

# Sobre o papel da melatonina na fisiologia e patologia da pele

Andrzej Slominski,<sup>1</sup> Tobias W. Fischer,<sup>1,2</sup> Michal A. Zmijewski,<sup>1</sup> Jacobo Wortsman,<sup>3</sup>  
Igor Semak,<sup>4</sup> Blazej Zbytek,<sup>1,5</sup> Radomir M. Slominski,<sup>1</sup> e Desmond J. Tobin<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Patologia e Medicina Laboratorial, Centro de Ciências da Saúde, Universidade do Tennessee, Memphis, TN, 38103;

<sup>2</sup>Departamento de Dermatologia e Alergologia, Friedrich-Schiller-University, Jena, Alemanha; <sup>3</sup>Departamento de Medicina, Southern Illinois University, Springfield, IL; <sup>4</sup>Departamento de Bioquímica, Universidade Estatal da Bielorrússia, Minsk, Bielorrússia;

<sup>5</sup>Departamento de Histologia e Imunologia, Universidade Médica de Gdansk, Gdansk, Polónia; <sup>6</sup>Departamento de Ciências Biomédicas, Universidade de Bradford, Bradford, West Yorkshire BD7 1DP, Inglaterra

**A melatonina foi experimentalmente implicada em funções da pele, como ciclo de crescimento do cabelo, pigmentação da pele e controle do melanoma, e os receptores de melatonina são expressos em várias células da pele, incluindo queratinócitos normais e malignos, melanócitos e fibroblastos. A melatonina também é capaz de suprimir os danos induzidos pelos raios ultravioleta (UV) nas células da pele e mostra forte atividade antioxidante nas células expostas aos raios UV. Além disso, descobrimos recentemente a expressão na pele da maquinaria bioquímica envolvida na transformação sequencial de *5*-triptofano em serotonina e melatonina. A existência da via biossintética foi confirmada pela detecção dos genes e proteínas correspondentes com demonstração real de atividades enzimáticas para triptofano hidroxilase, serotonina *N*-acetil-transferase e hidroxindol-*5*-metiltransferase em extratos de pele e células da pele. A evidência inicial da síntese *in vivo* da melatonina e do seu metabolismo foi obtida em cultura de órgãos de pele de hamster e em uma linhagem de melanoma. Portanto, propomos que a melatonina (sintetizada localmente ou administrada topicamente) poderia neutralizar ou tamponar estresses externos (ambientais) ou internos para preservar a integridade biológica do órgão e manter sua homeostase. Além disso, a melatonina poderia ter um papel na proteção contra a radiação solar ou mesmo no tratamento de doenças de pele.**

**Palavras-chave:** Pele; melatonina; serotonina; *N*-acetilserotonina; radiação ultravioleta.

## Introdução

A localização estratégica da pele como barreira entre o ambiente e o meio interno torna-a extremamente importante para a preservação da homeostase corporal. Por estar constantemente sujeito às ações dos raios solares, térmicos e mecânicos

energia física e agentes químicos e biológicos, a pele desenvolveu propriedades únicas para lidar com esses estressores (1-4). Assim, a pele é dotada de capacidades regionais, locais e focais para reconhecer, discriminar e integrar sinais específicos dentro de um ambiente altamente heterogêneo. (2-4), e integrá-los em um sistema neuroendócrino de resposta ao estresse (2,5-7).

Um mediador neuroendócrino conhecido é a melatonina [molécula descoberta por Lerner (8,9)], com bioatividades pleiotrópicas, como ações hormonais, neurotransmissoras, imunomoduladoras e modificadoras biológicas, que são mediadas por interações com receptores nucleares ou ligados à membrana de alta afinidade. (10-14). Além disso, a própria melatonina pode funcionar como um eliminador de radicais livres e antioxidante de amplo espectro, ou como ativador de vias protetoras contra o estresse oxidativo ou modulador metabólico. (15-17). Assim, a melatonina exibe uma série de propriedades que podem ser extremamente úteis para o sistema de resposta ao estresse da pele (5).

As conexões da melatonina com a pele são bem reconhecidas desde a identificação inicial de suas ações produzindo clareamento da pigmentação da pele em rãs (9,18). Foi experimentalmente implicado no ciclo de crescimento do cabelo, na pigmentação da pele e no controle do crescimento do melanoma. (5,19-22). Como os receptores de melatonina são expressos nas células da pele, estes têm o potencial de mediar ações fenotípicas na proliferação e diferenciação celular. Além disso, a sua atividade química sugere que a melatonina também poderia ter um papel protetor contra a patologia induzida por UV. Ambas as vias biossintéticas e biodegradáveis da melatonina foram inicialmente caracterizadas em pele humana inteira e de roedores e nas principais populações celulares cutâneas. (5). Portanto, propusemos que a expressão de um sistema melatoninérgico cutâneo serviria para neutralizar ou amortecer estresses externos (ambientais) ou internos para preservar a integridade biológica do órgão e manter sua homeostase.

## Caminho Cutâneo para Síntese de Melatonina

Usando técnicas moleculares, bioquímicas e químicas, descobrimos a plena expressão na pele da maquinaria bioquímica envolvida na transformação sequencial de *5*-triptofano em serotonina e melatonina (Fig. 1) (5).

Recebido em 13 de junho de 2005; Aceito em 13 de junho de 2005.

Autor a quem todas as solicitações de correspondência e reimpressão devem ser endereçadas: Andrzej Slominski MD, PhD, Departamento de Patologia e Medicina Laboratorial, Suite 599, Centro de Ciências da Saúde da Universidade do Tennessee, 930 Madison Avenue, Memphis, TN 38163. E-mail: aslominski@utm.edu

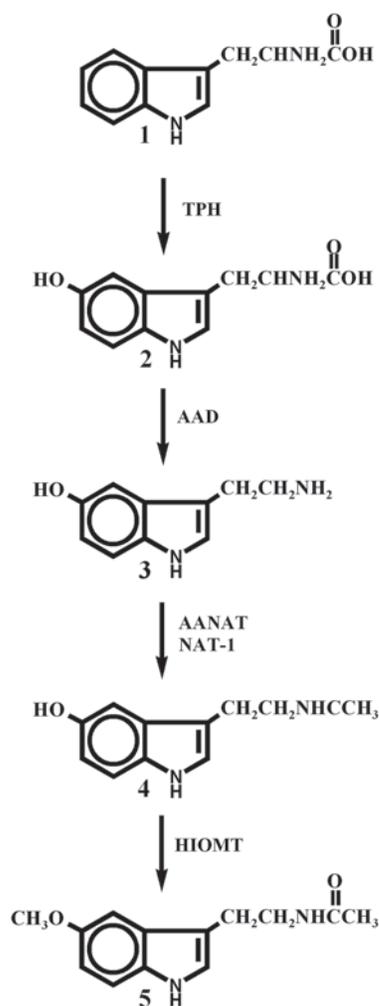


Figura 1. Via proposta para a síntese de melatonina na pele. 1, triptofano; 2, 5-hidroxitriptofano; 3, serotonina (5-hidroxitriptamina); 4, N-acetilserotonina (N-acetil-5-hidroxitriptamina); 5, melatonina.

Isto incluiu a detecção dos genes e proteínas da triptofano hidroxilase (TPH), serotonina N-acetil-transferase (NAS) e hidroxindol-O-metiltransferase (HIOMT) em toda a pele e células da pele, e demonstração real das atividades enzimáticas correspondentes (23–28).

A pele também expressa equivalentes epidérmicos de outro sistema baseado em bioaminas, os sistemas catecolaminérgicos. 29, 30). Isso também inclui uma 6-tetrahidrobiopterina (6BH4) sistema gerador (30,31), que atua como cofator para fenilalanina, tirosina e triptofano hidroxilases. A expressão e atividade da aminoácido aromático descarboxilase (AAD) também foi demonstrada em células da pele humana (29). Assim, os mesmos fatores limitantes da taxa de sua biossíntese são compartilhados pelos sistemas catecolaminérgico e serotoninérgico/melatoninérgico, 6BH4 e AAD, são expressos na pele. Como a produção central de melatonina é regulada positivamente pela ativação de receptores adrenérgicos seguida pela ativação da adenilato ciclase, por analogia, o tecido cutâneo

o sistema melatoninérgico também poderia ser regulado por catecolaminas produzidas localmente. Essas supostas interações bidirecionais entre as vias catecolaminérgicas e melatoninérgicas locais representam um desafio atual na pesquisa em biologia da pele.

