvolver e aperfeiçoar durante o estágio, o que certamente influenciará a minha vida profissional de uma forma positiva.

2.4. Ameaças

2.4.1. Contexto regulamentar bastante abrangente e dinâmico dos ensaios clínicos

Os ensaios clínicos sendo “estudos conduzidos no Homem destinados a descobrir ou verificar os efeitos de um ou mais medicamentos experimentais” é expectável que a legislação seja extensa, complexa e que se encontre em constante alteração de modo a garantir cada vez mais a eficiência e segurança dos mesmos^{11,12}.

Além disso, e apesar da norma das Boas Práticas Clínicas da ICH trazer princípios orientadores para os membros aderentes, é de salientar que cada país tem a sua autoridade competente e própria legislação, sendo que os ensaios da Bluepharma a decorrer em país terceiro deverão sempre respeitar as normas desse mesmo país. A título de exemplo, Portugal segue a norma Europeia “Regulamento (UE) N° 536/2014 do Parlamento Europeu e do Conselho de 16 de abril de 2014”¹¹.

Assim, as constantes alterações e *addendums* à legislação em vigor, têm um grande impacto nos SOPs e em outros procedimentos internos dos Assuntos Médicos que podem ser sujeitos a auditorias por parte das autoridades regulamentares ou até mesmo pelos clientes.

Para um novo colaborador, esta vasta legislação e as suas respetivas atualizações são certamente uma ameaça à sua prestação, uma vez que além das novas competências que necessita de adquirir, nunca pode esquecer de se manter atualizado relativamente à legislação que tem de cumprir.

3. Conclusão

O Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas apresenta um plano de estudos extenso e bem delineado com o objetivo de abranger todas as etapas do ciclo de vida do medicamento, e serve como uma base extremamente valiosa em qualquer profissão futura. No entanto, sendo o Farmacêutico mais que um especialista do medicamento, um profissional de saúde versátil, o Estágio Curricular desempenha um papel essencial no colmatar das compreensivas lacunas na nossa formação académica.

Pessoalmente, foi um enorme privilégio a oportunidade de realizar o estágio curricular numa Indústria com padrões de excelência, como é a Bluepharma. Durante o meu percurso académico realizei vários estágios extracurriculares, na sua larga maioria em Investigação básica, todavia, não possuía ainda conhecimento das aplicabilidades desta mesma área a nível Industrial. Os Assuntos Médicos são uma área em claro crescimento, desempenhando um papel essencial no apoio científico e clínico à Indústria, tendo sido uma honra integrar uma equipa tão jovem, competente e proativa como a dos Assuntos Médicos da Bluepharma.

Não posso deixar de destacar os valores de competência, qualidade e integridade transmitidos aos novos colaboradores, que, juntamente com o bom ambiente geral, facilitam bastante a integração na empresa.

Em suma, considero que o estágio será, certamente, uma vantagem competitiva para o meu futuro profissional, não apenas por todos os conhecimentos que adquiri nas áreas dos Assuntos Médicos, mas principalmente por toda a experiência ganha e *soft skills* que desenvolvi, nomeadamente, o meu sentido crítico e autonomia.

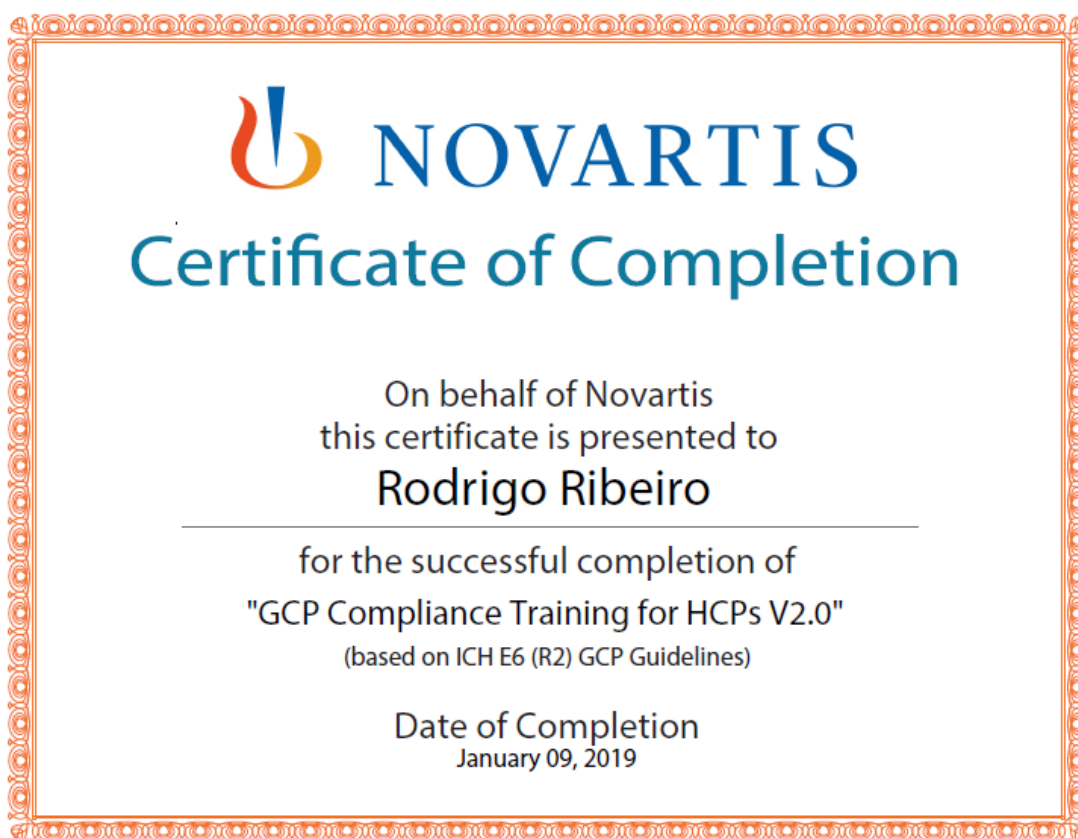
O Estágio Curricular, foi, sem dúvida, uma experiência bastante positiva que me tornou uma pessoa mais enriquecida, tanto a nível pessoal como profissional.

4. Bibliografia

1. BLUEPHARMA - **Quem somos**. [Acedido a 3 de março 2019]. Disponível na Internet: <https://www.bluepharma.pt/about-us.php>
2. BLUEPHARMA - **Missão, Visão e Valores**. [Acedido a 3 de março 2019]. Disponível na Internet: <https://www.bluepharma.pt/about-mvv.php>
3. BLUEPHARMA - **Investigação & Desenvolvimento**. [Acedido a 3 de março 2019]. Disponível na Internet: <https://www.bluepharma.pt/innovation/>
4. BLUEPHARMA - **História**. [Acedido a 3 de março 2019]. Disponível na Internet: <https://www.bluepharma.pt/about-history.php>
5. INVESTOPEDIA - **Strength, Weakness, Opportunity, and Threat (SWOT) Analysis**. [Acedido a 9 de fevereiro 2019]. Disponível na Internet: <https://www.investopedia.com/terms/s/swot.asp>
6. GÜREL, E.,TAT, M. - **SWOT Analysis: A Theoretical Review**. The Journal of International Social Research. 10 (2017) 994-1006.
7. ICH - **Integrated Addendum to ICH E6 (R1): Guideline For Good Clinical Practice E6 (R2)**. [Acedido a 10 de março 2019]. Disponível na Internet: https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Efficacy/E6/E6_R2__Step_4_2016_1109.pdf
8. CHOW, S. C. - **Bioavailability and Bioequivalence in Drug Development**. Wiley interdisciplinary reviews. Computational statistics. 6,4 (2014) 304-312.
9. EUROPEAN MEDICINES AGENCY - **Guideline on The Investigation Of Bioequivalence** [Acedido a 10 de março 2019]. Disponível na Internet: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-investigation-bioequivalence-rev1_en.pdf
10. CARROTPHARMA - **What is Medical Affairs?** [Acedido a 16 de março 2019]. Disponível na Internet: <https://www.carrotpharma.co.uk/what-is-medical-affairs>
11. INFARMED - **Ensaios clínicos** [Acedido a 16 de março 2019]. Disponível na Internet <http://www.infarmed.pt/web/infarmed/entidades/medicamentos-uso-humano/ensaios-clinicos>
12. Comissão Europeia - **EudraLex - Volume 10 - Clinical trials guidelines** [Acedido a 23 de março 2019]. Disponível na Internet: https://ec.europa.eu/health/documents/eudralex/vol-10_pt

5. Anexo

Anexo I – Certificado de Conclusão do "GCP Compliance Training for HCPs V2.0"



Parte II

Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária



Orientado por: Dr. João Santiago Maia



FACULDADE DE FARMÁCIA
UNIVERSIDADE DE
COIMBRA

Lista de Abreviaturas

ANF - Associação Nacional das Farmácias

CHUC - Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra

FFUC - Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

HUC - Hospital da Universidade de Coimbra

IVA - Imposto sobre o Valor Acrescentado

MICF - Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

MNSRM - Medicamentos não sujeitos a receita médica

PVP - Preço de venda ao público

RCM - Resumo das Características do Medicamento

REM - Receitas Eletrónicas Materializadas

RM - Receitas Manuais

RSP - Receitas Sem Papel

SA - Substância Ativa

SWOT - *Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats*

I. Introdução

A farmácia comunitária, mais do que um local de dispensa de medicamentos, é, nos dias de hoje, um local de prestação de cuidados de saúde e, muitas vezes, o primeiro ponto de contacto entre o utente e um profissional de saúde. Assim sendo, o farmacêutico não pode apenas ser visto como um especialista do medicamento, mas sim como um agente de saúde pública imprescindível para o bem-estar da população¹.

O Estágio Curricular em farmácia comunitária trata-se de uma ferramenta essencial incluída no Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF), uma vez que dá aos futuros farmacêuticos a oportunidade de consolidar e colocar em prática os conhecimentos obtidos ao longo da sua formação académica, bem como adquirir novas competências exclusivamente passíveis de ser transmitidas em contexto profissional.

O meu Estágio decorreu entre 2 de abril e 19 de julho de 2019 na Farmácia Machado, em Coimbra, sob a orientação do Dr. João Maia, diretor técnico da Farmácia Machado. A Farmácia Machado encontra-se ao serviço da população desde o ano de 1927 na Rua Bernardo de Albuquerque, tendo no ano transato sido transferida para um novo e moderno espaço capaz de dar valência às suas necessidades atuais. É caracterizada pelo reconhecimento e valorização por parte dos utentes habituais, onde o ambiente familiar, boa-disposição, proximidade, disponibilidade e preocupação funcionam como pontos fortes a seu favor.

O presente relatório tem como objetivo analisar criticamente o meu Estágio Curricular em farmácia comunitária - os seus parâmetros mais positivos, bem como todas as dificuldades com que me deparei, sem esquecer os desafios que, no decorrer do mesmo, contribuíram para o meu crescimento enquanto profissional - sob a forma de uma análise SWOT (**Tabela I**) cujo o propósito foi previamente abordado no Relatório de Estágio de Indústria Farmacêutica^{2,3}.

2. Análise SWOT

Tabela I – Análise SWOT

Pontos Fortes	Pontos Fracos
<ul style="list-style-type: none">- Integração e promoção da autonomia.- Atividades de gestão e dinamização.- Atendimento ao público.- Fidelização e apoio aos utentes.- Localização e protocolos.	<ul style="list-style-type: none">- Medicamentos manipulados.- Receita manual e subsistemas de comparticipação.
Oportunidades	Ameaças
<ul style="list-style-type: none">- Formações internas e externas.- Consultas de nutrição e suplementação alimentar.	<ul style="list-style-type: none">- Medicamentos esgotados e/ou sem <i>stock</i> na farmácia.- Desconhecimento dos utentes e setor médico relativo à tecnologia do medicamento.

2.1. Pontos Fortes

2.1.1. Integração e promoção da autonomia

A Farmácia Machado, habituada a receber estagiários a pedido da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (FFUC), trabalha de forma ímpar de modo a integrá-los na equipa, primando pela boa disposição e confiança depositada na competência previamente adquirida ao longo do percurso académico.

Desde o primeiro dia de estágio foi notória a capacidade da equipa técnica em instruir os estagiários, estando sempre disponível para esclarecer qualquer questão suscitada. Confiantes das nossas valências, a Farmácia Machado acredita que a melhor forma de aprendizagem e integração é em contexto prático, dando autonomia aos novos colaboradores para desempenharem as tarefas presentes no dia-a-dia da farmácia.

A confiança depositada aliada à disponibilidade para ajudar na resolução de problemas derivados da inexperiência, foram essenciais para tirar o máximo partido dos meus conhecimentos e aptidões, contribuindo, desta forma, para o sucesso do Estágio Curricular.

2.1.2. Atividades de gestão e dinamização

Os primeiros dias de estágio foram importantes para relembrar os conhecimentos que havia obtido no Estágio de Verão relativos à gestão da farmácia, nomeadamente as atividades de conferência e receção de encomendas, armazenamento dos medicamentos e outros produtos, contagem física e verificação dos prazos de validade perante o Sifarma 2000[®], regularização de devoluções, contacto com os distribuidores e outras empresas relevantes para o dia-a-dia da farmácia - maioritariamente devido aos medicamentos esgotados - entre outros. Estas atividades são de extrema importância para um futuro farmacêutico, uma vez que providenciam o primeiro contacto com os produtos comercializados na farmácia e respetivos nomes comerciais, o local em que são organizados, as suas vendas médias e outras variadas informações que facilitam a futura atividade de venda ao público do novo colaborador.

Numa vertente mais comercial fui responsável por consultar regularmente vários indicadores úteis à gestão da farmácia, como foi o caso da faturação mensal e taxa de participação no cartão Saúde por colaborador. Além disso, realizei encomendas instantâneas e presenciei encomendas diárias e diretas, baseadas no *stock* atual dos produtos, número médio de vendas, sazonalidade e número de *stock* mínimo e máximo. Entender a rentabilização de *stocks*, conceitos como preço de venda ao público (PVP), cálculo de margens - nomeadamente de medicamentos não sujeitos a receita médica (MNSRM) - de acordo com o IVA do produto, entre outros fatores, é crucial para que um jovem farmacêutico compreenda a importância de a farmácia possuir uma sustentabilidade financeira equilibrada.

Participar na dinamização ativa da Farmácia Machado foi também bastante gratificante, pois pude colocar em prática os conhecimentos de Marketing e Organização e Gestão Farmacêutica nomeadamente na disposição dos vários produtos nas gôndolas e lineares, mas também no incentivo ao uso das redes sociais para divulgação de campanhas, rastreios e ofertas especiais, auxiliando na sua promoção, bem como no uso de registos fotográficos de qualidade aquando divulgação das mesmas.

2.1.3. Atendimento ao público

O atendimento ao público representou, sem dúvida, a atividade mais exigente e gratificante de todo o Estágio Curricular. O atendimento é uma atividade de enorme responsabilidade, onde o farmacêutico, seguindo valores de enorme importância, deve promover, em todas as ocasiões, o bem-estar do utente.

O apoio de todos os colaboradores da Farmácia Machado nos primeiros atendimentos realizados - e em todos os momentos que eu entendesse necessário tal auxílio - foi sem dúvida fundamental no esclarecimento de dúvidas relativas ao funcionamento do Sifarma 2000[®], o

auxílio nas questões dirigidas aos diversos regimes de comparticipação complementar, diferente formato de receitas e registo da dispensa de medicamentos psicotrópicos.

Na minha perspetiva, a postura do farmacêutico e a empatia transmitida ao balcão são o melhor cartão de visita possível para qualquer farmácia. Demonstrar interesse pelas necessidades e questões de cada pessoa em particular e praticar uma escuta ativa é a melhor forma de obter respostas a perguntas essenciais integrantes da Indicação Farmacêutica ou do atendimento em si, ao mesmo tempo que o utente se sente respeitado, importante e seguro do que tentamos transmitir, promovendo a adesão à terapêutica a nível da farmácia comunitária.

2.1.4. Fidelização e apoio aos utentes

A Farmácia Machado é reconhecida pelo apoio constante que fornece aos seus utentes e pela preocupação transmitida, seja nas várias tentativas imediatas de arranjar medicamentos indispensáveis para o utente junto dos fornecedores ou de outras farmácias, seja na disponibilidade para os fazer chegar no menor espaço de tempo possível ao respetivo utente, ou mesmo no apoio prestado na farmácia consoante o seu estado de saúde.

Enquanto estagiário procurei sempre agradar ao utente com o serviço prestado pela farmácia. Primei por criar novas fichas de utente no Sifarma 2000[®], uma vez que desta forma, pesquisando apenas pelo nome (ou outro dado biográfico como número de contribuinte, ou contacto) é possível ter acesso ao historial de venda de produtos à pessoa em questão - o que traz inúmeras vantagens, nomeadamente em termos dos medicamentos e respetivos laboratórios que tem por hábito levar - ao cartão farmácias se previamente associado, nº de contribuinte para o caso de o desejar na fatura, e até mesmo planos de comparticipação diferenciados, entre outras informações convenientes. Este simples ato traz diversas vantagens para a farmácia, como já referido, mas também para o utente uma vez que sabe que na farmácia em questão tem registo dos seus produtos e acesso facilitado aos seus diversos dados.

2.1.5. Localização e protocolos

A Farmácia Machado tem uma localização “privilegiada” uma vez que junto dela se encontra a Unidade de Saúde Familiar Cruz de Celas, o Instituto Português de Oncologia Francisco Gentil, e o Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (CHUC) do qual são parte integrante o Hospital da Universidade de Coimbra (HUC) e o Hospital Pediátrico, e muitos outros consultórios privados. Apesar de ser claramente um ponto forte para o desenvolvimento da Farmácia Machado, também o é para qualquer estagiário uma vez que permite o contacto com variada medicação que noutra farmácia não teria acesso, pelo menos, tão frequentemente.

No que diz respeito aos protocolos, a Farmácia Machado mantém em vigor protocolos com a Liga Portuguesa Contra o Cancro - que paga à farmácia parte ou até mesmo a totalidade dos medicamentos dos seus utentes - com a ValorMed - sociedade sem fins lucrativos que gere os resíduos de embalagens de medicamentos contendo ou não restos dos mesmos⁴ - e, por fim, com as Farmácias Portuguesas, sendo aderente do cartão Saúde - fidelizando os utentes às Farmácias Portuguesas através do acumular de pontos em todas as compras e respetivo rebate em artigos do catálogo ou em vales de desconto monetários. Todos estes acordos mantidos em vigor são importantes para demonstrar a diversidade das farmácias como um local preocupado desde o ambiente aos seus utentes e respetivas necessidades.

2.2. Pontos Fracos

2.2.1. Medicamentos manipulados

Durante o MICEF, nas unidades curriculares de Farmácia Galénica e Tecnologia Farmacêutica, os alunos adquirem competências que os tornam capazes de preparar medicamentos manipulados com a eficácia e o devido rigor. Com a industrialização e avanços científicos das diversas formas farmacêuticas, a procura por medicamentos manipulados diminuiu dada a decrescente necessidade dos mesmos, sendo que em caso de ajuste posológico em pediatria ou inexistência de preparações específicas no mercado, os medicamentos manipulados permanecem uma realidade. Ainda que considerando a baixa procura, constatei que a Farmácia Machado apresenta uma precária oferta relativamente aos medicamentos manipulados, apenas tendo sido preparada uma solução saturada de ácido bórico durante o período do meu estágio. Consciente das *Boas Práticas de Preparação de Medicamentos Manipulados (BPPMM)* e das diversas técnicas necessárias para a preparação dos mesmos, penso que na qualidade de estagiário teria sido importante colocar em prática estes conhecimentos no contexto da Farmácia Comunitária.

2.2.2. Receita manual e subsistemas de participação

No decorrer do estágio contactei com os vários tipos de prescrições: receitas manuais (RM), receitas eletrónicas materializadas (REM) e receitas sem papel (RSP). Pude constatar que, apesar de apenas justificadas por falência informática, prescrição no domicílio, entre outras, as RM continuam a ser bastante rotineiras na Farmácia Machado.

