

**Universidade de Lisboa
Faculdade de Farmácia**



Ritmos biológicos e patologia cardiovascular

Ana Carolina Ventura Soares Teixeira

Monografia orientada pelo Professor Doutor Henrique Nuno Nazaré e
Silva, Professor Auxiliar

Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

2022

**Universidade de Lisboa
Faculdade de Farmácia**



Ritmos biológicos e patologia cardiovascular

Ana Carolina Ventura Soares Teixeira

**Trabalho Final de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas
apresentado à Universidade de Lisboa através da Faculdade de Farmácia**

Monografia orientada pelo Professor Doutor Henrique Nuno Nazaré e
Silva, Professor Auxiliar

2022

Resumo

A relação entre os ritmos circadianos e o desenvolvimento de determinadas patologias é uma preocupação científica atual. O principal objetivo desta monografia é compreender alguns dos fatores que conduzem a disrupções do relógio circadiano e de que modo estes aumentam o risco cardiovascular e conduzem ao desenvolvimento das patologias cardiovasculares. Pretende-se ainda reconhecer o contributo da cronoterapia na otimização da farmacoterapia cardiovascular.

Os ritmos biológicos são uma característica universal dos seres vivos. No ser humano, a maioria das respostas fisiológicas é determinada pelos ritmos circadianos, gerados por um relógio biológico central sincronizado pelo ciclo luz/escuridão. O relógio central recebe as oscilações primárias e conduz a ritmicidade circadiana aos tecidos periféricos. A nível molecular, os genes relógio são responsáveis por gerar os ritmos circadianos nas diferentes células do organismo.

No sistema cardiovascular, reconhece-se que as células vasculares e cardíacas apresentam relógios biológicos responsáveis pelo controlo dos ritmos circadianos da pressão arterial, frequência e contratilidade cardíacas e hemostase. Estudos observacionais demonstraram que fatores associados aos hábitos da vida moderna são responsáveis pela disrupção dos relógios biológicos. Além dos fatores ambientais, vários estudos experimentais salientam o papel da disfunção dos genes relógio no aumento do risco cardiovascular e no desenvolvimento de patologias cardiovasculares.

A maior parte dos eventos cardiovasculares agudos apresenta um padrão de ritmicidade circadiana, com um pico nas primeiras horas da manhã, o qual se relaciona com alterações fisiopatológicas que ocorrem no mesmo período. A hipertensão arterial é considerada o principal fator de risco para as patologias cardiovasculares e sabe-se que o seu desenvolvimento está relacionado com a disfunção de alguns genes relógio. Os processos que conduzem à aterosclerose, principal causa de doença cardíaca isquémica, também são regulados por relógios circadianos. Recentemente surgiram alguns estudos que salientam o papel dos genes relógio na insuficiência cardíaca.

A cronoterapia, ao atuar na prevenção e no tratamento da doença baseando-se nos princípios da cronobiologia, constitui uma abordagem terapêutica promissora no âmbito das patologias cardiovasculares.

Palavras-chave: Ritmos Circadianos; Relógios Biológicos; Cronodisrupção; Patologias Cardiovasculares; Cronoterapia

Abstract

The relationship between circadian rhythms and the development of certain pathologies is a current scientific concern. The main goal is to understand which factors lead to disruptions of the circadian clock and how they enhance cardiovascular risk and cardiovascular diseases development. In addition, it argues that chronotherapy has an important role in cardiovascular pharmacotherapy optimization.

Biological rhythms are considered a universal characteristic of living beings. In humans, most physiological responses are determined by circadian rhythms. They are generated by a central biological clock synchronized by the light/dark cycle. The central clock receives the primary oscillations and then drives circadian rhythms to peripheral tissues. At the molecular level, clock genes are responsible for generating circadian rhythms within the body's different cells.

Regarding the cardiovascular system, the circadian clock, present in several vascular and cardiac cells, is responsible for controlling the circadian rhythms in terms of blood pressure, heart rate, contractility and hemostasis. A number of observational studies show that some factors associated with modern life habits are responsible for the disruption of the biological clock. Some experimental studies also find that clock genes' dysfunction leads to an increase in cardiovascular risk and to the emergence of cardiovascular diseases.