Acetilação da serotonina em N-acetilserotonina (NAS), uma etapa limitante na formação de melatonina (32), pode ser catalisado na pele por arilalquilamina N-acetiltransferase (AANAT) e/ou arilamina N-acetiltransferase (NAT), provavelmente NAT-1 (5,25). O NAS pode, de fato, ser produzido na linhagem de camundongos C57BL/6 (25), que representa o “knockdown” natural da AANAT (33), por um caminho alternativo (5,25). NAS produzido na pele pode ser liberado na circulação (5), e poderia ser transformado em melatonina após entrega a órgãos que expressam HIOMT (34). Resta testar se nos camundongos C57BL/6 os órgãos produtores de HIOMT também têm a capacidade enzimática de produzir NAS, semelhante à pele.

Dados experimentais em cultura de órgãos de pele de hamster (35) e em células de melanoma cultivadas (28) indicam que a melatonina pode ser sintetizada *in vivo* nas células da pele. No couro cabeludo humano, a imunorreatividade da melatonina foi localizada em diferentes compartimentos celulares usando imunocitoquímica (5).

#### Caminhos cutâneos para degradação da melatonina

Os metabólitos da melatonina 5-metoxitriptamina (5MTT) e 5-metoxitriptofol (5MTOL) foram detectados em cultura de pele e células da pele de mamíferos (23,28,35) indicando semelhança nas vias degradativas com o metabolismo da melatonina na pele e retina de rã (36,37), incluindo a expressão da atividade da monoaminoxidase (MAO) na pele de mamíferos (5,26). Evidências experimentais recentes indicam que a degradação cutânea da melatonina também pode incluir vias conhecidas por operarem no fígado e nos rins (Fisher et al., manuscrito em preparação). Com base no exposto, juntamente com o mecanismo conhecido de degradação ou transformação da melatonina em órgãos periféricos, propomos que na pele a melatonina pode ser metabolizada através de vias metabólicas alternativas (Fig. 2). As atividades da via e a natureza do produto final estariam ligadas à distribuição espacial da melatonina na pele, ao tipo específico de célula e ao compartimento subcelular.

#### Expressão de receptores de melatonina na pele

##### Receptores de melatonina ligados à membrana

Os efeitos fenotípicos da melatonina podem ser mediados através da interação com os receptores MT1 (MTNRa) e MT2 (MTNRb) ligados à membrana acoplados à proteína G (11) ou com receptores nucleares da subfamília RZR/ROR de receptores órfãos (14,38,39). A quinona redutase II (NQO2) também foi proposta como um receptor de melatonina tipo 3 (MT3) (40,41); entretanto, uma explicação alternativa poderia ser a função como cofator ou regulador da enzima NQO2. Express-

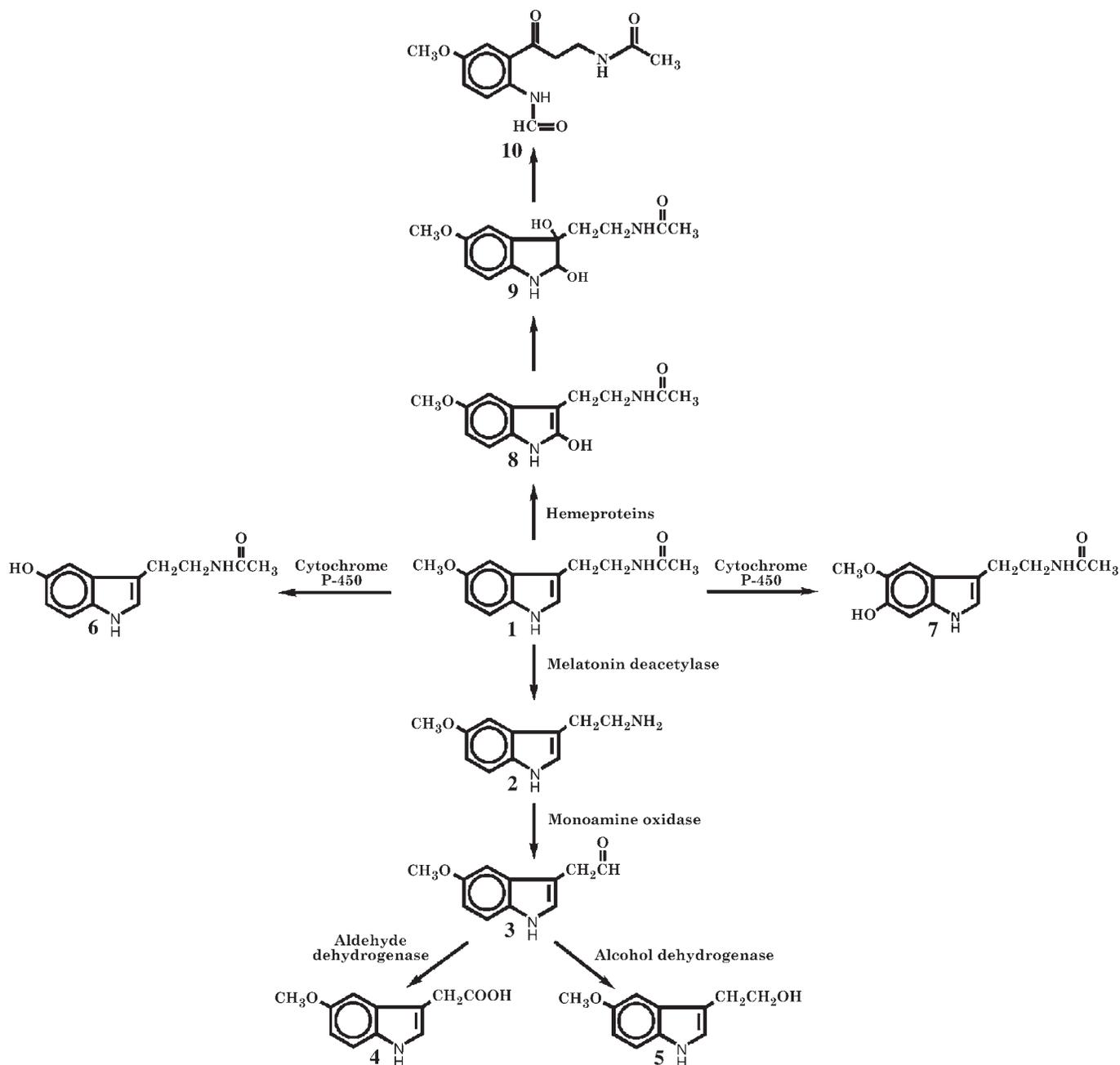


Figura 2. Modelo proposto de metabolismo da melatonina na pele. 1, melatonina; 2, 5-metoxitriptamina; 3, 5-metoxiindoleacetaldeído; 4, ácido 5-metoxiindol acético; 5, 5-metoxitriptofol; 6, N-acetilserotonina; 7, 6-hidroximelatonina; 8, 2,3-dihidroximelatonina; 9, 2,3-dihidroximelatonina; 10, N1-acetil-N2-formil-5-metoxiquinuramina.

A presença de receptores MT na superfície celular ligados à membrana na pele é variável, dependendo da espécie. Por exemplo, a pele do camundongo C57BL/6 expressa predominantemente ou exclusivamente MT2 (19), enquanto a pele humana expressa ambos os receptores, embora com uma tendência para MT1 (a forma predominante encontrada tanto na pele inteira quanto nas células cultivadas) (42). Estudos imunocitoquímicos na pele humana mostraram expressão dependente do tipo de célula e do compartimento das proteínas MT1 e MT2 (Tabela 1) (5). Este padrão sugere que a seleção

A atividade da ação da melatonina poderia ser alcançada pela compartimentalização espacial e especificidade das vias de transdução de sinal.