Pouco práticas - uma vez que é necessário verificar o nome e número de utente, exceção para uso da RM alegada pelo prescritor, o respetivo prazo de validade, subsistema de participação, entre outros detalhes - e pouco ecológicas, as RM estão associadas a um

conjunto de dificuldades, dentro das quais a mais imediata é a caligrafia do médico prescritor que impede, muitas vezes, a leitura dos produtos prescritos pelo mesmo. Além disso, estas prescrições necessitam, aquando do atendimento, da inserção do código dos subsistemas de participação complementar, trazendo vários problemas associados como o esquecimento do utente em solicitar o uso deste tipo de participação até ao término da venda, e a dificuldade na procura do respetivo código no Sifarma 2000®.

Enquanto estagiário, todas estas presumíveis dificuldades incrementam a necessidade de ajuda por parte dos colaboradores da farmácia no atendimento - mesmo que por vezes apenas para verificar que tudo foi bem realizado - o que pode causar alguma desconfiança natural por parte do utente.

2.3. Oportunidades

2.3.1. Formações internas e externas

As formações são bastante importantes no setor farmacêutico uma vez que dado o seu constante desenvolvimento é necessário manter os profissionais atualizados e munir as equipas de conhecimento que permita no dia-a-dia da farmácia fazer face a todos estes novos desafios⁴. Assim, na categoria de colaborador da Farmácia Machado estive presente em diversas sessões organizadas por empresas de distribuição farmacêutica em parceria com os laboratórios promotores da formação. As formações, regra geral, foram orientadas de forma a fornecerem uma primeira abordagem clínica do problema de saúde e só posteriormente as vantagens do produto da marca promotora na prevenção e/ou solução desse mesmo problema, no formato de casos práticos. Das várias formações destaco as seguintes: Intervenção Farmacêutica no Olho Seco - Bausch+Lomb (**Anexo I**); Síndrome do Intestino Irritável com Diarreia e Diarreia em Geral - Alliance Healthcare (**Anexo II**); A Fórmula Martiderm: Inovação e Novidades - Martiderm (**Anexo III**); Prevenção e Tratamento das Infecções por Ectoparasitas em Animais de Companhia - Boehringer Ingelheim; Ortopedia e as Novas Tecnologias - Intervenção do Farmacêutico - Gameiros.

Por sua vez, decorreram várias formações internas conduzidas por delegados de informação médica de diferentes marcas com o objetivo de publicitar os novos produtos do respetivo laboratório, assim como as vantagens competitivas do mesmo.

Estas formações foram, sem dúvida, uma enorme oportunidade enquanto estagiário, visto que transmitiram além da parte fisiopatológica, uma vertente mais prática e comercial que certamente ajudou no decurso do estágio no aconselhamento das diferentes alternativas terapêuticas ao utente de uma forma mais clara, concisa e informada.

2.3.2. Consultas de nutrição e suplementação alimentar

A Farmácia Machado disponibiliza semanalmente consultas de nutrição promovidas pela marca EasySlim® integrantes do plano Dieta EasySlim® que tem como objetivo oferecer uma solução rápida, saudável e eficaz a quem deseja perder peso. A Dieta é dividida em 3 fases e conta com uma gama de produtos variados desde drenantes e anticelulíticos a alimentos hiperproteicos e hipoglicídicos, que já ajudaram cento e cinquenta mil pessoas a perder peso em Portugal^{6,7}. Esta parceria permitiu o contacto com uma maior variedade de suplementos alimentares, funcionou como alerta para a problemática do excesso de peso e obesidade no nosso país, e formação geral relativa a que aconselhamento praticar ao nível da alimentação, exercício físico e estilo de vida saudável.

2.4. Ameaças

2.4.1. Medicamentos esgotados e/ou sem stock na farmácia

A falta de medicamentos nas farmácias portuguesas atingiu números recorde no primeiro semestre do presente ano. A Associação Nacional das Farmácias (ANF) concluiu que em média, todos os dias, há 17200 utentes que não têm acesso ao medicamento pretendido no momento do atendimento e que um em cada cinco utentes - em média 1,4 milhões de portugueses - recorreu ao médico para alterar a medicação devido à problemática dos medicamentos esgotados. É importante ressaltar que a falta de medicamentos pode advir de uma de duas principais razões: 1) rutura de *stock*: principalmente devido à exportação paralela onde as indústrias obtêm maior margem de lucro a vender em países estrangeiros onde os medicamentos possuem preços superiores; 2) *stocks* insuficientes ou em falta: questões financeiras que obrigam as farmácias a uma insuficiente gestão de *stocks* e um *stock* mínimo incapaz de satisfazer as necessidades dos seus utentes⁹.

Para um estagiário, muitas vezes pela desconfiança que esse cargo acarreta nos utentes, nem sempre é fácil explicar que a falta do medicamento aquando do atendimento não é da competência da farmácia que este representa, sendo, por vezes, necessário a intervenção de um colaborador mais experiente para reforçar junto do utente o que foi previamente explicado. No entanto, pessoalmente sempre analisei estes episódios como oportunidades de “ações de educação dirigida à comunidade no âmbito da promoção da saúde” como descrito no Código Deontológico da Ordem Dos Farmacêuticos¹.

2.4.2. Desconhecimento dos utentes e setor médico relativo à tecnologia do medicamento

As formulações de libertação modificada têm como objetivo diminuir o número de tomas de determinado fármaco, ao mesmo tempo que permitem uma duração de ação prolongada, visto que a tecnologia destas formulações torna possível uma libertação sustentada da substância ativa (SA) ao longo do tempo¹⁰.

Durante o atendimento ao público - no diálogo com o utente sobre o seu bem-estar onde cautelosamente recolhia informação relativa aos seus medicamentos de toma diária - deparei-me múltiplas vezes com situações em que os mesmos fraturavam medicamentos de libertação modificada (Caso Clínico I). Este facto é deveras preocupante tendo em conta que geralmente estes medicamentos contêm uma dose de fármaco superior à recomendada para a formulação imediata onde, após fratura ou trituração, o revestimento perde todo o efeito, estando toda a SA imediatamente disponível, podendo causar sobredosagem, seguindo-se períodos subterapêuticos sem eficácia clínica, inicialmente contrariados pela tecnologia de libertação modificada^{10,11}. Tudo isto passa a fazer ainda menos sentido, quando o doente é obrigado a esmagar o comprimido - uma vez que este não apresenta ranhura, nem para efeitos estéticos, e se desfaz completamente - e em algumas das situações, estão disponíveis no mercado alternativas terapêuticas de libertação imediata com a dosagem pretendida pelo prescriptor aquando a fratura do medicamento de libertação modificada.

Considero estas situações como fatores externos com potencial para afetar negativamente o decurso do estágio, principalmente na situação em que esta prática foi aconselhada pelo profissional de saúde prescriptor, que após contacto, por parte do utente, alertou o mesmo para desconsiderar a nossa opinião e não mostrou abertura para um diálogo crítico e construtivo.

3. Casos Clínicos – Aplicação de conhecimentos teóricos em contexto prático

3.1. Caso Clínico I

Uma utente, com aproximadamente 50 anos, dirige-se à farmácia com prescrição médica para adquirir Seroquel SR® 50 mg destinado à filha de idade não revelada. Seroquel SR 50 mg contêm comprimidos de libertação prolongada de Quetiapina e poderá ser indicado para: tratamento da esquizofrenia, perturbação bipolar e episódios depressivos doentes com Perturbação Depressiva Major¹².

Após diálogo com a utente, perguntas-chave como medicação habitual, entre outras, pude concluir que a utente em questão tinha por hábito partir os comprimidos de libertação

perlongada antes da toma por parte da filha, sendo prática recorrente há vários meses, assumindo que 25 mg eram suficientes para controlar os seus sintomas, apesar de na prescrição estar explícito como posologia “um por dia à noite”.

Com recurso ao Resumo das Características do Medicamento (RCM) disponibilizado pelo Infarmed - onde se pode ler e passo a citar “Os comprimidos devem ser engolidos inteiros e não devem ser partidos, mastigados ou esmagados.” - bem como outras fontes credíveis já abordadas no presente relatório, expliquei à utente que partir estes medicamentos poderia afetar a eficácia e segurança dos mesmos^{10,11,12}.

Por fim, aconselhei a utente a dirigir-se com a sua filha ao médico, explicando a situação - que há vários meses partia os medicamentos, possivelmente sem o seu consentimento - e debater junto do mesmo profissional, através da reavaliação da terapêutica, se deverá passar a tomar os comprimidos de Quetiapina 50 mg de libertação perlongada conforme previsto na posologia ou então, se será suficiente - de acordo com o estado clínico e diagnóstico médico - substituir por Quetiapina 25 mg de libertação imediata.

3.2. Caso Clínico II

Uma utente jovem, com aproximadamente 25 anos, dirige-se à farmácia com uma prescrição de fosfomicina 3 g granulado para solução oral, queixando-se de infeção urinária previamente diagnosticada. Aquando do aconselhamento terapêutico prestado à utente, no qual questionei os sintomas e respetiva duração, medicação habitual e antecedentes patológicos, pude constatar que se tratava de um desconforto recorrente. Assim sendo, além da informação prestada relativa à posologia específica da fosfomicina - uma saqueta vertida num copo de água, bem agitada e imediatamente bebida, preferencialmente ao deitar, de bexiga vazia e também duas horas após ingestão de alimentos - aconselhei também algumas medidas farmacológicas importantes para o tratamento e prevenção da recidiva da infeção como ingestão abundante de água, praticar uma boa higiene íntima e aumentar a ingestão de vitamina C¹³. Além disso, recomendei um complexo vitamínico com Arando Vermelho, uma vez que este é eficaz na redução da recorrência das infeções urinárias em mulheres sem patologias associadas, tendo em conta que inibe a adesão das bactérias ao trato urinário combatendo, assim, a formação inicial da infeção¹⁴.

4. Conclusão

O farmacêutico comunitário, muito mais do que um vendedor de medicamentos, é um prestigiado profissional de saúde com responsabilidades éticas e morais enquanto promotor de saúde e do bem-estar da comunidade. Atualmente, a melhoria contínua e o dever do farmacêutico de constante atualização técnica e científica assume um papel extremamente relevante, principalmente na diferenciação do farmacêutico de, por exemplo, profissionais representantes de locais de venda de MNSRM, através do ato de aconselhamento farmacêutico cuidado e rigoroso, no seio de equipas multidisciplinares constituídas pelos mais variados profissionais de saúde devidamente formados.

O Estágio Curricular, enquanto exposição prática culminativa dos conhecimentos teóricos e científicos previamente adquiridos, fornece ao estudante uma perspetiva única da farmácia comunitária apenas passível de ser adquirida pela prática diária da profissão. O sucesso do mesmo não seria possível sem o apoio da Farmácia Machado, que me permitiu sempre explorar os meus conhecimentos, e interpretou sempre as minhas sugestões - livres hábitos pré-adquiridos resultantes da experiência do dia-a-dia - como uma mais valia inovadora para o futuro da farmácia.

Por fim, é de salientar que com o auxílio do Estágio Curricular serei certamente um profissional de saúde mais capaz, com novos e aprimorados valores e capacidades, e principalmente, ciente da importância da prática farmacêutica na comunidade e do rigor, responsabilidade e competência que a mesma acarreta.

5. Bibliografia

- 1- ORDEM DOS FARMACÊUTICOS - **Código Deontológico da Ordem dos Farmacêuticos**. [Acedido a 23 de julho de 2019]. Disponível na Internet: <https://www.ordemfarmaceuticos.pt/pt/a-ordem-dos-farmaceuticos/regulamentos/>
- 2- INVESTOPEDIA - **Strength, Weakness, Opportunity, and Threat (SWOT) Analysis**. [Acedido a 23 de julho de 2019]. Disponível na Internet: <https://www.investopedia.com/terms/s/swot.asp>
- 3- GÜREL, E.,TAT, M. - **SWOT Analysis: A Theoretical Review**. The Journal of International Social Research. 10 (2017) 994-1006.
- 4- VALORMED - **Quem somos**. [Acedido a 26 de julho de 2019]. Disponível na Internet: <http://www.valormed.pt/paginas/2/quem-somos/>
- 5- PLURAL – **Formações Plural**. [Acedido a 25 de julho de 2019]. Disponível na Internet: https://www.plural.pt/servicos/formacoes-plural_33
- 6- DIETA EASYSLIM – **Como funciona**. [Acedido a 27 de julho de 2019]. Disponível na Internet: <https://www.dietaeasyslim.com/dieta-easyslim/>
- 7- DIETA EASYSLIM – **Produtos**. [Acedido a 27 de julho de 2019]. Disponível na Internet: <https://www.dietaeasyslim.com/loja/>
- 8- EXPRESSO - **Nunca houve tanta falta de medicamentos nas farmácias portuguesas**. [Acedido a 21 de julho de 2019]. Disponível na Internet: <https://expresso.pt/sociedade/2019-07-20-Nunca-houve-tanta-falta-de-medicamentos-nas-farmacias-portuguesas>
- 9- PUBLICO - **Todos os dias há mais de 17 mil utentes que não encontram medicamento na farmácia**. [Acedido a 21 de julho de 2019]. Disponível na Internet: <https://www.publico.pt/2019/06/30/sociedade/noticia/medicamentos-indisponiveis-1878258>
- 10- ORDEM DOS FARMACÊUTICOS - **Administração oral de medicamentos a doentes com dificuldades de deglutição**. [Acedido a 29 de julho de 2019]. Disponível na Internet: https://www.ordemfarmaceuticos.pt/fotos/publicacoes/cim_e_publicacoes_administracao_final_20810990995a942c853d8f3.pdf
- 11- ROYAL PHARMACEUTICAL SOCIETY- **Pharmaceutical Issues when Crushing, Opening or Splitting Oral Dosage Forms**. [Acedido a 29 de julho de 2019]. Disponível na Internet: <https://www.rpharms.com/Portals/0/RPS%20document%20library/Open%20access/Support/toolkit/pharmaceuticalissuesdosageforms-%282%29.pdf>

- 12- INFARMED, I.P. – **Resumo das Características do Medicamento Seroquel SR® 50, 150, 200, 300, 400 mg, Comprimidos de Libertação Prolongada.** [Acedido a 29 de julho de 2019]. Disponível na Internet: http://app7.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=45372&tipo_doc=rcm
- 13- INFARMED, I.P. – **Resumo das Características do Medicamento Fosfomicina Monuril 2, 3 g, Granulado para Solução Oral.** [Acedido a 29 de julho de 2019]. Disponível na Internet: http://app7.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=5725&tipo_doc=rcm
- 14- Pina, A., Figueiredo, A. R., Campos, A., Ferreira, C. P., Lopes, I., Alves, N. F., Ribeiro, I. - **Arando na profilaxia das infecções urinárias recorrentes: revisão baseada na evidência.** *Rev Port Clin Geral [online]*, 27(5) (2011) 452-457.

6. Anexos

Anexo I – Intervenção Farmacêutica no Olho Seco



Anexo II – Síndrome do Intestino Irritável com Diarreia e Diarreia em Geral



CERTIFICADO DE FORMAÇÃO

A Alliance Healthcare, SA declara para os devidos efeitos que o Sr. Rodrigo Ribeiro, esteve presente na ação de formação com o tema "**Síndrome do Intestino Irritável com Diarreia e Diarreia em geral**", desenvolvida pela Alliance Healthcare, no dia **22 de Maio de 2019**, em Coimbra (Duração da formação - 3 horas).

Porto, 18 de junho de 2019
Pel' Alliance Healthcare

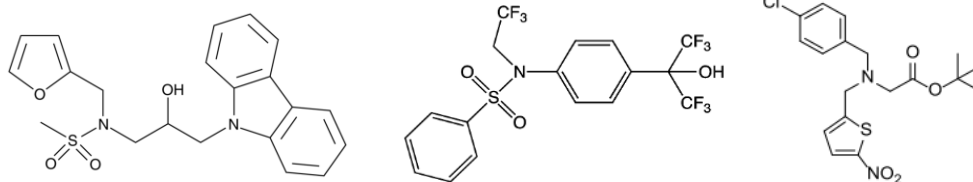


Anexo III – A Fórmula Martiderm: Inovação e Novidades

DECLARAÇÃO		
Declara-se que		
<u>Rodrigo Ribeiro</u>		
participou na formação em A Fórmula Martiderm: Inovação e Novidades realizada no Auditório da Plural, Coimbra no dia 21 de maio de 2019, com duração de 1h45m (uma hora e quarenta e cinco minutos).		
TEMA	CONTEÚDO PROGRAMÁTICO	
A Fórmula Martiderm: Inovação e Novidades	<ul style="list-style-type: none">• Apresentação Laboratório MartiDerm• La Fórmula Martiderm: a Inovação e Investigação Martiderm• As Novidades Martiderm: da Ciência à Prática (composição e casos práticos)	
<hr/>		
		

Parte III

Small Molecule Modulators of the Circadian Rhythm: From Identification & Development to Pharmacological Potentials in Clock-related Disorders



Orientada por: Professora Doutora Maria Manuel Silva



FACULDADE DE FARMÁCIA
UNIVERSIDADE DE
COIMBRA

List of Abbreviations

3D-QSAR - Three-Dimensional Quantitative Structure-Activity Relationships

7 α -OHC - 7 α -Hydroxycholesterol

ADME - Absorption, Distribution, Metabolism, and Elimination

AMPK - AMP-activated Protein Kinase

AR - Androgen Receptor

ASD - Autism Spectrum Disorder

AVP - Arginine Vasopressin

bHLH - *Basic-Helix-Loop-Helix*

BMALI - Brain and Muscle ARNT-Like I

BPD - Bipolar Disorder

CCGs - Clock-Controlled Genes

CDKs - Cyclin-dependent Kinases

CEM - Clock Amplitude-Enhancing Small Molecule

CK - Casein Kinase

CR - Caloric Restriction

Cry1/2 - *Cryptochrome 1/2*

DIO - Diet-induced Obesity

DNA - Deoxyribonucleic acid

DSPS - Delayed Sleep-Phase Syndrome

E₂ - 17 β -estradiol

EAE - Experimental Autoimmune Encephalomyelitis

EMA - European Medicines Agency

ER - Estrogen Receptor

FAD - *Flavin Adenine Dinucleotide*

FASPS - Familial Advanced Sleep-Phase Syndrome

FBXL3 - F-Box/LRR-Repeat Protein 3

FDA - Food and Drug Administration

FRET - Fluorescence Resonance Energy Transfer

FXR - Farnesoid X Receptor

G6Pase - Gluconeogenic Enzyme Glucose-6-Phosphatase

GSK - GlaxoSmithKline

GSK-3 - Glycogen Synthase Kinase-3

HFD - High-Fat Diet

IDC - International Drug Collection
LD - Light-Dark
LXR - Liver X Receptor
MDD - Major Depressive Disorder
MDMs - Monocyte Derived Macrophages
NOB - Nobiletin
NPAS2 - Neuronal Pas Protein 2
PAS - *PER-ARNT-SIM*
PDK2 - Pyruvate Dehydrogenase Kinase 2
Per1/2 - *Period1/2*
PP - Protein Phosphatase
PPARs - Peroxisome Proliferator-Activated Receptors
PPRE - PPAR Response Element
RARs - Retinoic Acid Receptors
RGZ - Rosiglitazone
RORs - Retinoic Acid Receptor-Related Orphan Receptors
RORC2 - Retinoic Acid Receptor-Related Orphan Receptor C
ROREs - Retinoic Acid-Related Orphan Receptor Binding Elements
RORyt - Retinoic Acid Receptor-Related Orphan Nuclear Receptor Gamma T
RXRs - Retinoid X Receptors
SAR - Structure–Activity Relationship
SCN - Suprachiasmatic Nucleus
SIRT1 - Silent Information Regulator I
STACs - Sirtuin-Activating Compounds
TOPs - DNA Topoisomerases

Resumo

Os relógios biológicos são “temporizadores” internos organizados de forma hierárquica e constituídos por vários mecanismos de feedback negativo, genes relógio e proteínas responsáveis pela regulação dos processos emocionais e cognitivos. O relógio central, localizado no núcleo supraquiasmático do hipotálamo anterior, é a entidade responsável pela sincronização dos relógios periféricos localizados por todo o organismo.

Um relógio biológico robusto é um requisito necessário para regular, de forma saudável, os processos fisiológicos. Por outro lado, a disrupção do ritmo circadiano tem um vasto impacto na saúde e um elevado potencial para levar ao desenvolvimento de múltiplas doenças.