Descobriu-se que a expressão dos genes MT1 e MT2 foi modificada por fatores ambientais e definida por antecedentes genéticos (Fig. 3). Por exemplo, a exposição a UVB (100 mJ/cm<sup>2</sup>) induziu a expressão de MT1 em melanócitos epidérmicos neonatais normais, mas regulou negativamente a expressão de MT1 em duas linhas de melanoma (Fig. 1A, C). A expressão de MT1 foi

tabela 1  
Localização das imunorreatividades MT1 e MT2 no couro cabeludo humano (5)

	MT1	MT2
Epiderme	++ (Estrato Granuloso) + (estrato espinhoso)	-
Folículo capilar	+ (bainha radicular externa superior) + (bainha radicular interna)	+ (bainha radicular interna)
Glândulas écrinas	+++	+++
Veias de sangue	+++ (Endotélio)	++ (Endotélio)

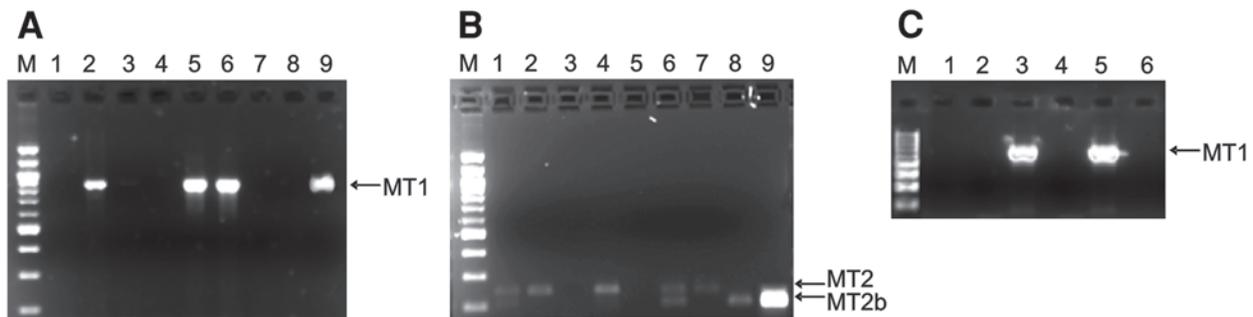


Figura 3. Expressão de genes para receptores de melatonina ligados à membrana em células da pele humana. (A) RT-PCR aninhado para receptor MT1. (B) RT-PCR aninhado para receptor MT2; Escada de DNA de 100 kbp (M), melanócitos neonatais (1), melanócitos neonatais após tratamento com UVB (2), queratinócitos imortalizados (HaCaT) (3), queratinócitos imortalizados (HaCaT) após tratamento com UVB (4), queratinócitos epidérmicos adultos (5), queratinócitos epidérmicos adultos após tratamento com UVB (6), fibroblastos dérmicos adultos (7), fibroblastos dérmicos adultos após tratamento com UVB (8), melanócitos imortalizados (PIG-1) (9). (C) RT-PCR aninhado para receptor MT1 em células de melanoma; Escada de DNA de 100 kbp (M), SKMEL188 (1), SKMEL188 após tratamento com UVB (2), WM164 (3), WM164 após tratamento com UVB (4), WM98 (5), WM98 após tratamento com UV (6). Sequências de primers e condições para nested RT-PCR foram como descritas (23).

também dependente do doador, por exemplo, em amostras recentemente obtidas de fibroblastos dérmicos estava abaixo dos limites de detectabilidade para a sequência de iniciadores utilizados (Fig. 1A, pistas 3 e 4). A análise da expressão do gene MT2 mostrou que este é induzido / regulado positivamente ou modificado por UVB em queratinócitos epidérmicos normais adultos ou imortalizados (HaCaT), em melanócitos epidérmicos normais ou em fibroblastos dérmicos (Fig. 3C). De grande interesse é a expressão induzida por UVB da isoforma MT2b, previamente clonada por nós (42). Isto foi detectado em melanócitos neonatais, queratinócitos normais e fibroblastos dérmicos (Fig. 3B, pistas 2, 4, 6 e 8) indicando que o UVB modifica o splicing alternativo do gene MT2, e consistente com a mudança induzida por UVB de MT2 para expressão do gene MT2b em fibroblastos dérmicos. Como já descrevemos anteriormente a regulação ambiental do splicing alternativo, no gene do receptor de superfície celular acoplado à proteína G (CRH-R1), analisamos detalhadamente a sequência de DNA da isoforma MT2b (Fig. 4). Assim, o splicing alternativo do gene MT2 gerando isoformas MT2b resulta numa sequência de ADN contendo duas grelhas de leitura abertas (orf) que codificam as proteínas putativas MT2b1 e MT2b2 (Fig. 4). Se traduzido, MT2b1 geraria uma proteína truncada de 79 aa contendo N-terminal e a primeira sequência transmembrana seguida por 8 aa de MT2 com a sequência c-termina adionada

devido à mudança de quadro e adição de um códon de parada (Fig. 4). A suposta proteína MT2b2 tem 247 aa, sem os domínios TM 1-3 do MT2. Começa com omrcifppqplpfpf sequência seguida consecutivamente pelo domínio transmembrana previsto (TMX) e pela sequência MT2. Assim, o MT2b possui apenas cinco domínios TM (TMX e TM4 - TM7 do MT2). O significado biológico destes supostos produtos proteicos de splicing alternativo do gene MT2 será testado, seguindo um protocolo semelhante ao descrito para as isoformas CRH-R1 (43,44).

#### Receptores Nucleares de Melatonina

O receptor nuclear ROR- (receptor órfão relacionado a retinóides -) é um membro da subfamília RZR/ROR que contém pelo menos quatro variantes de splicing: ROR-1, ROR-2, ROR-3, RZR- (ROR-4) (38,39,45). Sugerimos renomear a última isoforma RZR- para ROR-4 por uma questão de consistência, embora sua sequência tenha sido descrita de forma independente (46). A sequência dessa quarta isoforma do ROR- foi depositada no Genebank (NM\_134262), observando que ela possui apenas substituição de um único nucleotídeo quando comparada ao RZR-. Usamos um conjunto único de primers desenvolvidos por terceiros para testar a expressão do fragmento comum de ROR-mRNA

(47) e então identificar cada isoforma (45). Todos os testados

```

                                     #####TM1#####
MT2      MSENSGFANCCEAGGWAVRPGWSGAGSARPSRTPRPPWVAPALSAVLIVTTAVDVGNNL
60
MT2B1    MSENSGFANCCEAGGWAVRPGWSGAGSARPSRTPRPPWVAPALSAVLIVTTAVDVGNNL
60
MT2B2    -----
0
          #####          ↓A          #####TMX#####↓B
MT2      VILSVLRNRKLRNA-----
120
MT2B1    VILSVLRNRKLRNAGEHHS-----
79
MT2B2    -----MRCLFPPQPGLPFPFTLTYSLSLTLH-----
26
          ↓A #####TM2#####          #####
MT2      GNLFVLVSLALADLVVAFYPYPLILVAIFYDGGWALGEEHCKASAFVM
120
MT2B1    -----
79
MT2B2    -----
          #####TM3#####          ↓B
MT2      -----GLSVIGSVFNITAIAINRYCYICHSMAYHRIYR
153
MT2B1    -----
79
MT2B2    -----ICHSMAYHRIYR
38
          #####TM4#####          #####TM5
MT2      RWHTPLHICLIWLLTVVALLPNFFVGSLEYDPRIYSCTFIQTASTQYTAAVVVIHFLLPI
213
MT2B1    -----
79
MT2B2    RWHTPLHICLIWLLTVVALLPNFFVGSLEYDPRIYSCTFIQTASTQYTAAVVVIHFLLPI
98
          #####          #####TM6#####
MT2      AVVSFCYLRIWVVLVQARRKAKPESRLCLKPSDLRSFLTMFVVFVIFAICWAPLNCIGLA
273
MT2B1    -----
79
MT2B2    AVVSFCYLRIWVVLVQARRKAKPESRLCLKPSDLRSFLTMFVVFVIFAICWAPLNCIGLA
158
          ###          #####TM7#####
MT2      VAINPQEMAPQIPEGLFVTSYLLAYFNNSCLNAIVYGLLNQNFREYKRILLALWNPRHCI
333
MT2B1    -----
79
MT2B2    VAINPQEMAPQIPEGLFVTSYLLAYFNNSCLNAIVYGLLNQNFREYKRILLALWNPRHCI
218

MT2      QDASKGSHAEGQLSPAPPIIGVQHQADAL 362
MT2B1    ----- 79
MT2B2    QDASKGSHAEGQLSPAPPIIGVQHQADAL 247