Pequenas moléculas moduladoras do ritmo circadiano têm como recetores componentes integrantes do relógio biológico (proteínas do núcleo ou outras) e regulam, assim, as suas ações fisiológicas, dependendo da ação agonista, agonista inversa, ou antagonista da molécula. Estes moduladores farmacológicos são normalmente identificados recorrendo a técnicas de rastreio químico de múltiplas bibliotecas de compostos ativos. Com o recente desenvolvimento relativo ao ritmo circadiano numa perspetiva estrutural dos seus componentes, técnicas como rastreios direcionados e otimização de moléculas têm-se tornado cada vez mais relevantes na identificação destes compostos.

Esta revisão tem como objetivo focar a identificação das moléculas moduladoras do ritmo circadiano, abordando: o seu alvo relógio e os efeitos fisiológicos associados; os vários potenciais terapêuticos no tratamento das diversas doenças associadas à disrupção do ritmo circadiano (como é o caso das doenças metabólicas, doenças autoimunes, doenças neuropsiquiátricas, cancro e envelhecimento) e na cronoterapia; bem como as perspetivas futuras - como, por exemplo, os ensaios clínicos - sem nunca esquecer os potenciais risco associados.

Palavras-chave: Ritmo circadiano; proteínas relógio; genes relógio; cronoterapia; moléculas moduladoras; doenças associadas ao ritmo circadiano; cancro; envelhecimento; psoríase; ensaios clínicos; identificação de novas moléculas.

Abstract

The circadian clocks are internal timers hierarchically organized and composed of transcription-translational feedback loops, clock genes and proteins responsible for the regulation of behavioral processes and physiological activities. The central circadian master pacemaker, located in the suprachiasmatic nucleus (SCN) in the anterior hypothalamus, is responsible for the timing synchronization of the peripheral clocks throughout the body.

A robust circadian system is required to healthily regulate our physiological systems. On the other hand, the disruption of the circadian oscillations has a wide-ranging impact in health and the potential to cause the development of clock-related diseases.

Small molecule modulators of the circadian rhythm target certain components of the clock (either core or non-core clock proteins) modulating physiological effects based on compound agonist, inverse agonist or antagonist interference.

These pharmacological modulators have been usually identified using chemical screening of large libraries of active compounds. With the recent knowledge and research related to the circadian clock at a structural level, target-based screens, chemical optimization and circadian crystallography have become more and more relevant to the identification of these compounds.

This review focus on the identification of traditional and innovative examples of small-molecules modulators of the circadian rhythm disclosing: their circadian targets and specific physiological effects; their therapeutic potential for the treatment of diverse clock-related disorders (such as metabolic-associated disorders, autoimmune diseases, mood disorders, cancer and aging) and in chronotherapeutic; their future perspectives - e.g. clinical trials - without forgetting their potential hazards.

Keywords: Circadian rhythm; clock proteins; clock genes; chronotherapy; small molecule modulators; clock-related diseases; cancer; aging; psoriasis; clinical trials; circadian modulators identification; screening.

I. Introduction:

Integrative approach to molecular circadian clock components and mechanisms in mammals

With the need to respond optimally to the daily changing environment of the Earth - for example, earth's rotation (that leads to diurnal cycles of light and darkness) and temperature - 24-hour endogenous oscillators have emerged from cyanobacteria and evolved in all forms of life. These complex internal timers, known as circadian clocks, are composed of transcription-translational feedback loops, respective genes and proteins responsible for the control of behavior and physiological activities in organisms^{1,2}.

In mammals, the circadian timing system is organized in a hierarchy of multiple and disperse oscillators³. The daily rhythms are controlled, at the organismal level, by a central circadian master pacemaker located in the suprachiasmatic nucleus (SCN): a pair of neuron clusters bilaterally, located in the anterior hypothalamus, that respond to photo signals and integrate light information to coordinate cellular oscillators throughout the body via neural and hormonal signaling⁴.

Regardless the master pacemaker - top of the hierarchical organization -, circadian clocks are cell autonomous and are found in all major organ systems and tissues of the body⁵ including liver, lung, and muscles⁶ as well as cultured cells⁷. Peripheral cells are only capable of sustain robust daily oscillations for a few days without the input from SCN, which is essential for their timing synchronization and local rhythm-related activities' control. So, a hierarchical multioscillatory system is essential to regulate the peripheral clocks and their physiological systems⁴. Despite sharing the same molecular architecture with peripheral clocks, SCN' neurons have higher degree of intercellular tight coupling among them which forms a network resistant to internal phase perturbations. The peripheral cells clocks, on their turn, are susceptible to perturbations from the SCN clock, systemic factors such as body temperature and metabolic status of their tissues^{3,8}. In conclusion, this hierarchical multioscillatory system logic ensures that the master clock keeps intrinsic coordination between tissue clocks and the daily changing environment. More recently it was proved - using RNA-seq and DNA arrays to, over time, quantify the transcriptomes of 12 mouse organs - that molecular oscillators in individual tissues coordinate themselves to control highly tissue-specific expression programs of clock-controlled genes (CCGs) affecting a variety of cellular processes⁹.

The molecular mechanisms of circadian clocks in mammals are generated by transcriptional autoregulatory and interconnected negative feedback loops, including a core loop and a secondary stabilization loop. Both of these feedback loops include core clock genes that work together to produce and maintain robust 24-hour oscillations of gene transcription¹⁰.

The core loop - primary negative feedback loop - consists of three basic-helix-loop-helix (*bHLH*) – PER-ARNT-SIM (*PAS*) transcription factors: circadian locomotor output cycles kaput (*CLOCK*); neuronal pas protein 2 (*NPAS2*); brain and muscle ARNT-like 1 (*BMAL1*); and also enzymes that control degradation and stability of the clock core proteins (kinases: *CKI α* , *CKI δ* , *CKI ϵ* and phosphatases: *PPI*, *PP5*). *CLOCK* or *NPAS2* each interacts with *BMAL1* through the *PAS* and *bHLH* domains inducing dimerization. Heterodimers of transcription factors, *CLOCK:BMAL1* and *NPAS2:BMAL1*, bind to E-box (5'-CACGTG-3') or E'-boxes (5'-CACGTT-3') DNA elements on the promoters of *Period1/2* (*Per1/2*) and *Cryptochrome1/2* (*Cry1/2*) genes and activate the expression of these repressor proteins^{4,11-13}. Then, the *PER* and *CRY* proteins heterodimerize with each other and interact with the serine-threonine kinases, Casein Kinase I δ (*CKI δ*) and Casein Kinase ϵ 43 (*CKI ϵ 43*), translocating into the nucleus to inhibit transcriptional activities of *CLOCK:BMAL1* and hence their own *Per* and *Cry* gene transcription. So, casein kinases *CKI δ* and *CKI ϵ* play a crucial role in determining the time period of the clock by controlling the rate at which the *PER:CRY* repressor complex is either degraded, allowing *CLOCK:BMAL1* transcriptional activity, or enter the nucleus to inhibit it. Casein kinase activity is also either downregulated by phosphatases *PPI* or upregulated by the phosphatases *PP5*^{4,11-13}.

In the stabilization loop - secondary autoregulatory feedback loop -, *CLOCK:BMAL1* and *NPAS2:BMAL1* drive the expression of genes encoding the nuclear hormone receptors *REV-ERBs* and retinoic acid receptor-related orphan receptors (*RORs*). *REV-ERBs* (*REV-ERB α* , *REV-ERB β*) compete with *RORs* (*ROR α* , *ROR β* and *ROR γ*) to bind to the retinoic acid-related orphan receptor binding elements (*ROREs*) on the 5' flanking region of the *Bmal1*' promoter and other target genes throughout the genome. The rhythmic expression of *REV-ERB α/β* leads to the repression of *Bmal1* and *Clock*. On the other hand, *RORs* activate the transcription of *Bmal1* and several other clock genes - through direct binding to the *RORE* elements on their promoters^{1,11,12}. A third transcriptional loop can also be considered¹.

In addition to the activators and repressors, various levels of regulation - including post-translational control and modifications such as phosphorylation, ubiquitination and acetylation - are critical: to determine circadian periodicity, to regulate the circadian rhythm oscillators according to environmental inputs and for resetting the clock mechanism¹⁴. Enzymes, such as kinases, have an important role in post-translational regulatory mechanisms since they control clock related processes, such as clock protein stability and transcription, making them also an interesting small molecule investigational targets¹⁵. Post-translation modifications are even present in the core loop, for example when *PER* and *CRY* inhibit transcriptional activities of

CLOCK:BMAL1. Specific E3 ubiquitin ligase complexes target PER (β -TCRPI 3 ubiquitin ligase complex) and CRY (FBXL3 3 ubiquitin ligase complex) proteins for post-translation ubiquitination leading to their subsequent degradation by the 26S proteasomal pathway¹⁶. This post-modification degradation of the repressor proteins relieves the negative feedback repression, and restores new transcription of CLOCK:BMAL1 beginning a new cycle.

As previously mentioned, daily light and behaviors such as feeding are able to regulate the timing of internal processes. To maintain adequate temporal alignment of function between tissues - heart, lungs, muscle, stomach, liver, brain -, SCN have the ability to coordinate their functions, which appears to be quite relevant since each of the major organ system have their own clockwork to regulate the transcription of specific CCG whose expression is crucial to the organ's activity^{17,18}. A robust and healthy circadian timing system is needed to regulate mammalian complex gene networks and establish the proper temporal patterning of the most various physiological systems. The disruption of the rhythm's dynamic has the potential to uncouple and desynchronize peripheral clocks from the SCN, leading to a wide-ranging impact on humans' health⁵. Circadian disruption (due to e.g. aging, shiftwork, jet travel, overnutrition, or cancer) often leads to timing misalignment among body systems causing important normal function components to be lacking when needed. In the long-term, circadian disruption has shown a relation with sleep disorders, cardiovascular disease, metabolic syndrome, obesity, diabetes, autoimmunity and cancer^{13,18,19}. The circadian clock function also declines with aging²⁰, and interestingly, circadian clock disruption is considered to contribute to the diseases associated with aging such as metabolic disorders, neurodegeneration, osteoporosis and sarcopenia. On the other hand, strategies that increase robustness of the circadian rhythms, as caloric restriction does, have the potential to increase life span²¹.

Therapeutic relevance of the circadian clock has been largely associated with chronotherapy, which consist of selecting optimal dosing time in a precise circadian time window to achieve a better pharmacokinetic profile and/or to improve efficacy and/or to reduce toxicity related to the drug metabolism^{13,22,134,135}. In fact, a majority of best-selling drugs have better results at a specific time²³ and several large studies showed a most efficacious delivery time for the treatments in cardiovascular, sleep, and malignant diseases, among others¹³⁴. Pharmacologists nowadays affirm that "timing is sometimes more important than the dose"²³. ADME processes - absorption, distribution, metabolism, and elimination - are essential to determine the drug's pharmacologic effects²⁴. Since all of these processes can be regulated by peripheral and central circadian clocks - e.g. phase I and II drug-metabolizing enzymes and phase III detoxification transporter proteins expression; gastric pH; gastrointestinal motility; even xenobiotic efflux by the blood-brain barrier¹³⁴ - this is why the time of the dose is so important for the drug

effect and safety²⁴. Actually, clinical trials of new drugs should take into consideration therapy timing¹³⁴, special for cancer related diseases²⁵. A relevant up-to-date example is a clinical trial with the new oral anticoagulant drug rivaroxaban suggesting that evening intake leads to increased exposure to rivaroxaban concentrations, counters the morning hypofibrinolysis, suppresses morning thrombin generation, and ultimately reduces the probability of thromboembolic events in this circadian time window²⁶.

More recently, with the knowledge that a robust circadian clock is required for health in general, increasing attention has been given to the identification of small molecule modulators of the circadian clock and their therapeutic potentials in clock-related diseases such as metabolic, neuropsychiatric, inflammatory and even cancer. Small molecules also increase molecular understanding of the clockwork, since it's possible to inhibit or activate certain components of the clock and study the physiological consequences^{27,28}.

This review will focus on the identified clock modulators and provide a comprehensive analysis on their physiological characteristics, while taking into account the strategies that led to their identification, their therapeutical potential in circadian rhythm-related human diseases and future perspectives.

2. Development of potential small molecule clock modulators

2.1. Main strategies used to identify clock-modulating small molecules

Two different types of screening assays have been frequently adopted to perform large chemical screens of multiple libraries with active compounds, in order to identify novel clock-modulating small molecules. These assays are usually designated as mechanism endpoint assays and phenotypic assays. Nevertheless, with the recent focus on the analysis of the circadian clock at a structural level, target-based screens, including biochemical assays measuring fluorescence of protein-protein interactions, chemical derivatization of known scaffolds and X-ray crystallography experiments became important tools to identify compounds that specifically target certain clock components^{11,27,29} (**Figure 1**).

Understanding that circadian modulation is directly correlated with CLOCK/BMAL transactivation at E-box elements in the promoter regions of *Per* and *Cry* genes, allowed **endpoint assays** to be developed while taking advantage of the core loop main mechanism. In this mechanism-based assays, cell lines with specific E-box luciferase reporters (*Bmal1-Luc*, *Per1-Luc*, *StAR-Luc*...) which allow circadian monitoring of CLOCK/BMALI transcription modulation influenced by the screened compounds³⁰. The tested compounds - interfering with

the rhythm expression of the luciferase providing endpoint transcriptional readout - upregulate or downregulate the reporter, either by enhancing or reducing the bioluminescence signals³¹. As previously stated, endpoint assays are based on the circadian molecular architecture meaning that the small active molecules should directly affect the core loop rather than indirect pathways that also affect the circadian rhythm²⁷. Confirmatory tests should be used to validate the primary hit compounds effect on the specific pre-determined target(s): obtain readout of the compound on basal promoter activity of the different clock genes (*Clock*, *Bmal1*, *Per1*, *Per2* and *Cry1*) to determining which of the clock genes are affected by the SM; determine specific binding of the circadian receptor with the compound through immunoblotting with specific antibodies; target gene mRNA fold change determined by real-time RT-PCR; target gene respective protein determined by western blot; suppression of target gene by specific siRNA blocking the effect of the test compound, among others^{27,30,31}. Circadian bioluminescence rhythms can also be continuously monitored over several days - after synchronization with dexamethasone, forskolin or serum shock - in cell lines with robust circadian rhythmicity to evaluate circadian dynamics after compounds interference in what is called a **phenotypic assay**^{11,27,135}. Similar to endpoint assays, luciferase reporter (*Bmal1-dLuc*, *Per2-dLuc*) can be expressed from an exogenous clock gene promoter reporting circadian transcription in, for example, NIH3T3 and U2OS cells with robust luminescence rhythms^{32,33}. In this assays, circadian cycles can also be continuously monitored using robust fibroblasts cells, derived from *Per2::Luciferase* knock-in mice, expressing a PER2-luciferase fusion protein reporter from the endogenous *Per2* locus promoter. This assay reports protein *mPer2^{Luc}* oscillation and consecutively circadian clock modulations at the protein level - *mPer2^{Luc} knock-in* reporter^{29,34}. Due to the high number of plates and being monitored over several days, these screens generate millions of data points requiring one specialized algorithm to extract circadian parameters such as period, phase, amplitude and dumping from the initial raw data - phenotypic screens can also be known as kinetic assays^{11,29}. In addition to the circadian rhythmicity, factors like “reporter gene, cell line, cell number, medium volume, medium composition, compound volume, liquid dispenser, and plate reader” need to be optimized to obtain a robust system and the most reliable results possible²⁹. Endpoint and phenotypic are both cell-based assays usually performed in a human osteosarcoma U2OS cell line or NIH3T3 murine fibroblasts with the respective luciferase reporters, which present **advantages** and **disadvantages** in relation to one another. Phenotypic screens have several advantages since they are not restricted to one determined mechanism and it’s possible to identify novel compounds with different interaction with the circadian rhythmicity - it’s considered an unbiased screen²⁷. Also, as mentioned, these types of

assays provide data of the effects that small molecules have on the circadian period, phase, and/or amplitude and help deduct the consequent functional deviations. However, these screens show some limitation in determining the direct target of the small molecules since they are affected by, for example, the phosphorylation of clock proteins, the metabolic state of the cells and the binding pockets of some target proteins for test compounds¹⁵. In turn, endpoint assays are mechanism-based screens that identify small molecules affecting directly one specific target gene providing a closer idea of their circadian clock mechanism, but sometimes need secondary assays (such as phenotypic assays) to confirm their circadian dynamics effect and consequences. In short, endpoint screens will identify circadian modulators by measuring the transactivation triggered by them and, instead, the phenotypic screens measure the circadian rhythm parameters.

It is also very important to prioritize primary hits with counter-screen assays based on “effect, potency, structure, and property” since the subsequent activity and mechanistic studies - for example specific in vitro assays to particular clock enzymes - are time and effort consuming²⁹. Study compounds can also unleash several cellular pathways that indirectly interfere with the rhythm. Therefore, in vitro **biochemical assays**, by measuring protein-protein interactions, are useful to identify novel compounds that target specific circadian clock components that indirectly regulate the clock. Compared with endpoint and phenotypic assays, biochemical screens provide the opportunity to directly identify compounds that interact with well-known protein targets³⁵. Nowadays, **X-ray crystallography** have a huge impact on revealing clock proteins detailed structures, which is essential for the development of novel compounds against the known circadian protein targets. So, these types of techniques used to determine atomic structures open new opportunities for rational structure-based design³⁶. Furthermore, small molecules can also be further developed through derivatization of already known ligands and scaffolds, using **chemical optimization** to improve their circadian clock effects, efficacy and/or pharmacokinetics and pharmacodynamics properties^{37, 38}.

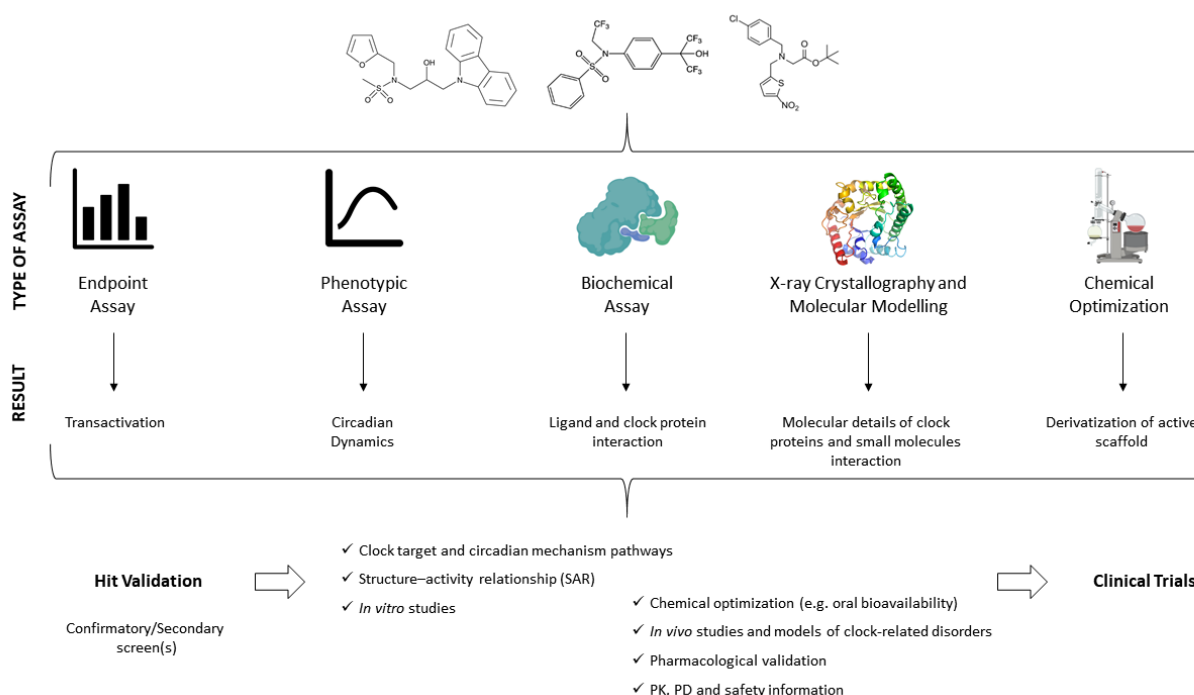


Figure 1 - Identification and potential guide for the development of novel small molecule modulators for the treatment of clock-related diseases - Different types of assays can be performed to identify small molecule modulators of the circadian rhythm. These methods require different outcomes analysis according to their specifications and type of results. Also, after identification and development, multiple important steps separate a lead compound from clinical trials, including: *in vitro* and *in vivo* studies; awareness of the circadian pathway and respective therapeutic potentials; pharmacokinetics, pharmacodynamics and safety information; and oral adequate bioavailability profile.