```

Figura 4. Sequência de aminoácidos prevista para duas novas isoformas humanas do receptor MT2 (MTNRb). A sequência de MT2 humano (MTNRb) (acesso do gene #NP\_005950.1) é mostrada em comparação com as sequências previstas de dois quadros de leitura abertos (orf) recém-descobertos detectados após splicing alternativo de mRNA de MT2. O splicing alternativo foi confirmado pelo sequenciamento do fragmento de PCR de 209 pb do cDNA de MT2 (número de acesso do gene #AY114100) (para estrutura do gene cf. ref.23). Tanto o códon de parada para MT2b1 quanto o códon de início para MT2b2 são codificados por sequências geradas após splicing alternativo. Existe um intervalo de 72 pb de comprimento entre o códon de parada para MT2b1 e o códon de início para MT2b2 (não mostrado). A emenda é marcada com uma seta e com A para MT2 ou B para a variante de emenda MT2b. As regiões transmembrana (TM) são marcadas com # e com os números de 1 a 7 listados acima das sequências. TMX é um fragmento transmembrana alternativo para MT2b2. MT2b2 tem apenas cinco hélices TM e não possui hélices TM 1-3, uma porção parcialmente substituída por uma hélice transmembrana única (TMX), causando um deslocamento de dois aminoácidos para o terminal C nas hélices TM 4 (não mostrado).

as células da pele expressaram pelo menos uma das três isoformas ROR; O ROR-3 esteve consistentemente ausente (Tabela 2). Além disso, a expressão gênica foi modificada por UVB, que regulou negativamente a expressão de RZR1 (ROR-4) em queratinócitos HaCaT e

regulou-o positivamente em melanócitos neonatais normais (Tabela 2, Fig. 5). O efeito modificador do UVB na expressão de genes que codificam receptores nucleares de melatonina (Tabela 2) sugere que esses receptores podem estar sujeitos à regulação ambiental

mesa 2

Expressão de genes que codificam receptores RORa/RZR e NQO2 em células da pele humana

Linha celular	Genes ou isoformas											
	ROR-		ROR-1		ROR-2		ROR-3		RZR1 (ROR-4)		NQO2	
	-UVB	+UVB	-UVB	+UVB	-UVB	+UVB	-UVB	+UVB	-UVB	+UVB	-UVB	+UVB
Epiderme adulta queratinócitos	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
HaCaT queratinócitos	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+
Neonatal melanócitos	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
Imortalizado melanócitos (PIG-1)	+	DE	-	DE	+	DE	-	DE	-	DE	+	DE
Dérmica adulta fibroblas	+	+	+	+*	-	+*	-	-	+	+	+	+

\* Possível

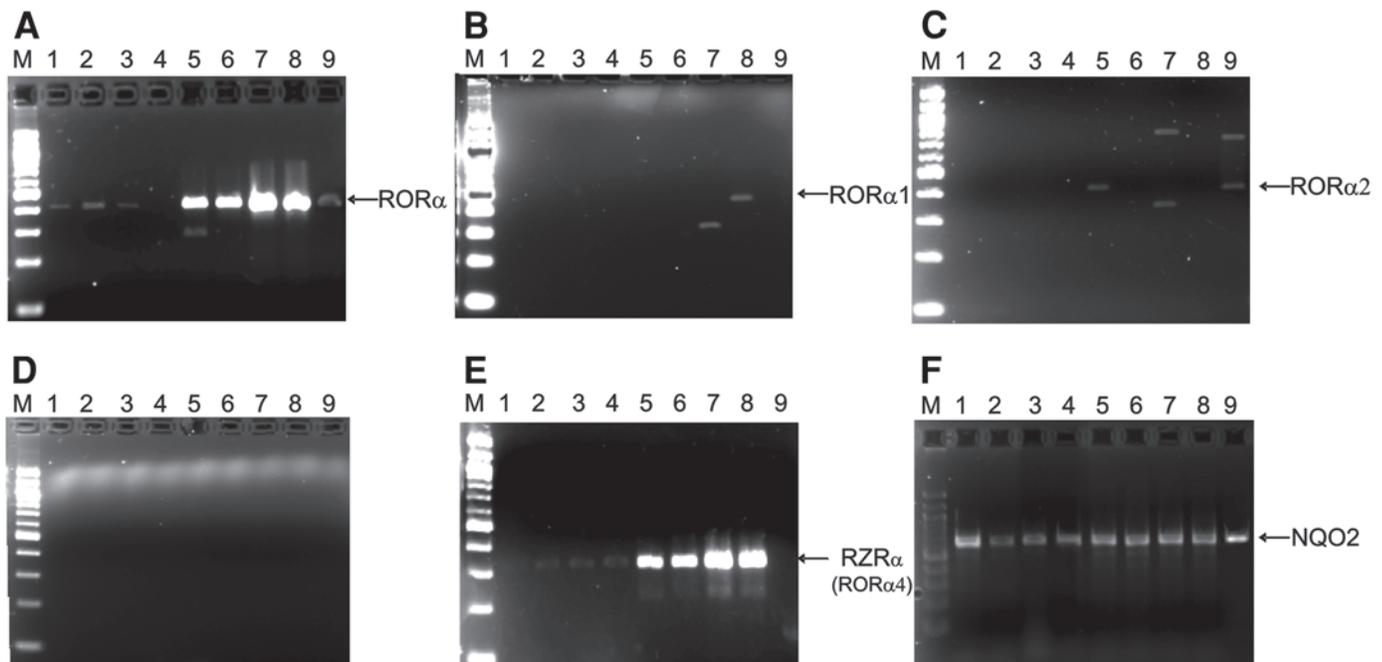


Figura 5. Expressão de genes que codificam receptores nucleares de melatonina e quinona redutase 2 (NQO2) em células da pele. RT-PCR para isoformas de receptores nucleares: receptor ROR- (fragmento comum para todas as isoformas, A), ROR-1 (B), ROR-2 (C), ROR-3 (D), RZR1 (ROR-4) (E), e NQO2 (F). Escada de DNA de 100 kb (M), melanócitos neonatais (1), melanócitos neonatais após tratamento com UVB (2), queratinócitos imortalizados (HaCaT) (3), queratinócitos imortalizados (HaCaT) após tratamento com UVB (4), queratinócitos epidérmicos adultos (5), queratinócitos epidérmicos adultos após tratamento com UVB (6), fibroblastos dérmicos adultos (7), fibroblastos dérmicos adultos após tratamento com UVB (8), melanócitos imortalizados (PIG-1) (9). As condições dos iniciadores de RT-PCR para o fragmento ROR comum e as isoformas ROR-1-4 foram como descritas (fragmento comum, ref.47; isoformas, ref.45). RT-PCR para amplificar NQO2 foi realizado conforme descrito (49). UVB foi utilizado na dose de 100 mJ/cm<sup>2</sup> conforme descrito anteriormente (94).

na Vivo. A expressão de ROR-1 e ROR-2 foi detectada apenas em fibroblastos dérmicos (ambas as isoformas) e na linhagem de melanócitos PIG-1 imortalizada (apenas ROR-2) estando abaixo dos níveis de detectabilidade em melanócitos e queratinócitos epidérmicos normais e em células HaCaT (Tabela 2, Figura 5). É provável que o gene ROR- possua mais variantes de splicing, porque o mRNA para este gene contém 23 exons dentro de uma região genômica que abrange 732.840 pb (de acordo com o NCBI Evidence Viewer Homo sapiens entrada RORA), e para o pos-

explicação possível para os fragmentos de DNA adicionais de comprimento inesperado amplificados com primers ROR-1 e ROR-2 (Fig. 5B, C).