2.2. Small molecule modulators of the circadian rhythm targeting:

Small molecule modulators of the circadian rhythm can interact with the clock directly through acting on the clock components of the core loop and secondary stabilization loop - “circadian clock core proteins” - or interfering with key regulatory mechanisms also capable of deeply alter and control the circadian clock - “circadian non-core proteins”.

2.2.1. Circadian clock core proteins

a) *CRY1/2*

CRYs proteins act on the core feedback loop so they are considered as a key investigational target for future small molecule modulators of the circadian rhythm (**Appendix Table I**).

KL001 was the first small molecule identified to directly target the core components of the circadian clock³³. It is a carbazole derivative that inhibits ubiquitin-dependent degradation of CRY by binding to the flavin adenine dinucleotide (FAD)-binding pocket in competition with F-

box/LRR-repeat protein 3 (FBXL3) and was very important to the study of CRY since it revealed that both CRY1 and CRY2 have a similar role in circadian regulation^{33,39}. Through CRY protein stabilization and consequent negative regulation of *Pck1* and *G6pc* genes responsible for encoding gluconeogenesis enzymes, KL001 provides new opportunities to study CRY cellular mechanisms and opens the possibility for circadian-based treatment of diabetes^{33,40}. KL044, a novel KL001 derivative also stabilizer of CRY, was discovered while studying the structure-activity of ligand-protein interaction - using CRY/KL001 co-crystal structure and structure-activity relationships (SAR) - to identify which parts of the small molecule scaffold could be modified to increase effectiveness. KL044 length circadian period with tenfold higher potency than KL001 demonstrating the importance of medicinal chemistry in this field. Three-dimensional quantitative structure-activity relationships (3D-QSAR) of KL001 and KL044 on a molecular-level - calculating van der Waals interactions, hydrophobic field points, electrostatic and steric coefficients, among others - provided a better understanding of CRY regulation mechanisms⁴¹.

Similar to KL001, period-lengthening compound GO214 - synthesized by using cutting-edge C-H activation - acts by stabilize CRY protein. However, the very first period-shortening molecules targeting CRY found in the same study - GO044, GO200, and GO211 - did not show relevant CRY destabilizing activities, on the contrary GO200 and GO211 even increase CRY1 half-life. So, these molecules mediate the clock interaction with CRY through undiscovered processes different than its stabilization, which, once again, demonstrate how complex the circadian machinery can be²⁸.

Compound 15, or latter known as KS15, is a derivative of 2-ethoxypropanoic acid responsible for binding to the C-terminal and inhibiting the feedback repressive actions of CRY1/2, by blocking the interaction between CRYs proteins and *Bmal1*, and ultimately enhancing the E-box mediated transcription and circadian activity^{31,39}. Unlike KL001 that interfere with CRY stabilization, KS15 impact CRY interactions with binding partners (e.g. *Bmal1*) as showed by co-immunoprecipitation assays³⁹. KS15 derivatives - SJ019, SJ029, and SJ030 - also increased E-box-mediated transcription in a dose-dependent manner, with comparable effects to KS15. The main particularity is that SJ019 and SJ029 don't affect circadian robustness and stability of the rhythm in fibroblast cells - in contrast to KS15 - showing that KS15 impaired circadian stability may not be a direct consequence of CRY inhibition³⁹.

Circadian disruption and CRY are considered a risk factor for breast cancer. When tested in MCF-7 cells, small molecule KS15 showed potent anti-proliferative activity - increasing strong tumor suppressor, *Per2* expression - while increasing sensitivity to anti-tumor drugs (chemosensitivity) in human breast cancer cells⁴².

b) REV-ERBs

REV-ERB α (also known as NR1D1) and REV-ERB β (also known as NR1D2) efficiently repress *Bmal1* transcription upon binding to the RORE promoter elements and they are key targets for small molecule modulators of the circadian clock (**Appendix Table 2**).

GSK4112 is a heme - endogenous ligand of REV-ERBs receptors - competitor, and the first identified synthetic ligand of these receptors. GSK4112 is a potent agonist responsible for the repression of REV-ERBs main target gene, *Bmal1*, in liver cells³⁵. This small molecule inhibited gluconeogenesis in primary mouse hepatocytes and also inhibited proinflammatory cytokine IL-6 protein secretion in monocyte derived macrophages (MDMs) and primary alveolar macrophages, showing the link between the REV-ERB receptors and metabolic and immune (respectively) functions and associated diseases^{35,43}. This is consistent with the fact that the endogenous REV-ERB endogenous ligand heme levels are regulated by circadian rhythm and inflammation process⁴³.

On the other hand, SR8278, the first REV-ERB α antagonist identified, increases the expression of the receptor target genes - *Bmal1*, *G6PC* and *PCK* - and blocks the action of the endogenous ligand, heme⁴⁴. SR8278 produces the opposite effect of GSK4112 in alphaTC1-9 cells and mouse primary endocrine alpha-cells since it inhibits glucagon secretion and intracellular calcium signaling⁴⁵. This REV-ERB α antagonist is also capable of triggering hyperdysfunctions of midbrain dopaminergic (DAergic) neurons and mania-like behavior in mice⁴⁶.

In order to optimize the lead compound, SR9009 and SR9011 were synthesized having GSK4112 as reference. The novel compounds dose-dependently increased the receptor-related repressor activity³⁷. A single injection in mice of both compounds led to loss of active period under dark conditions and delayed the initiation of diurnal activity and nocturnal peak, indicating that the novel compounds could be used for the treatment of jet lag and sleep disorders. When used in obese mice, REV-ERB agonists increased energy expenditure and decreased fat mass, plasma triglycerides and cholesterol, suggesting a potential therapeutic use in metabolic diseases³⁷. SR9009 improved mitochondrial function and exercise endurance and, once again, small molecules were proven very valuable to evaluate circadian proteins biological activities, in this particularly case REV-ERB α effect on mitochondrial biogenesis modulating skeletal muscle oxidative capacity⁴⁷. Despite SR9011 and SR9009 both have better PK properties to be used as *in vivo* - compared to GSK4112 - they still needed higher potency for the receptor. So, SR10067 was synthesized from SR9009 and SR9011 scaffold and the three compounds were able to induce wakefulness, suppress sleep and regulate emotional behavior in mice⁴⁸. SR9009 also decreased the addictive phenotypic properties of cocaine and there is

evidence that it also affects circadian expression of orexinergic genes even leading to suppression after long term dosing^{48,49}. A recent study also showed that both SR9009 and SR9001 induce death of tumor cells and oncogene-induced senescent (OIS) cells, without affecting the viability of normal tissues¹³³.

In order to improve potency for REV-ERB α and also to take advantage of the selectivity for the receptor LXR α - with diverse effects on inflammation, cholesterol metabolism and others - GSK2945, GSK0999, GSK5072, GSK2667 were optimized based on the known agonist GSK4112, while also increasing REV-ERBs agonists bioavailability⁵⁰.

ARN5187 is a novel dual inhibitor of both REV-ERB β -mediated transcription and autophagy. The higher cytotoxic activity of ARN5187 in cancer cells - compared to the lysosomotropic agent chloroquine that similarly suppresses autophagy - is consider due to the dual target and the novel effects on REV-ERB β inhibition⁵¹.

c) RORs

The retinoic acid receptor-related orphan receptors (ROR α , β , and γ) and respective isoforms compete with REV-ERBs for bind RORE elements and consequently enhance *Bmal1* expression (**Appendix Table 3**). ROR α and ROR γ are commonly expressed throughout the tissues whereas ROR β is mainly found in the central nervous system⁵².

T0901317, later known as T1317, is a known liver X receptor (LXR) agonist - nuclear receptor for oxysterols - and also a farnesoid X receptor (FXR) agonist - nuclear receptor for bile acids⁵³. Interestingly, later it was discovered that T1317 is also an inverse agonist of ROR α and ROR γ (but not ROR β)⁵⁴. After all, T1317 suppression of ROR α and ROR γ inhibits Th17 cell proliferation and consecutively IL-17 production decreasing severity of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). T1317 is also responsible for the repression of gluconeogenic enzyme glucose-6-phosphatase (G6Pase) in HepG2. Both of these cellular effects are believed to be ROR-dependent and not result of T1317's LXR activity⁵⁴.

SR1078 is a derivative of the lead compound - RORs inverse agonist T1317 - but, unlike its precursor, SR1078 activates the expression of ROR target genes - *G69C* and *FGF21* - in a RORE-dependent manner in HepG2 cells⁵³. SR1078 is a ROR α and ROR γ agonist with the capacity to reduce the expression of pyruvate dehydrogenase kinase 2 (PDK2) and reduce aerobic glycolysis in hepatoma cells⁵³. Overexpression of ROR α - via adenovirus or due to glutamine restriction - or treatment with SR1078 inhibited cell proliferation and hepatoma growth both *in vitro* and *in vivo*⁵⁵. SR1078 when utilized in BTBR (model of autism) mice

increased the expression of autism spectrum disorder (ASD) associated downregulated genes - also ROR α 's target genes - in the brain of BTBR mice and in human neuroblastoma cell line, and reduced *in vivo* repetitive behavior⁵⁶.

SR3335 (or ML-176) was synthesized based on continuous SAR of T1317 and SR1078 scaffold. SR3335 is an inverse agonist, and the first to be selective to only one type of ROR (ROR α). This ROR α inverse agonist suppresses the receptor target genes, in HepG2, related to gluconeogenesis - *G6Pase* and *PEPCK*. It and suppress gluconeogenesis *in vivo* in diet-induced obesity (DIO) mouse model, showing lower plasma glucose levels when measured⁵⁷.

Regardless of T1317 bid to ROR with high affinity, it showed relevant LXR activity. SR1001 is a derivative compound of the lead T1317 compound taking advantage of its scaffold, retaining the ability to suppress ROR α and ROR γ transcriptional activity despite its loss of all LXR interference⁵⁸. SR1001 inhibits specifically TH17 cell differentiation and function without interfere with other T-helper cells, which is an advantage when used in TH17-mediated autoimmune diseases - e.g. multiple sclerosis - compared with a general non-specific immunosuppressant⁵⁸.

SR1001 scaffold optimization led to the discovery of SR2211 and SR1555, both ROR γ inverse agonists capable of inhibiting Th17 cell differentiation⁵⁹. Interestingly, SR2211 protected mice from EAE and reduced joint inflammation^{59,60}. This compound and its analogue XY018 - structure-based optimization of SR2211 and GSK805 - suppress the expression of androgen receptor (AR) and specifically its variant in prostate cancer tumors, AR-V7⁶¹. Despite TH17 cell inhibition, SR1555 increases the frequency of inducible T Regulatory cells⁶². In addition, administration of SR1555 to obese diabetic mice reduces food intake, lowering body weight and improving insulin sensitivity, while increasing thermogenesis and fatty acid oxidation⁶³.

ROR γ specific inverse agonists had been previously studied, by Huang *et al.*, in a high-throughput screen of 310,000 compound samples¹²⁵. ML209 was discovered as an inhibitor of ROR γ target gene *IL17a* but not affecting other ROR target genes. It inhibits TH17 cell differentiation without action on another T cells¹²⁵. Due to the novelty of this topic - ROR γ specific modulators - further research status will be disclosed below.

c₁) ROR γ

Retinoic acid receptor-related orphan nuclear receptor gamma t (ROR γ t) - encoded in humans by retinoic acid receptor-related orphan receptor C (RORC/RORC2) - is a thymus-specific form of ROR γ and a key transcription factor for TH17 cell differentiation in proinflammatory

CD4⁺ T cells⁶⁴. The relation between ROR γ t and immune and inflammatory regulation is known for more than a decade by now⁶⁵. However, in the last few years, ROR γ inverse agonist modulators have been a prodigious and competitive area of research, with multiple worldwide patents and ongoing clinical trials - mainly due their capacity to reduce IL-17 production in the treatment of multiple autoimmune diseases (rheumatoid arthritis, multiple sclerosis, psoriasis and inflammatory bowel disease and others)⁶⁶.

ROR γ t endogenous ligands were the first to be discovered, and several oxysterols - e.g. 7 α -hydroxycholesterol (7 α -OHC) and 24S-hydroxycholesterol (cerebrosterol) - demonstrated high-affinity for the orphan receptor^{67,68}.

Digoxin - a cardiotonic glycoside extracted mainly from *Digitalis lanata* - was the first exogenous compound identified as an ROR γ t inhibitor. Nevertheless, despite its selectivity for ROR and positive effect in auto-immune arthritis, it is considered a known toxic for human cells^{69,70}. Another phytochemical able to inhibit ROR γ t function and also associated with IL-17 expression is ursolic acid - a small molecule found in *Prunella vulgaris* L. However, ursolic acid shows activity in a number of other targets, reducing selectivity for ROR *in vivo*⁷¹.

One disruptive study using Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) screening assay and SAR for chemical optimization of benzhydryl amide group, identified three highly potent and selective ROR γ t inhibitors, TMP778, TMP920, and GSK805. GSK805 is more potent in inhibiting TH17 response than TMP778 and can also be oral administrated which increases its potential clinical usage versus TMP778 since the later require subcutaneous administration. Curiously, they don't affect ROR γ t binding to DNA but still both inhibit Th17 differentiation with important therapeutic potentials described in **Appendix Table 3**^{72,73,74}.

The recent approval of several human monoclonal antibody inhibitors of interleukin IL-17 pathway: Cosentyx[®] (secukinumab) from Novartis approved by both EMA and FDA; Talz[®] (ixekizumab) from Eli Lilly approved by both EMA and FDA; Kyntheum[®] (brodalumab) from LEO Pharma approved by EMA and Siliq[®] (brodalumab) from Valeant approved by FDA, all for the treatment of psoriasis, support the possibility of ROR γ IL-17 pathway inhibitors (regulate T_H17 and respectively the pro-inflammatory cytokines production of IL-17 and IL-17A) as an effective treatment^{66,75}. Moreover, monoclonal antibodies require subcutaneous administration and ROR γ inverse agonists have the potential to be equally effective and orally bioavailable³⁸. Pharmaceutical companies, GlaxoSmithKline (GSK), Genentech, AstraZeneca, Vitae Pharmaceuticals, Arrien Pharmaceuticals, Pfizer⁷⁶, AbbVie⁷⁷ and others, have been lead companies in ROR γ modulators' research in the last few years^{66,77,76}. This entailed many new modulators identified and optimized - especially last year -, even several patents and ongoing

clinical trials and, thereby, making them closer and closer to a market authorization. The purpose of this review is not RORy itself and therefore is not a viable option to detailed all the novel compounds⁷⁸. However, a brief resume of RORyt/RORC small molecules subjected to clinical trials could be a valuable asset to inspire more researchers to focus on the potential of the small-modulators of the circadian rhythm (**Appendix Table 4**) (**Appendix Table 5**).

P.S. It's important to notice that despite all the therapeutic potentials and benefits of this molecules, toxic and secondary effects are also being reported. For example: TAK 828 phase I clinical trial in Crohn's diseases was discontinued based on the results of preclinical toxicology and clinical teratogenicity studies¹³⁰; ABBV-553 terminated early a phase I in Psoriasis due to safety reasons¹³¹; AZD0284 had suspended a phase I trial in Plaque Psoriasis due to preclinical data that required further evaluation¹³².

2.2.2. Circadian non-core proteins

Posttranslational modifications - regulated by **kinases**, phosphatases and other proteins/enzymes of the mammalian circadian clock - are crucial for the generation of normal circadian periods¹⁵.

Casein kinase I isoforms δ and ϵ regulate *Per1*, *Per2*, *Bmall* and CRY proteins since they function as CKI substrates¹⁵. It's also known that most of the screened active compounds that lengthened the circadian period are, indeed, CKI inhibitors⁷⁹. CKI-7, IC261, D4476, PF-670462, longdaysin, LH846, Compound 1-3 are example of compounds that interfere with CKI and lengthen the circadian period as showed in cultured cells¹¹. Interestingly, PF-670462 - a pharmacological inhibitor of CKI δ - was able to lengthen circadian both in vivo and in peripheral tissues in vitro, but is respective analogue, PF-4800567 - strong selective target of CKI ϵ - displayed minimal effect on the circadian rhythm⁸⁰. These findings suggest that CK I isoform δ is the main clock regulator and its selective inhibition could offer a valid therapeutic alternative to the clock associated disruptions. On the contrary, a 200.000 compound screen - performed by Chen *et al.*, identified compound 1, compound 2 and compound 3 as CKI potent inhibitors - showed that, when in vitro tested, compound 1 has the most robust inhibition of CKI ϵ and correspondingly the higher period-lengthening effects - further investigation should be performed to test if this compound also potently inhibit CKI δ for all of these results to be coherent³⁴.

Casein kinase 2 (CK2) is responsible for phosphorylate N-terminal of *Per2* and support its normal accumulation. So, when CK2 is inhibited pharmacologically the circadian clock become disrupted. DMAT and other CK2 α , CK2 α' , or CK2 β inhibitors induced dose-dependently lengthened circadian periods in various cell culture models. On the other hand, overexpression of CK2 leads to a period shortening in a couple of hours⁸¹.

AMP-activated protein kinase (AMPK) is a heterotrimeric protein that has been shown to phosphorylate and destabilize PER and CRY proteins, specifically CRY1, causing variations in peripheral clocks⁸². The established treatment for type 2 diabetes, Metformin, is an AMPK activator in liver and muscle through different kinases, interfering with the expression pattern of both clock and metabolic genes⁸³. The interconnection between metabolic processes and circadian rhythm regulation is demonstrated and should be take into account in the development of new drugs.

Glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) has two mammalian isoforms (GSK3 α and GSK3 β), and GSK3 β is the one responsible for the phosphorylation of CLOCK, PER, REV-ERB α and CRY proteins and therefore regulates the circadian clock¹⁵. Lithium, an established GSK-3 inhibitor used to treat bipolar disorder, has period lengthening effects on the circadian rhythm. What is interesting is that selective inhibitors of GSK-3, e.g. Chir99021 and I-azakenpaullone, cause the opposite effect and shorten circadian period - with GSK-3 β siRNA and lentivirus vector encoding GSK-3 β shRNA showing the same effect - clarifying the role of this kinase in period regulation³².

Cyclin-dependent kinases (CDKs) share some small-molecules inhibitors - e.g. Indirubin-3'-oxime and kenpaullone - with GSK-3³². CDK5 is a novel regulatory component of the clock since it is responsible for CLOCK protein direct phosphorylation affecting its stability and distributing³². Unfortunately, depending on the target subfamily, the small molecules appear to have different effects: Roscovitine and "puralanol A" both lengthened circadian period and, on the other hand, NU6102, an active CDK2 inhibitor, did not³². Other kinases also appear to have similar effects with those review here, however it is important to notice that most of these small molecules could have multiple circadian targets, affecting the relation conclusions between target interference (activation / repression) and respective circadian clock consequence. Until this day, FDA has approved 48 small molecule protein kinase inhibitors, which reinforce the need to continue study different kinases regulatory role in the circadian clock⁸⁴.

DNA Topoisomerases (TOPs) are enzymes with key multiple functions related to topological status of the DNA structure - type I induce single-strand and type II double-strand

DNA breaks - regulating replication, recombination and chromatin remodeling⁸⁵. In fact, TOP1 and TOP2 upregulate *Bmal1* transcription⁸⁵. TOP1 inhibitor, camptothecin enhanced *Bmal1* transcription and lengthened the circadian period, and harmine - despite not affecting mRNA expression - also lengthens the circadian period of *Bmal1* transcription in fibroblasts and extend PER2 half-life in neuronal cells^{85,86}. On the other hand, DNA TOP2 inhibitors etoposide, mitoxantrone and amsacrine - three chemotherapeutic agents - are responsible for the contrary effect, they cause shortening period and phase advance⁸⁷. These studies elucidate the importance of chromatin structure on clock genes to define robustness of the circadian rhythms⁸⁵.

Silent Information Regulator 1 (SIRT1) is a NAD⁺-dependent protein deacetylase necessary for transcription of several clock genes - including *Bmal1*, *Per2* and *Cry1* - and responsible for deacetylation and degradation of protein PER2⁸⁸. Its function is directly dependent of circadian oscillation of coenzyme NAD⁺⁸⁹. SIRT1 activation with SRT2183 leads to a decrease of circadian genes expression. SRT1720 altered the circadian *in vivo* transcription and suppressed the expression peak of *Per2* and other genes. Unique sirtuin-activating compounds (STACs), SRTCD1023 and SERTCL1015, intensely reduced the rhythm's amplitude and also repressed clock genes expression. SRT1720 also lead to a decreased recruitment of the heterodimer CLOCK:BMAL1 to the promoter, suggesting that the formation of the complex can be SIRT1-dependent⁸⁹. STACs have been recently associated with extended life span in rodents, and also with anti-inflammatory activities and high safety profile in human clinical trials⁹⁰. Another example is resveratrol - natural antioxidant polyphenol - an activator that affects the circadian expression of Sirt1, restores clock genes and ameliorates circadian disorder of lipid metabolism induced by high-fat diet⁹¹.

Nuclear receptors, similar to the reviewed core ones REV-ERBs and RORs, have important regulative roles. For example, 17 β -estradiol (E₂) is responsible for inducing **Estrogen Receptor (ER)** signaling, and shortened circadian period in uterus but does not affect expression in the SCN^{92,93}. In addition, novel ER α antagonists showed antiproliferative effects in breast cancer MCF-7 cells with equivalent potency to the known drug tamoxifen⁹⁴. A recent study identified, from FDA-approved drugs and the International Drug Collection (IDC), 60 chemical compounds that altered circadian period. Between them, DHEA - steroid hormone produced in the adrenal gland, gonads, and brain - dose-dependent shortened the circadian period in all the tissues studied (including SCN). Dehydroepiandrosterone *in vivo* shortened circadian period of locomotor rhythms and accelerated re-entrainment to advance LD cycles suggesting potential for the treatment of jet-lag. Despite the 12 targets reported for DHEA in

humans and lack of knowledge about its mode of action, nuclear receptors such as AR and ER β are believed to have particular mechanistic interest⁹⁵.

Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) are diverse nuclear receptors that act as transcription factors and regulators of core clock components, such as *Bmal1* and Rev-erb α ⁹⁶. Rosiglitazone (RGZ), a known treatment of type 2 diabetes and agonist of PPAR γ , enhanced expression of *Bmal1* through PPAR response element (PPRE), regulating cardiovascular rhythms⁹⁷. The last review identified 84 types of PPAR ligands with clinical data available for the treatment of diabetes mellitus, dyslipidemia, cardiovascular diseases and others⁹⁸. **Retinoic acid receptors (RARs)** and **retinoid X receptors (RXRs)** have also demonstrated inhibition of *Bmal1* heterodimers dependent transcriptional activity, suggesting a negative regulation of the clock, as proven by the *trans* and *cis* version of retinoic acid⁹⁹. As the others, both of these receptors have multiple modulators, in this case with the potential use in the treatment of cancer and metabolic disorders¹⁰⁰.

2.3. Clock-Enhancing small Molecules (CEMs)

Amplitude is the most accurate clock indicative measure of a robustness circadian oscillation, and is, usually, measured in cell-based assays with luciferase reporter as the difference between the peak and the trough of the oscillatory wave¹². Taking advantage of the cell-based phenotypic assays, several clock amplitude-enhancing small molecule (CEMs) have been identified to enhance circadian amplitude^{34,101}.

The previous stated screen of approximately 200,000 synthetic compounds that identified compound I-3 as CKI inhibitors, also demonstrated that the compound 8, 9, 10 and 11 dose-dependent enhance clock amplitude³⁴. These compounds are also capable of bringing the amplitude of *Clock* ^{Δ 19} mutant mice - models with substantial circadian and physiological differences, including circadian desynchronization and attenuated amplitude¹⁰² - cells to near normal levels since, especially compound 10 and 11 that reportedly enhanced the amplitude of reporter oscillation by threefold³⁴. In addition, compound 10 also had the ability to interfere with reporter amplitude in *Clock* ^{Δ 19/+} SCN explants³⁴.

Nobiletin (NOB) is a dietary flavonoid found in *citrus* fruits with multiple pharmacological beneficial activities from neuroprotection to anticancer and cardiovascular protection^{103,104}. *Clock* ^{Δ 19/ Δ 19} homozygous mutant mice doesn't display attenuated circadian rhythm but instead broken oscillators with number of circadian and metabolic dysfunctions, including exaggerated obesity risk under high-fat diet (HFD) and elevated blood glucose and hypoinsulinemia, revealing

a strong link between a bad clock and metabolic disorders^{12,101}. NOB showed no effects on *Clock*^{Δ19/Δ19} homozygous mutant mice - revealing that NOB requires clock mechanisms for its activity - but was able to increase energy hemostasis and protect against metabolic syndrome in diet-induced obese (DIO) and *db/db* mutant mice (mimicking *Clock*^{Δ19/Δ19} physiological consequences of a broken clock)¹⁰¹. NOB increase energy hemostasis and amplitude due to its agonist effect in core clock component: ROR nuclear receptors¹⁰¹.

CEMs have also been associated with the levels of positive (CLOCK/BMAL1) and negative (PER/CRY) factors in the core feedback loop and with usually shorten period effect⁸⁷. However, NOB was later proven to lengthened the period showing that circadian regulatory mechanisms are highly numerous and complex¹⁰⁵. Another example of this diversity is the mentioned compound SR9011 - with similar beneficial activities in energy expenditure and metabolic diseases to NOB - an inverse agonist of REV-ERBs known for repressing amplitude of the clock³⁷. A siRNA screen using a reporter gene assay in human U2OS cells reported almost 1000 genes whose inhibition/knockdown resulted in a lower amplitude oscillation, suggesting, once again, the extensive network that regulates the circadian rhythm oscillations¹⁰⁶.

3. Pharmacological effects of small molecule modulators in circadian-related diseases & therapeutic potentials

Is now evident that a robust circadian rhythm is required for human health. Circadian rhythmicity may disturb and become desynchronized due to aging, shiftwork, jet travel, overnutrition, obesity, and cancer which disruption could promote the development of clock-related diseases such as metabolic syndrome, obesity, cardiovascular, autoimmunity, and cancer¹⁹.

Small molecule modulators of the circadian rhythm have the potential to restore the internal rhythms disturbed by the different circadian-related disorders ameliorating their physiologic consequences, and - in a more classic perspective - optimize chronotherapeutic for certain pharmacological treatments¹⁰⁷.

3.1. Metabolic disorders

Circadian clocks - and specially its disruption - has been associated with metabolic disorders. An elucidative example is that nighttime-restricted intake of HFD - compared to unrestricted feeding - protected mice against metabolic dysregulation, possibly because of the less storage

of excess nutrients due to suppressed energy expenditure. Notably, with this regime, oscillatory amplitude of clock and metabolic genes were significantly enhanced suggesting CEMs as potential metabolic regulators^{13,108}. Metabolic disorders have been strongly correlated with circadian clock amplitude disruption, as stated by *Clock*^{Δ19/Δ19} homozygous mutant mice physiopathology description. CEMs capable of restoring circadian amplitude could also ameliorate metabolic diseases, as NOB protected against metabolic syndrome, increased locomotor activity and EE when given to DIO mice¹⁰¹.

Several other small molecule compounds detailed in this review have also showed metabolic positive effects by targeting clock components with metabolic regulatory functions. SR9009, SR9011 and S10067, three REV-ERBs agonists that alter circadian pattern of clock genes and increased EE associated with lower fat mass, plasma TG and cholesterol levels³⁷. The lead REV-ERB agonist, GSK4112, was found to inhibit gluconeogenesis in primary mouse hepatocytes³⁵. Similarly, another core clock proteins, RORs was also found to potentially regulate metabolic mechanisms. SR1555, a RORγ inverse agonist modulator, reduce food intake, fat mass, body weight and improved insulin sensitivity in obese diabetic mice. This compound also induces thermogenic expression and increases fatty acid oxidation⁶³. SR3335, a RORα selective partial inverse agonist, suppress gluconeogenesis both *in vitro* and *in vivo* and lower glucose plasma levels⁵⁷. Similar to this, another compound with core clock activity, KL001 - a CRY's stabilizer - also repress glucagon-induced gluconeogenesis in primary mouse hepatocytes by suppressing glucagon-dependent induction of *Pck1* and *G6pc* genes⁴⁰.

Metabolic circadian regulation clearly has complex regulatory pathways, however CEMs, CRY/REV-ERBs activators, and ROR inverse agonists may provide novel therapeutic strategies against a large spectrum of metabolic disorders.

3.2. Cancer

Epidemiological studies have shown correlation between clock disruption diseases - such as shift work - and cancer's risk. In addition, research also suggest that circadian rhythm is altered in many types of human cancers^{109,110}.

Clock gene mutations - e.g. methylation, coding region mutation - are present, even at a low percentage, in many different tumor types. Since these mutations are responsible for clock alterations and given that proto-oncogenes and tumor suppressors are usually under circadian control, these clock oscillators could affect cancer-proteins expression. Examples of altered genes in cancer strongly regulated by the circadian clock are: RAS, p53 tumor suppressor protein and *MYC*^{110,111}. In addition to these direct oncogenic alterations in circadian rhythm,

these variations could also affect circadian metabolism regulation, or even oncogenic alterations can affect metabolism directly and reciprocally through feedback regulation, that eventually will also disrupt the circadian clock^{109,111}.

Some small molecules have shown benefic effects in certain types of cancer cells. KSI5, a CRY1/2 inhibitor, exhibited variations in the expression of cancer cell cycle regulators, reduced MCF-7 cells growth and also increased chemosensitivity in this specific type of human breast cancer⁴².

REV-ERB β appears to be overexpressed in cancer cells with a protective action on these tumor cells. ARN5187 - a dual inhibitor of both autophagy and REV-ERB β - promotes cytotoxicity in cancer cells⁵¹. On the other hand, REV-ERBs' agonists SR9009 and SR9011, showed anticancer selective activity against multiple oncogenic drivers, and apoptotic regulation in tumor cells without affecting normal tissues¹³³. These results suggest that REV-ERBs activity in cancer tissues require further clarification.

ROR agonists such as SRI078 and LYC-55716 also affect tumor development. SRI078, a ROR α agonist, affected metabolic pathways in hepatoma cells and inhibit hepatoma growth both *in vitro* and *in vivo*⁵⁵. LYC-55716 (cintirorgon), a ROR γ agonist, increase T-cell immune activity and also decrease immune suppression in tumor environment. LYC-55716 already demonstrated a favorable safety profile, has been tested in solid tumors and in combination with pembrolizumab in patients with non-small cell lung cancer¹¹² (**Appendix Table 5**).

Cancer therapy also targets several pathways relevant in circadian rhythm regulations, so "time-of-day intervention" - known as chronotherapy - has become truly relevant in the treatment of the diverse types of cancer¹⁰⁹. Since small molecules impact many of antitumor mechanisms, these clock modulators combined with classic anti-cancer agents have the potential to improve resistant cancers' treatment.

3.3. Circadian misalignment disorders

Jet lag (circadian misalignment) and shift work (circadian chronic misalignment) are associated with misalignment of the internal circadian rhythms and external solar time, increasing the risk of associated clock disorders such as metabolic disorders, cancer, cerebrovascular and others¹¹³.

An interesting study have shown that mice lacking both vasopressin VIa and VIb (*VI^{a-/-}VIb^{-/-}* mice) receptors are resistant to jet lag without major consequent anomalies and the weaker the arginine vasopressin (AVP) communication, the shorter the reentrainment period¹¹⁴. With this in mind, OPC-21268 (VIa antagonist) and SSR 149415 (VIb antagonist) treatment caused

mice a faster reentrained to new light-dark (LD) cycles. Therefore, circadian rhythm regulation via vasopressin signaling and shorten phase compounds - e.g. V1 antagonists - could be a novel therapeutic strategy in misalignment caused by jet lag and shift work disorders¹¹⁴.

3.4. Neuropsychiatric - sleep and mood - disorders

Circadian rhythm has been associated with sleep and **sleep disturbances** such as familial advanced sleep- phase syndrome (FASPS) - family heritable very early bedtime tendency - and delayed sleep-phase syndrome (DSPS) - very late bedtime tendency¹⁹. FASPS is associated with a T44A mutation in CK1 δ , causing hypophosphorylation of PER2 and characterized by circadian period shortening¹¹⁵. Notably, the reviewed CK1 δ pharmacological inhibitor PF-670462 lengthened the period and extended the duration of PER2 transcription⁸⁰. *Vipr2*^{-/-} mice (lacking VPAC₂ receptors) exhibit disrupted circadian behavior mainly in locomotor behavior and neuronal activity along arrhythmic circadian phenotype¹¹⁶. Even in these mice models, the CK1 δ inhibitor was able to restore robust circadian rhythms with persist 24-h activity cycles suggesting CK1 δ modulation as potential efficacious treatment for perturbed circadian behavior and sleep disorders⁸⁰. It is also important to mention the well-studied chronobiotic effect of exogenous Melatonin responsible for synchronizing the SCN clock that has leading to the development of relevant melatonin agonists for the treatment of circadian and sleep disorders¹¹⁷.

Similar to Clock ^{Δ 19/ Δ 19} mice characterization - mania-like behavior, hyperactivity, anxiety-like behavior and DAergic increased transmission - humans suffer from equal disrupted circadian rhythms in **mood disorders**, such as Anxiety Disorder, Major Depressive Disorder (MDD), Bipolar Disorder (BPD)¹¹⁸. REV-ERBs modulators have diverse cellular effects related to mood regulation but their mechanism is yet to be fully disclosed. REV-ERB α absence activity - either by gene deletion or pharmacological inhibition - is responsible for mania-like behavior and hyperdopaminergic state⁴⁶. Pharmacological inhibition caused by REV-ERB α antagonist SR8278 is responsible for producing mania-like behavior and inducing hyper DAergic state in mice^{44,46}. On the other hand, REV-ERBs agonists GSK4112 derivatives - SR9009, SR9011 and SR10067 - induce wakefulness, suppress sleep, regulate emotional behavior in mice and reduce anxiety-like behavior⁴⁸. SR9009 also suppress rewarding behavior associated with cocaine⁴⁷. Lithium is a classic example of a mood stabilizer - used to treat BPD - with effect on the circadian clock by targeting GSK-3 β , a kinase responsible for stabilizing REV-ERB α . In addition to the

mood activity possibly due to REV-ERB effect, it also lengthen period, activate PER2 protein expression and enhanced circadian amplitude (and can be considered a CEM)¹². These indicate that targeting REV-ERB - or relevant adjuncts, such as GSK-3 - may lead to the development of innovative pathways to regulate mood disorders.

3.5. Inflammation and autoimmune disorders

Numerous studies have established the link between the immune system and the circadian clock, and also evaluated the impact of clock genes in the expression of pro-inflammatory cytokines¹¹⁹. Accordingly, various small molecules were found to control inflammatory expression with the potential to regulate immune disorders. REV-ERBs agonist GSK4112 and its analogues, selective REV-ERB α agonists - GSK2945, GSK0999, GSK5072 and GSK2667 - suppress IL-6 expression in human cells and consequently inflammatory response, showing the potential regulatory effect of REV-ERB α in immune disorders^{43,50}.

As stated previously in this review, ROR γ is a key regulator of TH17 cell differentiation. ROR γ inverse agonist modulators have the capacity to reduce IL-17 production for the treatment of multiple autoimmune diseases (rheumatoid arthritis, multiple sclerosis, psoriasis and others)⁶⁶. T1317, SR1001, SR2211, SR1555, ML209, TMP778, GSK805 and others have, exhibit suppressing of TH17 cell differentiation and respective cytokine expression, with various benefic consequences in mice models for autoimmune and inflammation diseases (multiple sclerosis, intestinal inflammation, psoriasis, and others) - (**Appendix Table 3**). There is, at least, seven ROR γ /ROR ϵ inhibitors tested in clinical trials for diseases such as Psoriasis and Multiple Sclerosis (**Appendix Table 4**). The recent marketing authorization for human monoclonal antibody inhibitors of interleukin IL-17 for the treatment of psoriasis, supports the possibility of a small-molecule-based drug for the treatment of a interleukin IL-17 related disorder within a short time⁷⁵.

3.6. Aging

Aging is responsible for multiple circadian dampening such as weaker circadian synchronization and lower amplitude in trivial physiological processes^{11,20,120}. It is also associated with sleep fragmentation and disruption of the of the sleep/wake cycle, similarly to age-related disorders¹². Taking into account that endogenous rhythms dampen with age, the timing of external clues, despite slower, is important for the robust amplitude of the clock¹²⁰. Accordingly, caloric restriction (CR) has a unique role in slowing down aging, increasing

lifespan and healthspan across all the species whilst increasing amplitude in circadian rhythms¹²¹. On the other hand, CR regulates circadian expression, increase SIRT1 levels influencing insulin sensitivity and providing essential proprieties in response to diet and exercise¹²². Notably, resveratrol - and other STACs - also stimulate SIRT1 activity and have the potential to delay aging and age-related diseases¹²³.

In conclusion, small molecules promoting clock amplitude enhancing such as CEMs - mimicking CR and protecting against amplitude dumping related to aging - or that stimulate SIRT1 have the potential to protect against aging and its related diseases. Moreover, resveratrol - and other similar molecules - has double potential, since it is both CEM and STAC.

4. Conclusion: Emerging hazards & future perspectives

Circadian rhythm and chronotherapeutic are beginning to take an important role in drug development, since, nowadays, research studies demonstrated that more than 55% of the best-selling drugs in the US target the product expression of a circadian gene, and almost all of them have half-lives inferior to 6 hours alerting for the importance of the administration time on drug's efficacy and security⁹. In addition, approximately 5% of drugs on the market or in clinical trials altered the circadian period⁹⁵.

With the increasing awareness related to the circadian rhythm associated diseases, pharmacological manipulation of the clock is emerging as a therapeutic option to reestablish clock regulation and health physiology. Therapeutic strategies targeting biological rhythms - chronomedicine¹²⁴ - have now covered all the steps from: screening; chemical optimization for selective effect and enhanced oral bioavailability; structure-base design: detailed clock mechanisms research; preclinical disease models; and, more recently, clinical trials (**Appendix Table 4**) (**Appendix Table 5**). They also present several advantages against other novel therapeutic approaches, such as gene therapy, since they have reversible and dose-dependent physiological actions²⁷.

As has been mentioned in this review, circadian clock function is a complex multi-pathway network, often with various, and not always expected, outputs. Evidence of this fact is that even within agonists and antagonists, they could have different circadian mechanisms, and also stimulation or inhibition of the same target both can be beneficial or disadvantageous. It is required evaluation of the sustained pharmacological effects of the small molecule - and not oversimplification of the compound effect in only individual clock components - in order to test the inherent balance of the clock and the global characterization of the pharmacological compound^{12,124}.

It is also interesting to notice that the REV-ERBs agonist SR9009 (also known as stenabolic), and related compounds - SR9011, GSK2945, GSK0999, GSK5072 and GSK2667 - are now marketed as “sports performance enhancers, anti-aging or fat-reducing products” and have been sold mostly through online suppliers¹²⁶. Stenabolic is already considered as “a cutting-edge alternative to steroids” despite the lack of human trials and its potential carcinogenic effects¹²⁶. They have been considered “Banned substances in sports supplements” by the Australian Capital Territory Government and SR9009 is also prohibited under the World Anti-Doping Agency (WADA) Prohibited List category S4 'Hormone and Metabolic Modulators'^{127,128}. Most of these GSK4112 analogues contain a nitrothiophene group which presents a substantial carcinogenic risk in addition to the circadian-related implications as sleep disruption, metabolic and mental health problems¹²⁶. However, a recent study showed that SR9009 and SR9011 have selective anticancer activity against tumor cells without affecting normal cells¹³³. Once again, it is clear the complexity of the circadian pathways and the necessity to make a detailed and complete assessment of the small molecule effect before proceeding into clinical trials.

In conclusion, the study of new small-molecules modulators of the circadian rhythm will help understand clockwork machinery with great impact in human health maintenance, disclose novel perspectives in time-of-day dose in drugs chronotherapy and have the potential to be soon used as drugs in the treatment of diverse clock-related diseases, from metabolic-associated diseases, autoimmune disorders, mood disorders, cancer and aging.