NQO2 é uma flavoproteína que possui um sítio de ligação à melatonina (previamente proposto MT3) (41,48); está envolvido na resistência celular ao estresse oxidativo e na desintoxicação celular (49,50). Assim, a melatonina poderia estar envolvida na regulação da função do NQO2 e, conseqüentemente, na sua atividade antioxidante. Teste molecular para o gene NQO2,

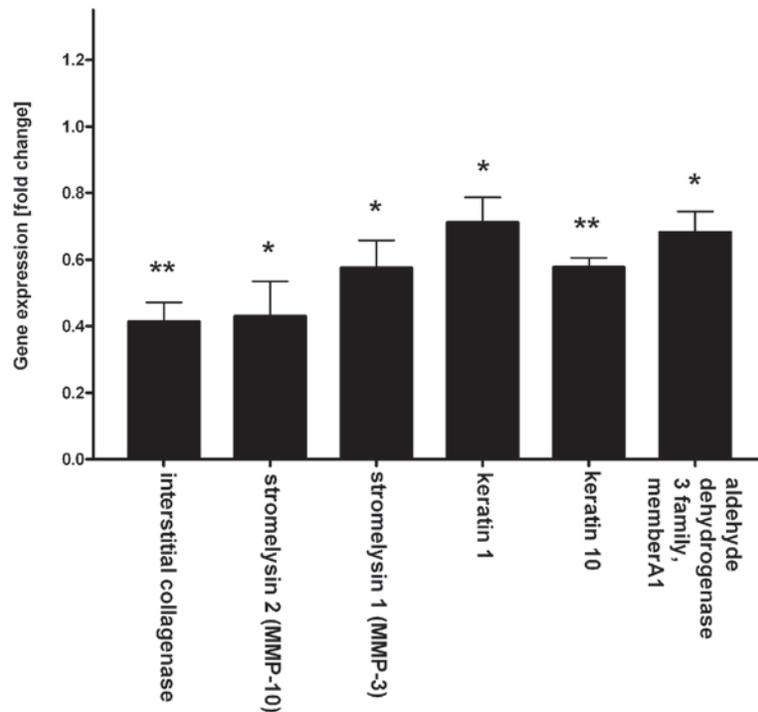


Figura 6. Efeito de UVB (35 mJ/cm<sup>2</sup>) em queratinócitos HaCaT com ou sem adição prévia de 10<sup>-6</sup>M melatonina por 30 min e coletada 20 h após a irradiação. O RNA foi extraído, o cDNA produzido e a análise de microarray realizada conforme descrito (73). As diferenças entre o controle (células irradiadas com UVB) e as células irradiadas com UVB e tratadas com melatonina são apresentadas como média das respectivas proporções (a proporção 1 representa nenhuma diferença) ± SEM, seguida de análise com Student's t-teste (n = 4, \*p < 0,05, \*\*p < 0,005).

usando primers e condições descritas na literatura (49), revelou que a expressão deste gene nas células da pele é onipresente (Tabela 2, Fig. 6).

### Efeitos fenotípicos da melatonina

Os principais compartimentos da epiderme, derme e anexos da pele são alvos para a regulação da melatonina (5). Mais especificamente, a melatonina tem sido implicada no ciclo de crescimento do cabelo (20), pigmentação cutânea (3), e fisiologia e patologia da pele (5). Como essas ações foram discutidas em revisões recentes, a descrição abaixo focará em áreas não discutidas detalhadamente nesses documentos.

O campo do crescimento do cabelo tem sido objecto de investigação intensiva na Austrália e na Nova Zelândia, países com uma indústria de lã próspera, onde testes em animais produtores de peles revelaram que a melatonina estimula significativamente o crescimento do cabelo. Assim, os animais alimentados com uma dieta suplementada com melatonina apresentaram uma taxa aumentada de crescimento de pelos na primavera, período de mudança da pelagem de inverno para a pelagem de verão (51). Os resultados foram confirmados independentemente em outros modelos experimentais (52,53). O crescimento do pelo pode ser mediado por sítios/receptores de ligação de melatonina, porque estes foram identificados na pele de roedores (19,54,55). Estudos com um modelo de cultura de órgão capilar humano mostraram que a melatonina teve efeitos bimodais no alongamento da haste capilar, consistindo em estimulação (a 30 µM) e inibição (na faixa milimolar) (56). Um estudo clínico em mulheres que sofrem de problemas androgenéticos ou

alopecia difusa forneceu evidências de um efeito positivo da melatonina no crescimento do cabelo humano (57), sugerindo que a melatonina poderia ser um alvo potencial para a regulação do crescimento capilar em humanos (58).

A melatonina também pode reduzir a deposição de colágeno observada na pele de ratos após pinealectomia (59,60), sugerindo que esse acúmulo também poderia ser modulado pelo fornecimento local de melatonina. Evidências adicionais do papel da melatonina no metabolismo da derme são indicadas por uma diminuição no conteúdo de glicosaminoglicanos observada após o pré-tratamento com melatonina em ratos expostos ao estresse agudo (61). Na verdade, o tratamento com melatonina aumentou os níveis de ácido urônico e hexosaminas e afetou moderadamente a renovação do colágeno em animais estressados. A melatonina também pode modular a proliferação de monócitos e fibroblastos e alterar os níveis de citocinas, sugerindo um efeito na angiogênese. Na verdade, dados recentes obtidos em ratos sugerem que a melatonina pode melhorar tanto a angiogênese como a cicatrização de feridas (62).

Além disso, os receptores para a melatonina são expressos em queratinócitos, melanócitos e fibroblastos, e estes medeiam muitas das suas ações fenotípicas (42).

### Melatonina como protetor contra danos à pele

Devido às suas amplas propriedades antioxidantes e eliminadoras de radicais (16), a melatonina pode atuar como um agente protetor contra danos na pele induzidos pela radiação UV (UVR) (revisado nas refs. 5e63). Estudos clínicos indicaram que

a melatonina é capaz de prevenir os danos causados pelo sol somente quando administrada antes da UVR e está presente em concentrações relevantes diretamente no local da irradiação.64-67). Estas observações têm forte apoio experimental de estudos in vitro. Assim, a melatonina aumenta a viabilidade celular em fibroblastos irradiados por UV, neutralizando a formação de níveis de poliamina (68), e o acúmulo de malondialdeído enquanto diminui a apoptose das células (69). A melatonina também demonstrou proteger contra danos induzidos pela luz UV em leucócitos humanos. Neste modelo celular, a melatonina suprime significativamente a formação de espécies reativas de oxigênio, levando consecutivamente a um aumento da taxa de sobrevivência celular quando aplicada às células antes da irradiação UV.70,71). Na verdade, a melatonina exibiu propriedades de eliminação de radicais mais fortes do que a vitamina C e o Trolox (72). Nos queratinócitos epidérmicos humanos, a melatonina revelou um forte efeito protetor contra a redução da viabilidade celular induzida por UV, mas apenas em doses elevadas (10-3M). Descobriu-se que este efeito é independente do receptor e foi investigado posteriormente em ensaios de formação de colônias, que mostraram números mais elevados de colônias 14 dias pós-UVR quando submetidos a tratamento pré e pós-UV com melatonina - em comparação com placas de colônias não tratadas com melatonina. Nesse cenário, as propriedades antiapoptóticas da melatonina também foram confirmadas (95). As interações entre as vias intracelulares estimuladas por UVB e pela melatonina podem ser complexas porque, usando análise de microarranjos, descobrimos que a melatonina atenua a expressão de vários genes conhecidos por serem estimulados por UVB (73) (Fig. 6).