5. References

1. TAKAHASHI, J. S. - **Transcriptional architecture of the mammalian circadian clock.** *Nat. Rev. Genet.*, 18 (2017) 164–179.
2. HERZOG, E. D. - **Neurons and networks in daily rhythms.** *Nature Reviews Neuroscience*, 8 (2007) 790–802.
3. LIU, A. C., WELSH, D. K., KO, C. H., TRAN, H. G., ZHANG, E. E., PRIEST, A. A., BUHR, E. D., SINGER, O., MEEKER, K., VERMA, I. M., DOYLE, F. J., TAKAHASHI, J. S., KAY, S. A. - **Intercellular Coupling Confers Robustness against Mutations in the SCN Circadian Clock Network.** *Cell*, 129 (2007) 605–616.
4. REPPERT, S. M., WEAVER, D. R. - **Coordination of circadian timing in mammals.** *Nature*, 418 (2002) 935–941.
5. HASTINGS, M. H., REDDY, A. B., MAYWOOD, E. S. - **A clockwork web: Circadian timing in brain and periphery, in health and disease.** *Nat. Rev. Neurosci.*, 4 (2003) 649–661.
6. YAMAZAKI, S., NUMANO, R., ABE, M., HIDA, A., TAKAHASHI, R. I., UEDA, M., BLOCK, G. D., SAKAKI, Y., MENAKER, M., TEI, H. - **Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats.** *Science*, 288 (2000) 682–685.
7. DAMIOLA, F., SCHIBLER, U., GENE, C. - **A Serum Shock Induces Circadian Gene Expression in Mammalian Tissue Culture Cells.** *Cell*, 93 (1998) 929–937.
8. BROWN, S. A., ZUMBRUNN, G., FLEURY-OLELA, F., PREITNER, N., SCHIBLER, U. - **Rhythms of mammalian body temperature can sustain peripheral circadian clocks.** *Curr. Biol.*, 12 (2002) 1574–1583.
9. ZHANG, R., LAHENS, N. F., BALLANCE, H. I., HUGHES, M. E., HOGENESCH, J. B. - **A circadian gene expression atlas in mammals: Implications for biology and medicine.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 111 (2014) 16219–16224.
10. LIU, A. C., LEWIS, W. G., KAY, S. A. - **Mammalian circadian signaling networks and therapeutic targets.** *Nat. Chem. Biol.*, 3 (2007) 630–639.
11. CHEN, Z., YOO, S., TAKAHASHI, J. S. - **Development and Therapeutic Potential of Small-Molecule Modulators of Circadian Systems.** *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 58 (2018) 231–252.
12. GLOSTON, G. F., YOO, S., CHEN, Z. J. - **Clock-enhancing Small Molecules and Potential Applications in Chronic Diseases and Aging.** *Frontiers in Neurology*, 8 (2017) 1–12.
13. HE, B., CHEN, Z. - **Molecular Targets for Small-Molecule Modulators of Circadian Clocks.** *Curr. Drug Metab.*, 17 (2016) 503–512.
14. KOJIMA, S., SHINGLE, D. L., GREEN, C. B. - **Post-transcriptional control of circadian rhythms.** *J. Cell Sci.*, 124 (2011) 311–320.
15. REISCHL, S., KRAMER, A. - **Kinases and phosphatases in the mammalian circadian clock.** *FEBS Lett.*, 585 (2011) 1393–1399.
16. GATFIELD, D., SCHIBLER, U. - **Proteasomes keep the circadian clock ticking.** *Science*, 316 (2007) 1135–1136.
17. STORCH, K. F., LIPAN, O., LEYKIN, I., VISWANATHAN, N., DAVIS, F. C., WONG, W. H., WEITZ J., C. - **Extensive and divergent circadian gene expression in liver and heart.** *Nature*, 417 (2002) 78–83.

18. SCHROEDER, A. M., COLWELL, C. S. - **How to fix a broken clock.** Trends in Pharmacological Sciences, 34 (2013) 605–619.
19. BASS, J., LAZAR, M. A. - **Circadian time signatures of fitness and disease.** Science, 354 (2016) 994–999.
20. NAKAMURA, T. J., NAKAMURA, W., YAMAZAKI, S., KUDO, T., CUTLER, T., COLWELL, C. S., BLOCK, G. D. - **Age-related decline in circadian output.** J. Neurosci., 31 (2011) 10201–10205.
21. PATEL, S. A., CHAUDHARI, A., GUPTA, R., VELINGKAAR, N., KONDRATOV, R. V. - **Circadian clocks govern calorie restriction-mediated life span extension through BMAL1- and IGF-I-dependent mechanisms.** FASEB J., 30 (2016) 1634–1642.
22. LEVI, F., SCHIBLER, U. - **Circadian Rhythms: Mechanisms and Therapeutic Implications.** Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., 47 (2007) 593–628.
23. PEEPLES, L. - **Medicine’s secret ingredient — it’s in the timing.** Nature, 556 (2018) 290–292.
24. DALLMANN, R., OKYAR, A., LÉVI, F. - **Dosing-Time Makes the Poison: Circadian Regulation and Pharmacotherapy.** Trends in Molecular Medicine, 22 (2016) 430–445.
25. LÉVI, F., OKYAR, A. - **Circadian clocks and drug delivery systems: Impact and opportunities in chronotherapeutics.** Expert Opin. Drug Deliv., 8 (2011) 1535–1541.
26. BRUNNER-ZIEGLER, S., JILMA, B., SCHÖRGENHOFER, C., WINKLER, F., JILMA-STOHLAWETZ, P., KOPPENSTEINER, R., QUEHENBERGER, P., SEGER, C., WEIGEL, G., GRIESMACHER, A., BRUNNER, M. - **Comparison between the impact of morning and evening doses of rivaroxaban on the circadian endogenous coagulation rhythm in healthy subjects.** J. Thromb. Haemost., 14 (2016) 316–323.
27. WALLACH, T., KRAMER, A. - **Chemical chronobiology: Toward drugs manipulating time.** FEBS Letters, 589 (2015) 1530–1538.
28. OSHIMA, T., YAMANAKA, I., KUMAR, A., YAMAGUCHI, J., NISHIWAKI-OHKAWA, T., MUTO, K., KAWAMURA, R., HIROTA, T., YAGITA, K., IRLE, S., KAY, S. A., YOSHIMURA, T., ITAMI, K. - **C-H activation generates period-shortening molecules that target cryptochrome in the mammalian circadian clock.** Angew. Chemie - Int. Ed., 54 (2015) 7193–7197.
29. HIROTA, T., KAY, S. A. - **Identification of small-molecule modulators of the circadian clock.** Methods in Enzymology, 551 (2015) 267–282.
30. CHERNOV, M. V., GLEIBERMAN, A. S., FEDTSOVA, N. - **Selenium is a modulator of circadian clock that protects mice from the toxicity of a chemotherapeutic drug via upregulation of the core clock protein , BMAL1.** Oncotarget, 2 (2011) 1279–1290.
31. CHUN, S. K., JANG, J., CHUNG, S., YUN, H., KIM, N. J., JUNG, J. W., SON, G. H., SUH, Y. G., KIM, K. - **Identification and validation of cryptochrome inhibitors that modulate the molecular circadian clock.** ACS Chem. Biol., 9 (2014) 703–710.
32. HIROTA, T., LEWIS, W. G., LIU, A. C., JAE, W. L., SCHULTZ, P. G., KAY, S. A. - **A chemical biology approach reveals period shortening of the mammalian circadian clock by specific inhibition of GSK-3 β .** Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 105 (2008) 20746–20751.

33. HIROTA, T., LEE, J. W., JOHN, P. C. S., SAWA, M., IWASAKO, K., NOGUCHI, T., PONGSAWAKUL, P. Y., SONNTAG, T., WELSH, D. K., DAVID, A., III, F. J. D., SCHULTZ, P. G., KAY, S. A. - **Identification of Small Molecule Activators of Cryptochrome.** *Science*, 337 (2012) 1094–1097.
34. CHEN, Z., YOO, S. H., PARK, Y. S., KIM, K. H., WEI, S., BUHR, E., YE, Z. Y., PAN, H. L., TAKAHASHI, J. S. - **Identification of diverse modulators of central and peripheral circadian clocks by high-throughput chemical screening.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 109 (2012) 101–106.
35. GRANT, D., YIN, L., COLLINS, J. L., PARKS, D. J., ORBAND-MILLER, L. A., WISELY, G. B., JOSHI, S., LAZAR, M. A., WILLSON, T. M., ZUERCHER, W. J. - **GSK4112, a small molecule chemical probe for the cell biology of the nuclear heme receptor rev-erb α .** *ACS Chem. Biol.*, 5 (2010) 925–932.
36. CZARNA, A., BERNDT, A., SINGH, H. R., GRUDZIECKI, A., LADURNER, A. G., TIMINSZKY, G., KRAMER, A. and WOLF, E. - **Structures of drosophila cryptochrome and mouse cryptochrome1 provide insight into circadian function.** *Cell*, 153 (2013) 1394.
37. SOLT, L. A., WANG, Y., BANERJEE, S., HUGHES, T., KOJETIN, D. J., LUNDASEN, T., SHIN, Y., LIU, J., CAMERON, M. D., NOEL, R., YOO, S. H., TAKAHASHI, J. S., BUTLER, A. A., KAMENECKA, T. M., BURRIS, T. P. - **Regulation of circadian behaviour and metabolism by synthetic REV-ERB agonists.** *Nature*, 485 (2012) 62–68.
38. VON BERG, S., XUE, Y., COLLINS, M., LLINAS, A., OLSSON, R. I., HALVARSSON, T., LINDSKOG, M., MALMBERG, J., JIRHOLT, J., KRUTRÖK, N., RAMNEGÅRD, M., BRÄNNSTRÖM, M., LUNDQVIST, A., LEPISTÖ, M., AAGAARD, A., MCPHEAT, J., HANSSON, E., CHEN, R., XIONG, Y., HANSSON, T. G., NARJES, F., - **Discovery of Potent and Orally Bioavailable Inverse Agonists of the Retinoic Acid Receptor-Related Orphan Receptor C2.** *ACS Med. Chem. Lett.*, 10 (2019) 972–977.
39. JANG, J., CHUNG, S., CHOI, Y., LIM, H. Y., SON, Y., CHUN, S. K., SON, G. H., KIM, K., SUH, Y. G., JUNG, J. W. - **The cryptochrome inhibitor KS15 enhances E-box-mediated transcription by disrupting the feedback action of a circadian transcription-repressor complex.** *Life Sci.*, 200 (2018) 49–55.
40. LAMIA, K. A., PAPP, S. J., YU, R. T., BARISH, G. D., UHLENHAUT, N. H., JONKER, J. W., DOWNES, M., EVANS, R. M. - **Cryptochromes mediate rhythmic repression of the glucocorticoid receptor.** *Nature*, 480 (2011) 552–556.
41. LEE, J. W., HIROTA, T., KUMAR, A., KIM, N. J., IRLE, S., KAY, S. A. - **Development of Small-Molecule Cryptochrome Stabilizer Derivatives as Modulators of the Circadian Clock.** *ChemMedChem*, 10 (2015) 1489–1497.
42. CHUN, S. K., CHUNG, S., KIM, H. D., LEE, J. H., JANG, J., KIM, J., KIM, D., SON, G. H., OH, Y. J., SUH, Y. G., LEE, C. S., KIM, K. - **A synthetic cryptochrome inhibitor induces anti-proliferative effects and increases chemosensitivity in human breast cancer cells.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 467 (2015) 441–446.
43. GIBBS, J. E., BLAIKLEY, J., BEESLEY, S., MATTHEWS, L., SIMPSON, K. D., BOYCE, S. H., FARROW, S. N., ELSE, K. J., SINGH, D., RAY, D. W., LOUDON, A. S. I. - **The nuclear receptor REV-ERB α mediates circadian regulation of innate immunity through selective regulation of inflammatory cytokines.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 109 (2012) 582–587.
44. KOJETIN, D., WANG, Y., KAMENECKA, T. M., BURRIS, T. P. - **Identification of SR8278, a**

- synthetic antagonist of the nuclear heme receptor REV-ERB.** ACS Chem. Biol., 6 (2011) 131–134.
45. VIEIRA, E., MARROQUÍ, L., FIGUEROA, A. L. C., MERINO, B., FERNANDEZ-RUIZ, R., NADAL, A., BURRIS, T. P., GOMIS, R., QUESADA, I. - **Involvement of the Clock Gene Rev-erb alpha in the Regulation of Glucagon Secretion in Pancreatic Alpha-Cells.** PLoS One, 8 (2013), e69939.
 46. CHUNG, S., LEE, E. J., YUN, S., CHOE, H. K., PARK, S. B., SON, H. J., KIM, K. S., DLUZEN, D. E., LEE, I., HWANG, O., SON, G. H., KIM, K. - **Impact of circadian nuclear receptor REV-ERB α on midbrain dopamine production and mood regulation.** Cell, 157 (2014) 858–868.
 47. WOLDT, E., SEBTI, Y., SOLT, L. A., DUHEM, C., LANCEL, S., EECKHOUTE, J., HESSELINK, M. K. C., PAQUET, C., DELHAYE, S., SHIN, Y., KAMENECKA, T. M., SCHAART, G., LEFEBVRE, P., NEVIÈRE, R., BURRIS, T. P., SCHRAUWEN, P., STAELS, B., DUEZ, H. - **Rev-erb- α modulates skeletal muscle oxidative capacity by regulating mitochondrial biogenesis and autophagy.** Nat. Med., 19 (2013) 1039–1046.
 48. BANERJEE, S., WANG, Y., SOLT, L. A., GRIFFETT, K., KAZANTZIS, M., AMADOR, A., EL-GENDY, B. M., HUITRON-RESENDIZ, S., ROBERTS, A. J., SHIN, Y., KAMENECKA, T. M., BURRIS, T. P. - **Pharmacological targeting of the mammalian clock regulates sleep architecture and emotional behaviour.** Nat. Commun., 5 (2014) 1–13.
 49. AMADOR, A., WANG, Y., BANERJEE, S., KAMENECKA, T. M., SOLT, L. A., BURRIS, T. P. - **Pharmacological and genetic modulation of REV-ERB activity and expression affects orexigenic gene expression.** PLoS One, 11 (2016) 14–16.
 50. TRUMP, R. P., BRESCIANI, S., COOPER, A. W. J., TELLAM, J. P., BLAIKLEY, J., ORBAND-MILLER, L. A., KASHATUS, J. A., DAWSON, H. C., LOUDON, A., RAY, D., GRANT, D., FARROW, S. N., WILLSON, T. M., TOMKINSON, N. C. O. - **Optimized Chemical Probes for REV-ERB α .** J. Med. Chem., 56 (2013) 4729–4737.
 51. DE MEI, C., ERCOLANI, L., PARODI, C., VERONESI, M., VECCHIO, C. LO, BOTTEGONI, G., TORRENTE, E., SCARPELLI, R., MAROTTA, R., RUFFILI, R., MATTIOLI, M., REGGIANI, A., WADE, M., GRIMALDI, B. - **Dual inhibition of REV-ERB β and autophagy as a novel pharmacological approach to induce cytotoxicity in cancer cells.** Oncogene, 34 (2015) 2597–2608.
 52. KOJETIN, D. J., BURRIS, T. P. - **REV-ERB and ROR nuclear receptors as drug targets.** Nat. Rev. Drug Discov., 13 (2014) 197–216.
 53. WANG, Y., KUMAR, N., NUHANT, P., CAMERON, M. D., ISTRATE, M. A., ROUSH, W. R., GRIFFIN, P. R., BURRIS, T. P. - **Identification of SR1078, a synthetic agonist for the orphan nuclear receptors ROR α and ROR γ .** ACS Chem. Biol., 5 (2010) 1029–1034.
 54. KUMAR, N., SOLT, L. A., CONKRIGHT, J. J., WANG, Y., ISTRATE, M. A., BUSBY, S. A., GARCIA-ORDONEZ, R. D., BURRIS, T. P., GRIFFIN, P. R. - **The Benzenesulfoamide T0901317 [N-(2,2,2-Trifluoroethyl)-N-[4-[2,2,2-trifluoro-1-hydroxy-1-(trifluoromethyl)ethyl]phenyl]-benzenesulfonamide] Is a Novel Retinoic Acid Receptor-Related Orphan Receptor-alpha/beta Inverse Agonist.** Mol. Pharmacol., 77 (2010) 228–236.
 55. BYUN, J. K., CHOI, Y. K., KANG, Y. N., JANG, B. K., KANG, K. J., JEON, Y. H., LEE, H. W., JEON, J. H., KOO, S. H., JEONG, W. IL, HARRIS, R. A., LEE, I. K., PARK, K. G. - **Retinoic acid-**

- related orphan receptor alpha reprograms glucose metabolism in glutamine-deficient hepatoma cells. *Hepatology*, 61 (2015) 953–964.
56. WANG, Y., BILLON, C., WALKER, J. K., BURRIS, T. P. - **Therapeutic Effect of a Synthetic ROR α / γ Agonist in an Animal Model of Autism.** *ACS Chem. Neurosci.*, 7 (2016) 143–148.
 57. KUMAR, N., KOJETIN, D. J., SOLT, L. A., KUMAR, K. G., NUHANT, P., DUCKETT, D. R., CAMERON, M. D., BUTLER, A. A., ROUSH, W. R., GRIFFIN, P. R., BURRIS, T. P. - **Identification of SR3335 (ML-176): A synthetic ROR α selective inverse agonist.** *ACS Chem. Biol.*, 6 (2011) 218–222.
 58. SOLT, L. A., KUMAR, N., NUHANT, P., WANG, Y., LAUER, J. L., LIU, J., ISTRATE, M. A., KAMENECKA, T. M., ROUSH, W. R., VIDOVIĆ, D., SCHÜRER, S. C., XU, J., WAGONER, G., DREW, P. D., GRIFFIN, P. R., BURRIS, T. P. - **Suppression of TH17 differentiation and autoimmunity by a synthetic ROR ligand.** *Nature*, 472 (2011) 491–494.
 59. KUMAR, N., LYDA, B., CHANG, M. R., LAUER, J. L., SOLT, L. A., BURRIS, T. P., KAMENECKA, T. M., GRIFFIN, P. R. - **Identification of SR2211: A potent synthetic ROR γ -selective modulator.** *ACS Chem. Biol.*, 7 (2012) 672–677.
 60. CHANG, M. R., LYDA, B., KAMENECKA, T. M., GRIFFIN, P. R. - **Pharmacologic repression of retinoic acid receptor-related orphan nuclear receptor γ is therapeutic in the collagen-induced arthritis experimental model.** *Arthritis Rheumatol.*, 66 (2014) 579–588.
 61. WANG, J., ZOU, J. X., XUE, X., CAI, D., ZHANG, Y., DUAN, Z., XIANG, Q., YANG, J. C., LOUIE, M. C., BOROWSKY, A. D., GAO, A. C., EVANS, C. P., LAM, K. S., XU, J., KUNG, H. J., EVANS, R. M., XU, Y., CHEN, H. W. - **ROR- γ drives androgen receptor expression and represents a therapeutic target in castration-resistant prostate cancer.** *Nat. Med.*, 22 (2016) 488–496.
 62. SOLT, L. A., KUMAR, N., HE, Y., KAMENECKA, T. M., GRIFFIN, P. R., BURRIS, T. P. - **Identification of a selective ROR γ ligand that suppresses TH17 cells and stimulates T regulatory cells.** *ACS Chem. Biol.*, 7 (2012) 1515–1519.
 63. CHANG, M. R., HE, Y., KHAN, T. M., KURUVILLA, D. S., GARCIA-ORDONEZ, R., CORZO, C. A., UNGER, T. J., WHITE, D. W., KHAN, S., LIN, L., CAMERON, M. D., KAMENECKA, T. M., GRIFFIN, P. R. - **Antiobesity effect of a small molecule repressor of ROR γ .** *Mol. Pharmacol.*, 88 (2015) 48–56.
 64. TANG, L., YANG, X., LIANG, Y., XIE, H., DAI, Z., ZHENG, G. - **Transcription factor retinoid-related orphan receptor γ : A promising target for the treatment of psoriasis.** *Frontiers in Immunology*, 9 (2018).
 65. IVANOV, I. I., MCKENZIE, B. S., ZHOU, L., TADOKORO, C. E., LEPELLEY, A., LAFAILLE, J. J., CUA, D. J., LITTMAN, D. R. - **The Orphan Nuclear Receptor ROR γ t Directs the Differentiation Program of Proinflammatory IL-17+ T Helper Cells.** *Cell*, 126 (2006) 1121–1133.
 66. CYR, P., BRONNER, S. M., CRAWFORD, J. J. - **Recent progress on nuclear receptor ROR γ modulators.** *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 26 (2016) 4387–4393.
 67. WANG, Y., KUMAR, N., CRUMBLEY, C., GRIFFIN, P. R., BURRIS, T. P. - **A second class of nuclear receptors for oxysterols: Regulation of ROR α and ROR γ activity by 24S-hydroxycholesterol (cerebrosterol).** *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol.*