Dados os efeitos antioxidantes da melatonina, ela poderia ter um papel na biologia da pele (58,63), onde sua meia-vida plasmática curta e baixo peso molecular sugerem que poderia ser útil como constituinte de cremes protetores solares. A este respeito, a fotoestabilidade da melatonina tem sido um fator limitante, embora a análise por cromatografia líquida e espectrometria de massa tenha mostrado que os metabólitos da melatonina 6-hidroximelatonina e N1-acetil-N2-formil-5-metoxiquinurenamina pode reter atividade antioxidante significativa (74). Além disso, a melatonina não parece ser um sensibilizador da pele (75).

Os efeitos radioprotetores da melatonina podem incluir danos à pele induzidos por raios X, recentemente encontrados em um modelo de rato albino.76), onde o pré-tratamento com melatonina protegeu contra alterações celulares degenerativas. Outros estudos também demonstraram que a administração de melatonina pode reverter a lesão oxidativa em outros tecidos e órgãos, conforme avaliado por técnicas bioquímicas e histopatológicas. Assim, a melatonina pode ser útil como suplemento limitador de danos em pacientes submetidos à radioterapia.77,78). Os mecanismos de ação podem incluir a inibição da peroxidação lipídica, demonstrada em fibroblastos humanos.79), propriedades diretas de eliminação de radicais e estimulação de enzimas antioxidantes em fibroblastos da pele humana (80) e outros sistemas orgânicos (16,17).

Foi relatado que a administração intraperitoneal de melatonina em níveis fisiológicos em ratos pinealectomizados submetidos a cirurgia de pele pode reduzir o malondialdeído e

os níveis de óxido nítrico na pele, enquanto a glutatona, a glutatona-peroxidase e a superóxido dismutase estão aumentadas, em comparação com animais pinealectomizados não tratados (81). O efeito do tratamento com melatonina no dano oxidante causado por lesões térmicas e queimaduras foi examinado em ratos (82). O tratamento de animais com melatonina resultou em aumento significativo dos níveis de glutatona pós-lesão e diminuição significativa da peroxidação lipídica nos homogenatos de pele. No entanto, a aplicação de melatonina em feridas cutâneas incisionais de espessura total em ratos Wistar-Albinos com 20% de queimaduras superficiais não conseguiu modificar os níveis de glutatona peroxidase, embora as atividades de superóxido dismutase e catalase estivessem elevadas em comparação ao grupo controle (83).

Finalmente, antioxidantes como a melatonina são importantes para a defesa contra o estresse oxidativo e, conseqüentemente, podem prevenir a carcinogênese (84). A melatonina é um forte eliminador de radicais, dirigido especialmente contra os radicais hidroxila, que são considerados os efetores mais prejudiciais produzidos durante a UVR.5,63). Portanto, a melatonina pode prevenir o desenvolvimento do câncer de pele, agindo nos níveis molecular, celular e clínico através de sua eliminação de radicais e proteção direta do DNA.21,84). De fato, foi demonstrado que a melatonina suprime não apenas os estágios iniciais, mas também os de promoção da carcinogênese cutânea.85).

#### Melatonina como medicamento aplicado topicamente em Dermatologia

Nesse contexto, as propriedades farmacodinâmicas da melatonina foram estudadas em humanos. A aplicação tópica de 20 mg e 100 mg de melatonina dissolvida em etanol a 70% levou a um aumento na primeira hora após a aplicação, que foi dependente da dose e durou mais de 8 horas. Assim, parece que a melatonina pode construir um depósito no estrato córneo, a partir do qual é continuamente liberada na derme e nos vasos sanguíneos.65,86). A melatonina em preparações de creme constrói um depósito ainda mais forte no estrato córneo, mas com menor liberação no sangue durante o período de observação de 24 horas, em comparação com a melatonina em solução alcoólica (87). Assim, a pele pode ser um órgão ideal não apenas para o tratamento de vias locais com aplicação tópica de melatonina, mas também para a possibilidade de administração transdérmica para criar níveis plasmáticos estáveis para tratamento sistêmico com melatonina através da liberação constante do estrato córneo.58,88).

#### Propriedades oncostáticas da melatonina no câncer de pele

Também foi relatado que a melatonina exibe propriedades tumorostáticas em diferentes modelos de tumores que incluem melanomas e tumores de origem epitelial.22,89). Por exemplo, no cancro da mama a melatonina parece ser útil como adjuvante na terapia desta doença maligna. Também realizamos testes iniciais de melatonina na linhagem de carcinoma espinocelular C1-4 de origem cervical e encontramos inibição da viabilidade celular pelo aumento das concentrações (Fig. 7), representando

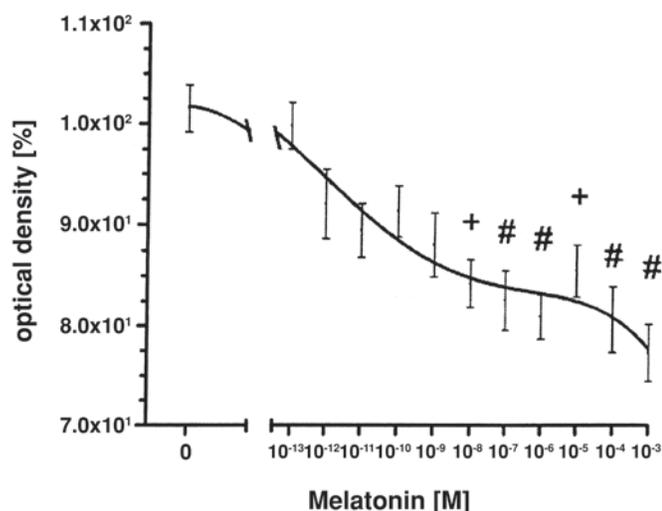


Figura 7.A melatonina suprime a viabilidade celular em células de carcinoma espinocelular. Células foram incubadas por 24 horas em meio isento de soro na presença de concentrações graduadas de melatonina. A viabilidade celular foi medida pelo teste MTT (23). Os dados são apresentados como médias  $\pm$  SEM ( $n = 16$  combinados de dois experimentos), e a análise estatística foi realizada com ANOVA (+ $p < 0,01$ ; # $p < 0,001$ ).

um modelo adicional para testar as propriedades oncostáticas da melatonina.

Vários estudos clínicos relataram resultados positivos com melatonina em pacientes com melanoma maligno metastático. Em um dos estudos, a melatonina foi utilizada como monoterapia em 40 pacientes, em quatro doses diferentes, de 5 a 700 mg/m<sup>2</sup>/d, com avaliação e acompanhamento em 5 semanas. A resposta parcial ocorreu em seis pacientes e uma doença estável resultou em mais seis pacientes, para uma taxa de resposta global de 30%. A duração média da resposta nos respondedores parciais foi de 33 semanas. Entre os locais de resposta estavam o sistema nervoso central, tecido subcutâneo e pulmão. A toxicidade foi geralmente baixa e foi encontrada uma relação dose-resposta (90). Em outros estudos, a melatonina foi aplicada em combinação com interleucina-2 (IL-2), porque a melatonina aumenta a estimulação modulada por IL-2 do sistema imunológico contra a progressão tumoral. Isso foi testado em 14 pacientes com melanoma metastático intratável usando melatonina como medicamento complementar à IL-2 e combinada com naltrexon; a terapia aumentou significativamente o número de linfócitos Th1 e suprimiu Th2, que representam os critérios prognósticos favoráveis mais importantes na imunoterapia anticâncer mediada por IL-2 (91,92). Além deste efeito supressor de tumor cooperativo com a IL-2, a melatonina demonstrou suprimir significativamente a toxicidade dos medicamentos quimioterápicos e aumentar a sua citotoxicidade anticancerígena (93). Num estudo clínico com 13 pacientes com melanoma maligno metastático, a melatonina foi utilizada em combinação com cisplatina e IL-2 como terapia de segunda linha após falha da terapia de primeira linha com dacarbazina e interferon alfa. A taxa objetiva de resposta tumoral (CR + PR) foi de 31% com estabilidade

doença ocorrendo em cinco pacientes. A tolerância a esta terapia secundária com melatonina foi boa e especialmente a bem conhecida neurotoxicidade crítica da dacarbazina foi significativamente reduzida (92). Porque os níveis sanguíneos de melatonina são consideravelmente suprimidos em pacientes nos estágios iniciais de desenvolvimento de tumor, o tratamento com melatonina pode ser eficaz em pacientes com câncer em estágios iniciais do tumor (21).