- Lipids, 1801 (2010) 917–923.
68. WANG, Y., KUMAR, N., SOLT, L. A., RICHARDSON, T. I., HELVERING, L. M., CRUMBLY, C., GARCIA-ORDONEZ, R. D., STAYROOK, K. R., ZHANG, X., NOVICK, S., CHALMERS, M. J., GRIFFIN, P. R., BURRIS, T. P. - **Modulation of retinoic acid receptor-related orphan receptor α and γ activity by 7-oxygenated sterol ligands.** *J. Biol. Chem.*, 285 (2010) 5013–5025.
 69. LEE, J., BAEK, S., LEE, J., LEE, J., LEE, D. G., PARK, M. K., CHO, M. LA, PARK, S. H., KWOK, S. K. - **Digoxin ameliorates autoimmune arthritis via suppression of Th17 differentiation.** *Int. Immunopharmacol.*, 26 (2015) 103–111.
 70. HUH, J. R., LEUNG, M. W. L., HUANG, P., RYAN, D. A., KROUT, M. R., MALAPAKA, R. R. V., CHOW, J., MANEL, N., CIOFANI, M., KIM, S. V., CUESTA, A., SANTORI, F. R., LAFAILLE, J. J., XU, H. E., GIN, D. Y., RASTINEJAD, F., LITTMAN, D. R. - **Digoxin and its derivatives suppress T H17 cell differentiation by antagonizing ROR γ t activity.** *Nature*, 472 (2011) 486–490.
 71. XU, T., WANG, X., ZHONG, B., NURIEVA, R. I., DING, S., DONG, C. - **Ursolic acid suppresses interleukin-17 (IL-17) production by selectively antagonizing the function of ROR γ t protein.** *J. Biol. Chem.*, 286 (2011) 22707–22710.
 72. SKEPNER, J., RAMESH, R., TROCHA, M., SCHMIDT, D., BALOGLU, E., LOBERA, M., CARLSON, T., HILL, J., ORBAND-MILLER, L. A., BARNES, A., BOUDJELAL, M., SUNDRUD, M., GHOSH, S., YANG, J. - **Pharmacologic Inhibition of ROR γ t Regulates Th17 Signature Gene Expression and Suppresses Cutaneous Inflammation In Vivo.** *J. Immunol.*, 192 (2014) 2564–2575.
 73. XIAO, S., YOSEF, N., YANG, J., WANG, Y., ZHOU, L., ZHU, C., WU, C., BALOGLU, E., SCHMIDT, D., RAMESH, R., LOBERA, M., SUNDRUD, M. S., TSAI, P. Y., XIANG, Z., WANG, J., XU, Y., LIN, X., KRETSCHMER, K., RAHL, P. B., YOUNG, R. A., ZHONG, Z., HAFLER, D. A., REGEV, A., GHOSH, S., MARSON, A., KUCHROO, V. K. - **Small-molecule ROR γ t antagonists inhibit T helper 17 cell transcriptional network by divergent mechanisms.** *Immunity*, 40 (2014) 477–489.
 74. WITHERS, D. R., HEPWORTH, M. R., WANG, X., MACKLEY, E. C., HALFORD, E. E., DUTTON, E. E., MARRIOTT, C. L., BRUCKLACHER-WALDERT, V., VELDHOEN, M., KELSEN, J., BALDASSANO, R. N., SONNENBERG, G. F. - **Transient inhibition of ROR- γ t therapeutically limits intestinal inflammation by reducing TH17 cells and preserving group 3 innate lymphoid cells.** *Nat. Med.*, 22 (2016) 319–323.
 75. CARRASCOSA, J. M., JACOBS, I., PETERSEL, D., STROHAL, R. - **Biosimilar Drugs for Psoriasis: Principles, Present, and Near Future.** *Dermatology and Therapy*, 8 (2018) 173–194.
 76. SCHNUTE, M. E., WENNERSTAL, M., ALLEY, J., BENGTSSON, M., BLINN, J., BOLTEN, C. W., BRADEN, T., BONN, T., CARLSSON, B., CASPERS, N., CHEN, M., CHOI, C., COLLIS, LEON P. CROUSE, K., FÄRNEGARDH, M., FENNELL, K. F., FISH, S., FLICK, A. C., GOOS-NILSSON, A., GULLBERG, H., HARRIS, P. K., HEASLEY, S. E., HEGEN, M., HROMOCKYJ, A. E., HU, X., HUSMAN, B., JANOSIK, T., JONES, P., KAILA, N., KALLIN, E., KAUPPI, B., KIEFER, J.R., KNAFELS, J., KOEHLER, K., KRUGER, L., KURUMBAIL, R. G., KYNE, R. E., LI, W., LÖFSTEDT, J., LONG, S. A., MENARD, C. A., MENTE, S., MESSING, D., MEYERS, M. J., NAPIERATA, L., NÖTEBERG, D., NUHANT, P., PELC, M. J., PRINSEN, M. J., RHÖNNSTAD, P., BACKSTRÖM-RYDIN, E., SANDBERG, J., SANDSTRÖM, M., SHAH, F., SJÖBERG, M., SUNDELL, A., TAYLOR, A. P., THORARENSEN, A.,

- TRUJILLO, J. I., TRZUPEK, J. D., UNWALLA, R., VAJDOS, F. F., WEINBERG, R. A., WOOD, D. C., XING, L., ZAMARATSKI, E., ZAPF, C. W., ZHAO, Y., WILHELMSSON, A., BERSTEIN, G. - **Discovery of 3-Cyano- N-(3-(1-isobutyrylpiperidin-4-yl)-1-methyl-4-(trifluoromethyl)-1 H-pyrrolo[2,3- b]pyridin-5-yl)benzamide: A Potent, Selective, and Orally Bioavailable Retinoic Acid Receptor-Related Orphan Receptor C2 Inverse Agonist.** *J. Med. Chem.*, 61 (2018) 10415–10439.
77. AMAUDRUT, J., ARGIRIADI, M. A., BARTH, M., BREINLINGER, E. C., BRESSAC, D., BROQUA, P., CALDERWOOD, D. J., CHATAR, M., CUSACK, K. P., GAULD, S. B., JACQUET, S., KAMATH, R. V., KORT, M. E., LEPAIS, V., LUCCARINI, J. M, MASSON, P., MONTALBETTI, C., MOUNIER, L., POTIN, D., POUPARDIN, O., ROUAUD, S., SPITZER, L., WALLACE, C. D. - **Discovery of novel quinoline sulphonamide derivatives as potent, selective and orally active ROR γ inverse agonists.** *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, 29 (2019) 1799–1806.
78. PANDYA, V. B., KUMAR, S., SACHCHIDANAND, SHARMA, R., DESAI, R. C. - **Combating Autoimmune Diseases with Retinoic Acid Receptor-Related Orphan Receptor- γ (ROR γ or RORc) Inhibitors: Hits and Misses.** *J. Med. Chem.*, 61 (2018) 10976–10995.
79. ISOJIMA, Y., NAKAJIMA, M., UKAI, H., FUJISHIMA, H., YAMADA, R. G., MASUMOTO, K. H., KIUCHI, R., ISHIDA, M., UKAI-TADENUMA, M., MINAMI, Y., KITO, R., NAKAO, K., KISHIMOTO, W., YOO, S. H., SHIMOMURA, K., TAKAO, T., TAKANO, A., KOJIMA, T., NAGAI, K., SAKAKI, Y., TAKAHASHI, J. S., UEDA, H. R. - **CKI ϵ/δ -dependent phosphorylation is a temperature-insensitive, period-determining process in the mammalian circadian clock.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 106 (2009) 15744–15749.
80. MENG, Q.-J., MAYWOOD, E. S., BECHTOLD, D. A., LU, W.-Q., LI, J., GIBBS, J. E., DUPRE, S. M., CHESHAM, J. E., RAJAMOHAN, F., KNAFELS, J., SNEED, B., ZAWADZKE, L. E., OHREN, J. F., WALTON, K. M., WAGER, T. T., HASTINGS, M. H., LOUDON, A. S. I. - **Entrainment of disrupted circadian behavior through inhibition of casein kinase I (CKI) enzymes.** *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 107 (2010) 15240–15245.
81. MAIER, B., WENDT, S., VANSELOW, J. T., WALLAEH, T., REISCHL, S., OEHMKE, S., SEHLOSSER, A., KRAMER, A. - **A large-scale functional RNAi screen reveals a role for CK2 in the mammalian circadian clock.** *Genes Dev.*, 23 (2009) 708–718.
82. LAMIA, K. A., SACHDEVA, U. M., DITACCHIO, L., WILLIAMS, E. C., ALVAREZ, J. G., EGAN, D. F., VASQUEZ, D. S., JUGUILON, H., PANDA, S., SHAW, R. J., THOMPSON, C. B., EVANS, R. M. - **AMPK Regulates the Circadian Clock by Cryptochrome Phosphorylation and Degradation.** *Science*, 326 (2009) 437–440.
83. BARNEA, M., HAVIV, L., GUTMAN, R., CHAPNIK, N., MADAR, Z., - **Metformin affects the circadian clock and metabolic rhythms in a tissue-specific manner.** *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.*, 1822 (2012) 1796–1806.
84. ROSKOSKI, R. - **Properties of FDA-approved small molecule protein kinase inhibitors.** *Pharmacol. Res.*, 144 (2019) 19–50.
85. ONISHI, Y., KAWANO, Y. - **Rhythmic binding of Topoisomerase α impacts on the transcription of Bmal1 and circadian period.** *Nucleic Acids Res.*, 40 (2012) 9482–9492.
86. KONDOH, D., YAMAMOTO, S., TOMITA, T., MIYAZAKI, K., ITOH, N., YASUMOTO, Y., OIKE, H., DOI, R., OISHI, K. - **Harmine lengthens circadian period of the mammalian molecular clock in the suprachiasmatic nucleus.** *Biol. Pharm. Bull.*, 37 (2014)

- 1422–1427.
87. CHEN, Z., YOO, S. H., TAKAHASHI, J. S. - **Small molecule modifiers of circadian clocks**. *Cell. Mol. Life Sci.*, 70 (2013) 2985–2998.
 88. ASHER, G., GATFIELD, D., STRATMANN, M., REINKE, H., DIBNER, C., KREPPPEL, F., MOSTOSLAVSKY, R., ALT, F. W., SCHIBLER, U. - **SIRT1 Regulates Circadian Clock Gene Expression through PER2 Deacetylation**. *Cell*, 134 (2008) 317–328.
 89. BELLET, M. M., NAKAHATA, Y., BOUDJELAL, M., WATTS, E., MOSSAKOWSKA, D. E., EDWARDS, K. A., CERVANTES, M., ASTARITA, G., LOH, C., ELLIS, J. L., VLASUK, G. P., SASSONE-CORSI, P. - **Pharmacological modulation of circadian rhythms by synthetic activators of the deacetylase SIRT1**. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 110 (2013) 3333–3338.
 90. SCHULTZ, M. B., RINALDI, C., LU, Y., AMORIM, J. A., SINCLAIR, D. A. - **Molecular and Cellular Characterization of SIRT1 Allosteric Activators**. in *Methods in Molecular Biology*, 1983 (2019) 133–149.
 91. SUN, L., WANG, Y., SONG, Y., CHENG, X. R., XIA, S., RAHMAN, M. R. T., SHI, Y., LE, G. **Resveratrol restores the circadian rhythmic disorder of lipid metabolism induced by high-fat diet in mice**. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 458 (2015) 86–91.
 92. MAHMOODZADEH, S., DWORATZEK, E. - **The role of 17 β -estradiol and estrogen receptors in regulation of Ca²⁺ channels and mitochondrial function in Cardio myocytes**. *Front. Endocrinol.*, 10 (2019) 1–15.
 93. NAKAMURA, T. J., SELIX, M. T., MENAKER, M., BLOCK, G. D. - **Estrogen directly modulates circadian rhythms of PER2 expression in the uterus**. *Am. J. Physiol. Metab.*, 295 (2008) 1025–1031.
 94. YANG, L., HU, Z., LUO, J., TANG, C., ZHANG, S., NING, W., DONG, C., HUANG, J., LIU, X., ZHOU, H.-B. - **Dual functional small molecule fluorescent probes for image-guided estrogen receptor-specific targeting coupled potent antiproliferative potency for breast cancer therapy**. *Bioorg. Med. Chem.*, 25 (2017) 3531–3539.
 95. TAMAI, T. K., NAKANE, Y., OTA, W., KOBAYASHI, A., ISHIGURO, M., KADOFUSA, N., IKGAMI, K., YAGITA, K., SHIGEYOSHI, Y., SUDO, M., NISHIWAKI-OHKAWA, T., SATO, A., YOSHIMURA, T. - **Identification of circadian clock modulators from existing drugs**. *EMBO Mol. Med.*, 10 (2018) e8724.
 96. CHEN, L., YANG, G. - **PPARs integrate the mammalian clock and energy metabolism**. *PPAR Res.*, (2014) 1–6.
 97. WANG, N., YANG, G., JIA, Z., ZHANG, H., AOYAGI, T., SOODVILAI, S., SYMONS, J. D., SCHNERMANN, J. B., GONZALEZ, F. J., LITWIN, S. E., YANG, T. - **Vascular PPAR γ Controls Circadian Variation in Blood Pressure and Heart Rate through Bmal1**. *Cell Metab.*, 8 (2008) 482–491.
 98. HONG, F., XU, P., ZHAI, Y. - **The Opportunities and Challenges of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors Ligands in Clinical Drug Discovery and Development**. *Int. J. Mol. Sci.*, 19 (2018) 2189.
 99. MCNAMARA, P., SEO, S., RUDIC, R. D., SEHGAL, A., CHAKRAVARTI, D., FITZGERALD, G. A. - **Regulation of CLOCK and MOP4 by Nuclear Hormone Receptors in the Vasculature**. *Cell*, 105 (2001) 877–889.
 100. LE MAIRE, A., ALVAREZ, S., SHANKARANARAYANAN, P., R DE LERA, A., BOURGUET, W., GRONEMEYER, H. - **Retinoid Receptors and Therapeutic Applications of**

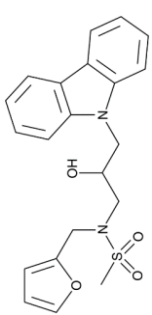
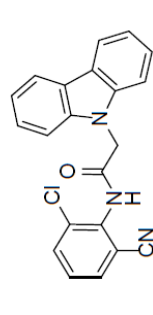
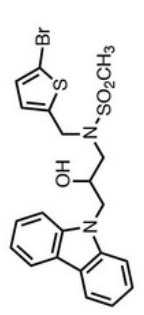
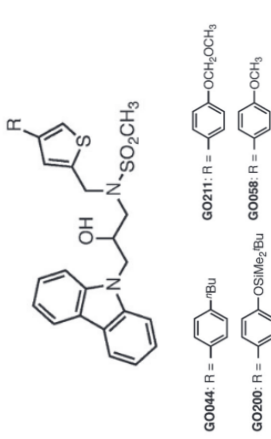
- RAR/RXR Modulators.** *Curr. Top. Med. Chem.*, 12 (2012) 505–527.
101. HE, B., NOHARA, K., PARK, N., PARK, Y. S., GUILLORY, B., ZHAO, Z., GARCIA, J. M., KOIKE, N., LEE, C. C., TAKAHASHI, J. S., YOO, S. H., CHEN, Z. - **The Small Molecule Nobiletin Targets the Molecular Oscillator to Enhance Circadian Rhythms and Protect against Metabolic Syndrome.** *Cell Metab.*, 23 (2016) 610–621.
 102. SUJINO, M., ASAKAWA, T., NAGANO, M., KOINUMA, S., MASUMOTO, K.-H., SHIGEYOSHI, Y. - **CLOCK Δ 19 mutation modifies the manner of synchrony among oscillation neurons in the suprachiasmatic nucleus.** *Sci. Rep.*, 8 (2018) 854.
 103. HUANG, H., LI, L., SHI, W., LIU, H., YANG, J., YUAN, X., WU, L. - **The Multifunctional Effects of Nobiletin and Its Metabolites In Vivo and In Vitro.** *Evidence-Based Complement. Altern. Med.*, 2016 (2016) 1–14.
 104. MULVIHILL, E. E., ASSINI, J. M., LEE, J. K., ALLISTER, E. M., SUTHERLAND, B. G., KOPPEL, J. B., SAWYEZ, C. G., EDWARDS, J. Y., TELFORD, D. E., CHARBONNEAU, A., ST-PIERRE, P., MARETTE, A., HUFF, M. W. - **Nobiletin Attenuates VLDL Overproduction, Dyslipidemia, and Atherosclerosis in Mice With Diet-Induced Insulin Resistance.** *Diabetes*, 60 (2011) 1446–1457.
 105. SHINOZAKI, A., MISAWA, K., IKEDA, Y., HARAGUCHI, A., KAMAGATA, M., TAHARA, Y., SHIBATA, S. - **Potent Effects of Flavonoid Nobiletin on Amplitude, Period, and Phase of the Circadian Clock Rhythm in PER2::LUCIFERASE Mouse Embryonic Fibroblasts.** *PLoS One*, 12 (2017) e0170904.
 106. ZHANG, E. E., LIU, A. C., HIROTA, T., MIRAGLIA, L. J., WELCH, G., PONGSAWAKUL, P. Y., LIU, X., ATWOOD, A., HUSS, J. W., JANES, J., SU, A. I., HOGENESCH, J. B., KAY, S. A. - **A Genome-wide RNAi Screen for Modifiers of the Circadian Clock in Human Cells.** *Cell*, 139 (2009) 199–210.
 107. SON, G. H., CHUNG, S., RAMIREZ, V. D., KIM, K. - **Pharmacological Modulators of Molecular Clock and their Therapeutic Potentials in Circadian Rhythm-Related Diseases.** *Med. Chem.*, 6 (2017) 724–733.
 108. HATORI, M., VOLLMERS, C., ZARRINPAR, A., DITACCHIO, L., BUSHONG, E. A., GILL, S., LEBLANC, M., CHAIX, A., JOENS, M., FITZPATRICK, J. A. J., ELLISMAN, M. H., PANDA, S. - **Time-Restricted Feeding without Reducing Caloric Intake Prevents Metabolic Diseases in Mice Fed a High-Fat Diet.** *Cell Metab.*, 15 (2012) 848–860.
 109. MASRI, S., SASSONE-CORSI, P. - **The emerging link between cancer, metabolism, and circadian rhythms.** *Nat. Med.*, 24 (2018) 1795–1803.
 110. LIN, H.-H., FARKAS, M. E. - **Altered Circadian Rhythms and Breast Cancer: From the Human to the Molecular Level.** *Front. Endocrinol.*, 9 (2018).
 111. ALTMAN, B. J. - **Cancer Clocks Out for Lunch: Disruption of Circadian Rhythm and Metabolic Oscillation in Cancer.** *Front. Cell Dev. Biol.*, 4 (2016).
 112. MAHALINGAM, D., WANG, J. S., HAMILTON, E. P., SARANTOPOULOS, J., NEMUNAITIS, J., WEEMS, G., CARTER, L., HU, X., SCHREEDER, M., WILKINS, H. J. - **Phase I open-label, multicenter study of first-in-class ROR γ agonist LYC-55716 (Cintirorgon): Safety, tolerability, and preliminary evidence of antitumor activity.** *Clin. Cancer Res.*, 25 (2019) 3508–3516.
 113. MAN, K., LOUDON, A., CHAWLA, A. - **Immunity around the clock.** *Science*, 354 (2016) 999–1003.
 114. YAMAGUCHI, Y., SUZUKI, T., MIZORO, Y., KORI, H., OKADA, K., CHEN, Y., FUSTIN, J.-M.,