#### Observações inclusivas

A melatonina (produzida localmente ou entregue no interior) pode contribuir significativamente para a regulação do sistema calórico que preserva a integridade física e funcional da pele. Tal sistema, que seria ativado por estressores ambientais ou estímulos dishomeostáticos internos, atuaria neutralizando ou amortecendo quaisquer efeitos prejudiciais. Neste cenário, a melatonina poderia atuar através de mecanismos intra, auto ou parácrinos, para participar na regulação das funções da pele a um nível altamente compartimentado (5). Os efeitos fenotípicos da melatonina seriam então determinados pelo controle de sua local disponibilidade (5). A expressão diferencial relatada do sistema melatoninérgico na pele humana e de animais selvagens pode então estar relacionada ao estressor da espécie predominante (radiação solar em humanos versus ciclo capilar ou estímulos químicos em roedores) (5).

Uma barreira biológica epidérmica eficiente requer um sistema imunológico local eficiente, diferenciação altamente organizada de queratinócitos epidérmicos, ativação de folículos capilares (importante em animais furiosos), ativação da atividade de fibroblastos (constrói e regula a estrutura da derme) e ativação do sistema pigmentar. (importante na comunicação social e proteção contra a radiação solar). Todas essas ações residem claramente no domínio do sistema melatoninérgico cutâneo (5), além do efeito protetor da melatonina contra a radiação solar e possíveis ações antimutagênicas e anticarcinogênicas.

#### Agradecimentos

Este trabalho foi financiado em parte por doações da Fundação Vitoligo, NIH #AR047079, Centro de Genômica e Bioinformática da Universidade do Tennessee para AS; Concessão piloto do Centro de Câncer da Universidade do Tennessee para AS e TWF, "Academia Alemã de Cientistas Naturais Leopoldina" com Ref-No. BMBF-LPD 9901/8-113 para TWF. O apoio generoso da ASATONA AG também é reconhecido.

#### Referências

1. Slominski, A. e Pawelek, J. (1998). Clin. Dermatol. 16, 503-515.
2. Slominski, A. e Wortsman, J. (2000). Endocr. Rev. 21, 457-487.
3. Slominski, A., Tobin, DJ, Shibahara, S. e Wortsman, J. (2004). Fisiol. Rev. 84, 1155-1228.
4. Slominski, A. e Wortsman, J. (2003). Minerva Endocrinol. 28, 135-143.
5. Slominski, A., Wortsman, J. e Tobin, DJ (2005). FASEB J. 19, 176-194.

6. Slominski, A., Wortsman, J., Luger, T., Paus, R. e Solomon, S. (2000). *Fisiol. Rev.* 80,979–1020.
7. Slominski, A., Wortsman, J., Pisarchik, A., et al. (2001). *FASEB J.* 15,1678–1693.
8. Lerner, AB, Case, JD e Takahashi, Y. (1960). *J. Biol. Química.* 235,1992–1997.
9. Lerner, AB, Case, J. e Takahashi, Y. (1958). *Geléia. Química. Soc.* 80,2587.
10. Yu, HS e Reiter, RJ (1993). *Biossíntese de melatonina, efeitos fisiológicos e implicações clínicas.* CRC Press, Boca Raton, FL.
11. Dubocovich, ML, Rivera-Bermudez, MA, Gerdin, MJ e Masana, MI (2003). *Front. Biosci.* 8,d1093–d1108.
12. Carlberg, C. (2000). *Ana. NY Acad. Ciência.* 917,387–396.
13. Reiter, RJ (2003). *Melhor prática. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 17,273–285.
14. Wiesenberg, I., Missbach, M. e Carlberg, C. (1998). *Restaurar. Neurol. Neurosci.* 12,143–150.
15. Reiter, RJ, Tan, DX, Manchester, LC e El Sawi, MR (2002). *Ana. NY Acad. Ciência.* 959,238–250.
16. Tan, DX, Reiter, RJ, Manchester, LC, et al. (2002). *Curr. Principal. Med. Química.* 2,181–197.
17. Rodriguez, C., Mayo, JC, Sainz, RM, et al. (2004). *J. Pineal Res.* 36,1–9.
18. Lerner, AB e Case, JD (1959). *J. Investir. Dermatol.* 32, 211–221.
19. Slominski, A., Pisarchik, A. e Wortsman, J. (2004). *Bioquímica. Biofísica. Acta* 1680,67–70.
20. Slominski, A., Wortsman, J., Plonka, PM, Schallreuter, KU, Paus, R., e Tobin, DJ (2005). *J. Investir. Dermatol.* 124, 13–21.
21. Bartsch, C., Bartsch, H. e Karasek, M. (2002). *Neuroendocrinol. Vamos.* 23 (Suplemento 1),30–38.
22. Gupta, D., Atanasio, A. e Reiter, RJ (1988). *Promoção da pesquisa cerebral.* Oxford, Reino Unido.
23. Slominski, A., Pisarchik, A., Semak, I., et al. (2002). *FASEB J.* 16,896–898.
24. Slominski, A., Pisarchik, A., Johansson, O., et al. (2003). *Bioquímica. Biofísica. Acta* 1639,80–86.
25. Slominski, A., Pisarchik, A., Semak, I., Sweatman, T. e Wortsman, J. (2003). *EUR. J. Bioquímica.* 270,3335–3344.
26. Semak, I., Korik, E., Naumova, M., Wortsman, J. e Slominski, UMA. (2004). *Arco. Bioquímica. Biofísica.* 421,61–66.
27. Slominski, A., Pisarchik, A., Semak, I., Sweatman, T., Szczesniowski, A., e Wortsman, J. (2002). *J. Investir. Dermatol.* 119,934–942.
28. Slominski, A., Semak, I., Pisarchik, A., Sweatman, T., Szczesniowski, A., e Wortsman, J. (2002). *FEBS Lett.* 511, 102–106.
29. Gillbro, JM, Marles, LK, Hibberts, NA e Schallreuter, KU (2004). *J. Investir. Dermatol.* 123,346–353.
30. Schallreuter, KU, Lemke, KR, Pittelkow, MR, Wood, JM, Korner, C. e Malik, R. (1995). *J. Investir. Derm.* 104, 953–957.
31. Schallreuter, KU, Schulz-Douglas, V., Bunz, A., Beazley, WD e Korner, C. (1997). *J. Investir. Dermatol.* 109,31–35.
32. Coon, SL, Roseboom, PH, Baler, R., et al. (1995). *Ciência* 270,1681–1683.
33. Roseboom, PH, Namboodiri, MA, Zimonjic, DB, et al. (1998). *Cérebro Res. Mol. Cérebro Res.* 63,189–197.
34. Conti, A., Conconi, S., Hertens, E., et al. (2000). *J. Pineal Res.* 28,193–202.
35. Slominski, A., Baker, J., Rosano, T., et al. (1996). *J. Biol. Química.* 271,12281–12286.
36. Cahill, GM e Besharse, JC (1989). *Processo. Nacional. Acad. Ciência. EUA* 86,1098–1102.
37. Grace, MS, Cahill, GM e Besharse, JC (1991). *Cérebro Res.* 559,56–63.
38. Becker-Andre, M., Wiesenberg, I., Schaeren-Wiemers, N., et al. (1994). *J. Biol. Química.* 269,28531–28534.
39. Carlberg, C., Hooft van Huijsduijnen, R., Staple, JK, DeLamarter, JF e Becker-Andre, M. (1994). *Mol. Endocrinol.* 8,757–770.
40. Nosjean, O., Nicolas, JP, Klupsch, F., Delagrangé, P., Canet, E. e Boutin, JA (2001). *Bioquímica. Farmacol.* 61,1369–1379.
41. Nosjean, O., Ferro, M., Coge, F., et al. (2000). *J. Biol. Química.* 275,31311–31317.
42. Slominski, A., Pisarchik, A., Zbytek, B., Tobin, DJ, Kauser, S. e Wortsman, J. (2003). *J. Cell Physiol.* 196,144–153.
43. Slominski, A., Pisarchik, A., Tobin, DJ, Mazurkiewicz, JE e Wortsman, J. (2004). *Endocrinologia* 145,941–950.
44. Pisarchik, A. e Slominski, A. (2004). *EUR. J. Bioquímica.* 271, 2821–2830.
45. Pozo, D., Garcia-Maurino, S., Guerrero, JM e Calvo, JR (2004). *J. Pineal Res.* 37,48–54.
46. Becker-Andre, M., Andre, E. e DeLamarter, JF (1993). *Bioquímica. Biofísica. Res. Comum.* 194,1371–1379.
47. Carrillo-Vico, A., Garcia-Perganeda, A., Naji, L., Calvo, JR, Romero, MP, e Guerrero, JM (2003). *Mol. celular. Ciência da Vida.* 60,2272–2278.
48. Mailliet, F., Ferry, G., Vella, F., Thiam, K., Delagrangé, P., e Boutin, JA (2004). *FEBS Lett.* 578,116–120.
49. Strassburg, A., Strassburg, CP, Manns, MP e Tukey, RH (2002). *Mol. Farmacol.* 61,320–325.
50. Buryanovskyy, L., Fu, Y., Boyd, M., et al. (2004). *Bioquímica* 43,11417–11426.
51. Welch, RAS, Gurnsey, MP, Betteridge, K. e Mitchell, RJ (1990). *Processo. Nova Zelândia Soc. Anima. Prod.* 50,335–338.
52. Nixon, AJ, Choy, VJ, Parry, AL e Pearson, AJ (1993). *J. Exp. Zoológico.* 267,47–56.
53. Ibraheem, M., Galbraith, H., Scaife, J. e Ewen, S. (1994). *J. Anat.* 185 (parte 1),135–142.
54. Slominski, A., Chassalevris, N., Mazurkiewicz, J., Maurer, M. e Paus, R. (1994). *Exp. Dermatol.* 3,45–50.
55. Kobayashi, H. e Paus, R. (2005). *Exp. Dermatol.* 14,157.
56. Fischer, TW, Fischer, A., Knöll, B., Hipler, UC e Elsner, P. (2000). *Arco. Derm. Res.* 292,147.
57. Fischer, TW, Burmeister, G., Schmidt, HW e Elsner, P. (2004). *Ir. J. Dermatol.* 150,341–345.
58. Fischer, T., Wigger-Alberti, W. e Elsner, P. (1999). *Hautarzt* 50,5–11.
59. Drobnik, J. e Dabrowski, R. (1999). *Citobios.* 100,49–55.
60. Drobnik, J. e Dabrowski, R. (1996). *Citobios.* 85,51–58.
61. Pertsov, SS, Abramov, YV, Volodina, TV e Rebrov, LB (2004). *Touro. Exp. Biol. Med.* 137,327–330.
62. Soybir, G., Topuzlu, C., Odabas, O., Dolay, K., Bilir, A., e Koksoy, F. (2003). *Surg. Hoje* 33,896–901.
63. Fischer, TW e Elsner, P. (2001). *Curr. Problema. Dermatol.* 29,165–174.
64. Bangha, E., Elsner, P. e Kistler, GS (1996). *Arco. Dermatol. Res.* 288,522–526.
65. Bangha, E., Elsner, P. e Kistler, GS (1997). *Dermatologia* 195,248–252.
66. Dreher, F., Denig, N., Gabard, B., Schwindt, DA, e Maibach, OI (1999). *Dermatologia* 198,52–55.
67. Dreher, F., Gabard, B., Schwindt, DA, e Maibach, HI (1998). *Ir. J. Dermatol.* 139,332–339.
68. Lee, KS, Lee, WS, Suh, SI, et al. (2003). *Exp. Mol. Med.* 35,263–268.
69. Ryoo, YW, Suh, SI, Mun, KC, Kim, BC e Lee, KS (2001). *J. Dermatol. Ciência.* 27,162–169.
70. Fischer, TW, Scholz, G., Knöll, B., Hipler, UC e Elsner, P. (2001). *J. Pineal Res.* 31,39–45.
71. Fischer, TW, Scholz, G., Knöll, B., Hipler, UC e Elsner, P. (2004). *J. Pineal Res.* 37,107–112.