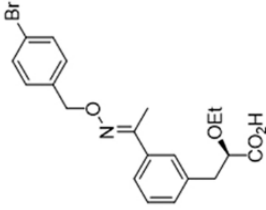
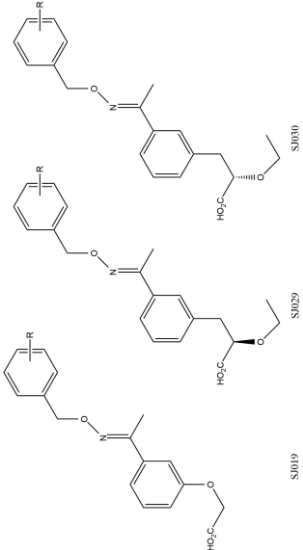
- YAMAZAKI, F., MIZUGUCHI, N., ZHANG, J., DONG, X., TSUJIMOTO, G., OKUNO, Y., DOI, M., OKAMURA, H. - **Mice Genetically Deficient in Vasopressin V1a and V1b Receptors Are Resistant to Jet Lag**. *Science*, 342 (2013) 85–90.
115. XU, Y., PADIATH, Q. S., SHAPIRO, R. E., JONES, C. R., WU, S. C., SAIGOH, N., SAIGOH, K., PTÁČEK, L. J., FU, Y.-H. - **Functional consequences of a CK1δ mutation causing familial advanced sleep phase syndrome**. *Nature*, 434 (2005) 640–644.
116. HUGHES, A. T. L., GUILDING, C., LENNOX, L., SAMUELS, R. E., MCMAHON, D. G., PIGGINS, H. D. - **Live imaging of altered period1 expression in the suprachiasmatic nuclei of *Vipr2*^{-/-} mice I**. *J. Neurochem.*, 106 (2008) 1646–1657.
117. PEVET, P., CHALLET, E. - **Melatonin: Both master clock output and internal time-giver in the circadian clocks network**. *J. Physiol.*, 105 (2011) 170–182.
118. ROYBAL, K., THEOBOLD, D., GRAHAM, A., DI NIERI, J. A., RUSSO, S. J., KRISHNAN, V., CHAKRAVARTY, S., PEEVEY, J., OEHRLEIN, N., BIRNBAUM, S., VITATERNA, M. H., ORSULAK, P., TAKAHASHI, J. S., NESTLER, E. J., CARLEZON, W. A., MCCLUNG, C. A. - **Mania-like behavior induced by disruption of CLOCK**. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 104 (2007) 6406–6411.
119. SCHEIERMANN, C., KUNISAKI, Y., FRENETTE, P. S. - **Circadian control of the immune system**. *Nat. Rev. Immunol.*, 13 (2013) 190–198.
120. MANOOGIAN, E. N. C., PANDA, S. - **Circadian rhythms, time-restricted feeding, and healthy aging**. *Ageing Res. Rev.*, 39 (2017) 59–67.
121. TEVY, M. F., GIEBULTOWICZ, J., PINCUS, Z., MAZZOCOLI, G., VINCIGUERRA, M. - **Aging signaling pathways and circadian clock-dependent metabolic derangements**. *Trends Endocrinol. Metab.*, 24 (2013) 229–237.
122. CIVITARESE, A. E., CARLING, S., HEILBRONN, L. K., HULVER, M. H., UKROPCOVA, B., DEUTSCH, W. A., SMITH, S. R., RAVUSSIN, E. - **Calorie Restriction Increases Muscle Mitochondrial Biogenesis in Healthy Humans**. *PLoS Med.*, 4 (2007) e76.
123. HUBBARD, B. P., SINCLAIR, D. A. - **Small molecule SIRT1 activators for the treatment of aging and age-related diseases**. *Trends Pharmacol. Sci.*, 35 (2014) 146–154.
124. CHEN, Z. - **What's next for chronobiology and drug discovery**. *Expert Opin. Drug Discov.*, 12 (2017) 1–5.
125. NCBI - **Identification of Potent and Selective RORγ Antagonists**. [Acedido a 1 de junho 2019]. Disponível na Internet: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK133441/>
126. TGA - **Scheduling delegates' interim decisions and invitation for further comment: ACCS/ACMS, November 2017**. [Acedido a 20 de julho 2019]. Disponível na Internet: <https://www.tga.gov.au/book-page/13-stenabolic-sr9009>
127. ACT GOVERNEMENT - **Banned substances in sports supplements**. [Acedido a 20 de junho 2019]. Disponível na Internet: https://www.health.act.gov.au/sites/default/files/2018-10/Banned%20substances%20in%20sports%20supplements%20-%20Consumer%20Information%20Sheet%20VI..._pdf
128. WADA - **The World Anti-Doping Code International Standard Prohibited List**. [Acedido a 20 de junho]. Disponível na Internet: https://www.wada-ama.org/sites/default/files/wada_2019_english_prohibited_list.pdf
129. CLINICALTRIALS.GOV - **ClinicalTrials.gov is a database of privately and**

- publicly funded clinical studies conducted around the world.** [Acedido a 8 de agosto 2019]. Disponível na Internet: <https://clinicaltrials.gov/ct2/home>
130. ADISINSIGHT - **Drug Profile - TAK 828** [Acedido a 10 de agosto 2019]. Disponível na Internet: <https://adisinsight.springer.com/drugs/800044929>
131. ADISINSIGHT - **Drug Profile - ABBV 553** [Acedido a 10 de agosto 2019]. Disponível na Internet: <https://adisinsight.springer.com/drugs/800049496>
132. ADISINSIGHT - **Drug Profile - AZD 0284** [Acedido a 10 de agosto 2019]. Disponível na Internet: <https://adisinsight.springer.com/drugs/800048402>
133. SULLI, G., ROMMEL, A., WANG, X., KOLAR, M. J., PUCA, F., SAGHATELIAN, A., PLIKUS, M. V., VERMA, I. M., PANDA, S. - **Pharmacological activation of REV-ERBs is lethal in cancer and oncogene-induced senescence.** *Nature*, 553 (2018) 351–355.
134. CEDERROTH, C. R., ALBRECHT, U., BASS, J., BROWN, S. A., DYHRFJELD-JOHNSEN, J., GACHON, F., GREEN, C. B., HASTINGS, M. H., HELFRICH-FÖRSTER, C., HOGENESCH, J. B., LÉVI, F., LOUDON, A., LUNDKVIST, G. B., MEIJER, J. H., ROSBASH, M., TAKAHASHI, J. S., YOUNG, M., CANLON, B. - **Medicine in the Fourth Dimension.** *Cell Metab.*, 30 (2019) 238–250.
135. GASPAR, L. S., ÁLVARO, A. R., CARMO-SILVA, S., MENDES, A. F., RELÓGIO, A., CAVADAS, C. - **The importance of determining circadian parameters in pharmacological studies.** *Br. J. Pharmacol.*, 176 (2019) 2827–2847.

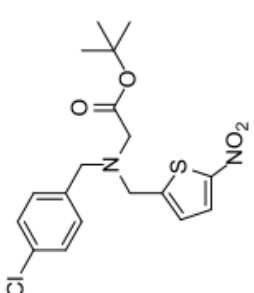
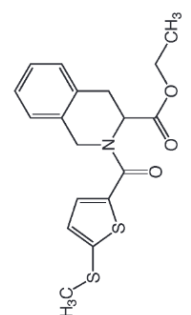
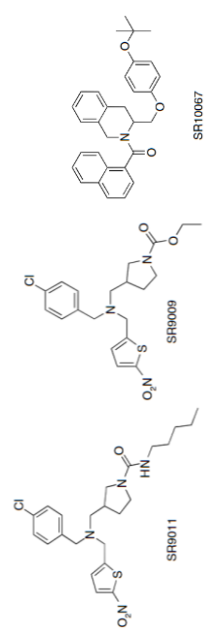
6. Appendix

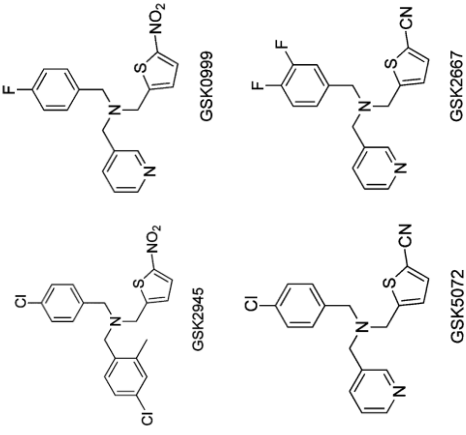
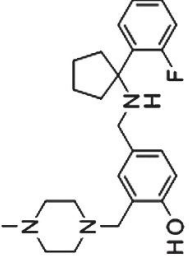
Appendix Table 1 - Small-molecule modulators of the CRY1/2 proteins

Compound	Chemical structure	Circadian effect & phenotype	Cellular effects	Reference
KL001		-Prevents ubiquitin-dependent degradation of CRY -Lengthens the circadian period	-Represses gluconeogenesis in primary mouse hepatocytes glucagon-induced	33 40
KL044		-Prevents CRY degradation (10x more stabilization than KL001) -Represses Per2 activity -Lengthens the circadian period	N.A. Should also repress gluconeogenesis in primary mouse hepatocytes	41
GO214		-Lengthens the circadian period in a similar manner to KL001	N.A.	28
GO044 GO200 GO211		-Shorten period through unknown CRY processes	N.A.	28

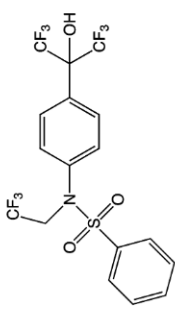
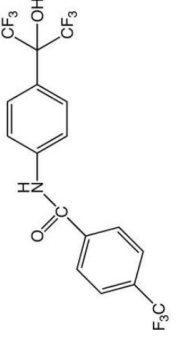
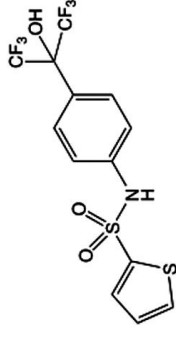
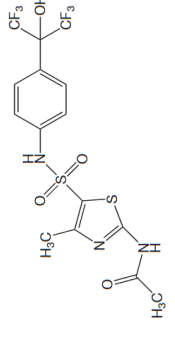
<p>KS15 (compound 15)</p>		<p>-Inhibits the repressive function of CRY1/2 enhancing E-box-mediated transcription -Reduces circadian amplitude -Delays the phase of molecular circadian rhythms</p>	<p>-Increases chemosensitivity in a specific type of human breast cancer and shows anti-proliferative activity</p>	<p>31 39 42</p>
<p>SJ019 SJ029 SJ030</p>		<p>-Increase E-box-mediated transcription -Delay the phase without reduced the robustness of the rhythm (SJ019 and SJ029) -Attenuate the amplitude of the circadian rhythm (SJ029)</p>	<p>N.A.</p>	<p>39</p>

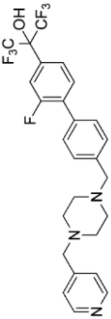
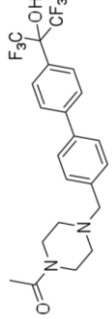
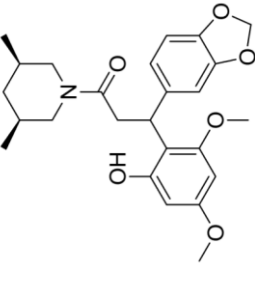
Appendix Table 2 - Small-molecule modulators of the REV-ERBs receptors

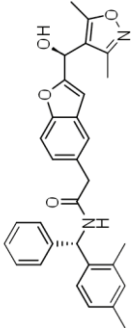
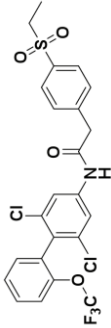
Compound	Chemical structure	Circadian effect & phenotype	Cellular effects	Reference
GSK4112		-REV-ERBs agonist repressing the transcription of the target gene <i>Bmal1</i>	-Inhibits gluconeogenesis in primary mouse hepatocytes -Inhibits IL-6, CXCL11, CXCL6 and CCL2 expression in human macrophages -Increases intracellular calcium signals in alphaTC1-9 cells and mouse primary alpha-cells	35 43
SR8278		-REV-ERBα antagonist -Increases <i>Bmal1</i> , <i>G6PC</i> and <i>PCK</i> gene transcription	-Inhibits glucagon secretion and intracellular calcium signaling in alphaTC1-9 cells and mouse primary alpha-cells -Produces mania-like behaviors and hyper DAergic state in mice	44 45 46
SR9009 SR9011 S10067		-REV-ERBs agonists -Alter the circadian pattern of expression of core clock genes	-Induce wakefulness, suppress sleep and regulate emotional behavior in mice -Increase energy expenditure and decreased fat mass, plasma TG and cholesterol levels in DIO mice -SR9009 improves mitochondrial function and exercise capacity. Decreases the addictive properties of cocaine -SR9009 and SR9011 have selective anticancer activity and are lethal to tumor cells. They inhibit autophagy and de novo lipogenesis promoting apoptotic responses in cancer cells	37 47 48 133

<p>GSK2945 GSK0999 GSK5072 GSK2667</p>		<p>-Selective REVERBα agonists -Suppress Bmal1 expression</p>	<p>-Suppress IL-6 expression from human cells and inflammatory response -GSK2945 demonstrates <i>in vivo</i> bioavailability after iv and oral dosing</p>	<p>50</p>
<p>ARN5187</p>		<p>-Inhibits REVERBβ-mediated transcription</p>	<p>- Inhibits both REVERBβ and autophagy causing cytotoxicity in cancer cells</p>	<p>51</p>

Appendix Table 3 - Small-molecule modulators of the RORs receptors

Compound	Chemical structure	Circadian effect & phenotype	Cellular effects	Reference
T0901317 (TT1317)		-ROR α and ROR γ non-selective agonist	-Inhibits Th17 cell proliferation and IL-17 production -Repress G6Pase in HepG2 cells	54 53
SR1078		-ROR α agonist that stimulates expression of endogenous ROR target genes	-Reduces aerobic glycolysis in hepatoma cells; Reduces the expression of PDK2; Inhibits the phosphorylation of PD and lead pyruvate to complete oxidation -Inhibits hepatoma growth both <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> in a xenograft model -Enhances Autism spectrum disorders(ASD)-Associated genes expression and reduce ASD-like behavior	53 55 56
SR3335		-ROR α selective partial inverse agonist	-Suppresses gluconeogenesis both <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> and lower glucose plasma levels	57
SR1001		-ROR α and ROR γ inverse agonist	-Suppresses TH17 cell differentiation and cytokine expression -Reduces the severity of multiple sclerosis in an animal model of the disease	58

<p style="text-align: center;">SR2211</p>		<p style="text-align: center;">-RORγ inverse agonist</p>	<p style="text-align: center;">-Inhibits TH17 cell differentiation</p> <p style="text-align: center;">-Protects mouse from development of EAE (murine model of Multiple Sclerosis)</p> <p style="text-align: center;">-Suppresses the expression of inflammatory cytokines and reduces joint inflammation in mice</p> <p style="text-align: center;">-Suppresses the expression of androgen receptor (AR) in prostate cancer cell lines and tumors</p>	<p style="text-align: center;">59 60 61</p>
<p style="text-align: center;">SR1555</p>		<p style="text-align: center;">-RORγ inverse agonist</p>	<p style="text-align: center;">-Inhibits TH17 cell differentiation</p> <p style="text-align: center;">-Increases the frequency of inducible T Regulatory cells</p> <p style="text-align: center;">-Reduces food intake, fat mass, and improved insulin sensitivity in obese diabetic mice.</p> <p style="text-align: center;">Also induces expression of the thermogenic gene program in fat depots and inhibits activation of the hormone-sensitive lipase and increases fatty acid oxidation.</p>	<p style="text-align: center;">62 63</p>
<p style="text-align: center;">ML209</p>		<p style="text-align: center;">-RORγ inverse agonist</p>	<p style="text-align: center;">-Selectively inhibits TH17 cell differentiation</p>	<p style="text-align: center;">125</p>

<p>TMP778</p>		<p>-RORγt-specific inhibitor</p>	<p>-Suppresses T helper 17 cell responses and decreases severity of EAE -Blocks imiquimod-induced cutaneous inflammation and expression of Th17-genes in cells from psoriatic patients -Blocks IL-23–induced IL-17A expression</p>	<p>73 72</p>
<p>GSK805</p>		<p>-RORγt-specific inhibitor</p>	<p>-Suppresses T helper 17 cell responses and decreases severity of EAE -Ameliorates intestinal inflammation in mouse models and shows reduced frequencies of TH17 cells and IL-17 producing -In intestinal samples of individuals with inflammatory bowel disease (IBD) does not affect group 3 innate lymphoid cells (ILC3s) which provide both immunity and tissue protection</p>	<p>73 74</p>

Appendix Table 4 - RORyt / RORc inhibitors tested in clinical trials (ClinicalTrials.gov)

Sponsor	Compound	Condition or disease	Study (Phase / n° of participants)	Objective <i>adapted from ClinicalTrials.gov</i>	NCT number ¹²⁹
Vitae Pharmaceuticals	VTP-43742 (AGN-242428/ Vimirogant)	Psoriasis	-Phase I -40 healthy subjects and 34 psoriatic participants	-Evaluate the safety, tolerability, pharmacokinetics, and pharmacodynamics effects of oral VTP-43742	NCT03724292
			-Phase I / Phase II -48 healthy subjects and 60 psoriatic patients		NCT02555709
Allergan		Dry Eye Syndrome	-Phase I / Phase II -72 participants	-Evaluate the safety, tolerability, pharmacokinetics, and exploratory efficacy of AGN-242428 and AGN-231868 ophthalmic solutions in participants with dry eye disease	NCT04030962
GlaxoSmithKline	GSK2981278	Psoriasis	-Phase I -15 participants	-Evaluate safety and efficacy of topically applied GSK2981278 ointment in a psoriasis plaque test	NCT02548052
			-Phase I / Phase II -8 adult subjects and 18 adult subjects with chronic stable plaque psoriasis		NCT03004846
Arrien Pharmaceuticals	ARN-6039	Multiple Sclerosis	-Phase I -60 participants	-Determine the safety, tolerability and pharmacokinetics of single ascending oral doses of ARN-6039 in healthy adult subjects	NCT023237832
			-Phase I -36 Participants		NCT02706834
Takeda	TAK 828*	Healthy subjects	-Phase I -24 Participants	-Evaluate the safety, tolerability, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of escalating multiple doses of TAK-828 in healthy subjects	NCT02817516
			*Compound study appears to be discontinued due to safety concerns.		

AbbVie	ABBV-553*	Psoriasis	-Phase Y = -12 participants <i>*Compound study appears to be discontinued due to safety concerns.</i>	-Evaluate the pharmacokinetics, safety and tolerability of abbv-553 in healthy volunteers and in subjects with psoriasis -Evaluate the efficacy of ABBV-553 in subjects with psoriasis	NCT03145948
			-Phase I -83 participants	- Investigate the safety, tolerability, food effect, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of single and repeated oral doses of AZD0284	NCT02976831
AstraZeneca	AZD0284	Plaque Psoriasis Vulgaris	-Phase I -6 participants	-Assess the absolute bioavailability of a single oral dose of AZD0284 and the pharmacokinetics of a single intravenous microdose of [¹⁴ C]AZD0284 in healthy subjects.	NCT03029741
			-Phase Ib -9 participants <i>The study is temporarily suspended due to preclinical findings that are currently under evaluation.</i>	-Determine the short-term safety, pharmacodynamic and clinical effect of AZD0284 in patients with psoriasis	NCT03310320
			-Phase I -47 participants	-Investigate the safety, tolerability, pharmacodynamics and pharmacokinetics of JTE-451 administered drug tablets in subjects with active plaque psoriasis	NCT03018509
Akros Pharma Inc.	JTE-451	Plaque Psoriasis	-Phase & -150 participants	Evaluate the efficacy and safety of JTE-451 administered in drug tablets in subjects with moderate to severe plaque psoriasis	NCT03832738

Appendix Table 5 - RORyt / RORc agonist tested in clinical trials (ClinicalTrials.gov)

Sponsor	Compound	Condition or disease	Study <i>(Phase / n° of participants)</i>	Objective <i>adapted from ClinicalTrials.gov</i>	NCT number ¹²⁹
Lycera Corp.	LYC-55716	Cancer (solid tumors)	-Phase I / Phase IIa -105 participants	Evaluate the safety and tolerability of increased repeated doses of LYC-55716 in subjects with locally advanced or metastatic solid tumors.	NCT02929862
		Non-small Cell Lung Cancer	-Phase Ib -18 participants	Assess the safety and tolerability of LYC-55716 given in combination with pembrolizumab to subjects with metastatic NSCLC, and to assess the combination for biologic and clinical activity in NSCLC.	NCT03396497