72. Fischer, TW, Scholz, G., Knoll, B., Hipler, UC e Elsner, P. (2002). *Pele Farmacol. Apl. Fisiol da Pele*.15,367-373.
73. Pisarchik, A., Wortsman, J. e Slominski, A. (2004). *Gene* 341,199-207.
74. Maharaj, DS, Anoopkumar-Dukie, S., Glass, BD, et al. (2002). *J. Pineal Res.*32,257-261.
75. Kanikkannan, N., Jackson, T., Shaik, MS e Singh, M. (2001). *EUR. J. Farmacêutica. Ciência*.14,217-220.
76. Hussein, MR, Abu-Dief, EE, Abd El-Reheem, MH, e Abd-Elrahman, A. (2005). *Interno. J. Exp. Patol.*86,45-55.
77. Sener, G., Atasoy, BM, Ersoy, Y., Arbak, S., Sengoz, M., e Yegen, BC (2004). *J. Pineal Res.*37,241-246.
78. Vasin, MV, Ushakov, IB, Kovtun, V., Komarova, SN, Semenova, LA, e Galkin, AA (2004). *Radiar. Biol. Radioecol.* 44,68-71.
79. Kim, BC, Shon, BS, Ryoo, YW, Kim, SP e Lee, K.S. (2001). *J. Dermatol. Ciência*.26,194-200.
80. Kilanczyk, E. e Bryszewska, M. (2003). *Célula. Mol. Biol. Vamos.* 8,333-336.
81. Gurlek, A., Aydogan, H., Parlakpınar, H., et al. (2004). *J. Pineal Res.*36,58-63.
82. Tunali, T., Sener, G., Yarat, A. e Emekli, N. (2005). *Ciência da Vida.* 76,1259-1265.
83. Basak, PY, Agalar, F., Gultekin, F., Eroglu, E., Altuntas, I., e Agalar, C. (2003). *Ulus. Travma. Derg.*9,96-101.
84. Karbownik, M. (2002). *Neuroendocrinol. Vamos.*23 (Suplemento 1), 39-44.
85. Kumar, CA e Das, ONU (2000). *Med. Ciência. Monitor.*6,471-475.
86. Bangha, E., Lauth, D., Kistler, GS e Elsner, P. (1997). *Pele Farmacol.*10,298-302.
87. Fischer, TW, Greif, C., Fluhr, JW, Wigger-Alberti, W. e Elsner, P. (2004). *Pele Farmacol. Fisiol.*17,190-194.
88. Oh, HJ, Oh, YK e Kim, CK (2001). *Interno. J. Farmacêutica.*212, 63-71.
89. Cos, S. e Sanchez-Barcelo, EJ (2000). *Frente. Neuroendocrinol.*21,133-170.
90. Gonzalez, R., Sanchez, A., Ferguson, JA, et al. (1990). *Melanoma Res.*1,237-243.
91. Lissoni, P., Malugani, F., Malysheva, O., et al. (2002). *Neuroendocrinol. Vamos.*23,341-344.
92. Lissoni, P., Vaghi, M., Ardizzoia, A., et al. (2002). *Na Vivo*16, 93-96.
93. Reiter, RJ, Tan, DX, Sainz, RM, Mayo, JC e Lopez-Burillo, S. (2002). *J. Farmacêutica. Farmacol.*54,1299-1321.
94. Pisarchik, A. e Slominski, AT (2001). *FASEB J.*15,2754-2756.
95. Fischer, TW, Zbytek, B., Sayre, RM, et al. (2005). *J. Pineal Res.*,na imprensa.