Most acute cardiovascular events show a circadian rhythm pattern with a peak in the early morning hours, which is related to pathophysiological changes that occur in the same period. Arterial hypertension is considered the main risk factor for cardiovascular diseases and its development is known to be related to some clock genes' dysfunction. Pathophysiological processes that lead to atherosclerosis, the main cause of ischemic heart disease, are also regulated by circadian clocks. Recently, a few studies emphasize the role of clock genes in heart failure.

Chronotherapy, by acting in the prevention and treatment of the disease based on the principles of chronobiology, constitutes a promising therapeutic approach in the context of cardiovascular pathologies.

Keywords: Circadian Rhythms; Biological Clocks; Chronodisruption; Cardiovascular Diseases; Chronotherapy

Agradecimentos

Aos meus avós, que apesar de já não estarem presentes fisicamente, estarão certamente orgulhosos do meu percurso. Sem eles nunca poderia ter chegado aqui e, por isso, estou-lhes eternamente grata!

Aos meus pais, por sempre terem acreditado mais em mim do que eu própria e por nunca me terem deixado desistir do meu sonho de “pequenina”. Obrigada por todo o apoio que sempre me deram e que nunca conseguirei retribuir!

Ao meu irmão, pela força que sempre me transmitiu quando me sentia “incapaz” e por, agora mais que nunca, ser para mim um exemplo de resiliência.

Aos restantes familiares, por toda a preocupação e carinho que demonstraram ao longo destes anos.

Aos amigos da faculdade, por terem tornado “mais leve” esta longa e dura caminhada.

Aos amigos de fora da faculdade, por terem partilhado comigo as minhas angústias mas também as minhas vitórias.

Ao professor Doutor Henrique Silva, por ter aceitado orientar esta monografia e pelas suas revisões, comentários e críticas que em muito contribuíram para aprofundar o meu conhecimento sobre o tema.

Por último, à Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, que foi, nestes últimos anos, a minha segunda casa.

Abreviaturas

ACTH - Hormona Adrenocorticotrófica

ADH - Hormona Antidiurética

AVC - Acidente Vascular Cerebral

BB - Bloqueador Beta

BCC - Bloqueador dos Canais de Cálcio

bHLH-PAS - *Basic helix-loop-helix/Per-ARNT-SIM*

BMAL1 - *Brain-muscle Arly hydrocarbon receptor nuclear translocator-like protein-1*

β-TG - β-tromboglobulina

CIP - Complexo Inibidor da Plasmina

CK1ε - Isoforma épsilon da caseína cinase I

CLOCK - *Circadian locomotor output cycles kaput*

CML - Célula Muscular Lisa

CNN1 - Calponina-1

COL3A1 - Colagénio tipo III alfa 1

CRY - Criptocromo

CXCL4 - Fator plaquetário 4

DBP - *Albumin D-element binding*

DC - Débito Cardíaco

DCI - Doença Cardíaca Isquémica

DCV - Doença Cardiovascular

EAM - Enfarte Agudo do Miocárdio

E-BOX - *Enhancer Box*

FC - Frequência Cardíaca

FWW - Fator de *von Willebrand*

GCR - Genes controlados pelo relógio

GCS - Gânglio Cervical Superior

HIOMT - Hidroxi-indol-*O*-metil-transferase

HLF - *Hepatic leukocyte factor*

HTA - Hipertensão Arterial

HTP - Hidroxitriptofano

IC - Insuficiência Cardíaca

ME - Medula Espinhal

NAT - *N*-acetiltransferase

NFIL3 - *Nuclear factor interleukin-3-regulated*

NO - Óxido Nítrico

NPV - Núcleo paraventricular do hipotálamo

NSQ - Núcleo supraquiasmático do hipotálamo

PAD - Pressão Arterial Diastólica

PAI-1 - Inibidor do ativador do plasminogénio tipo 1

PAM - Pressão Arterial Média

PARbZip - *Proline and acidic amino acid-rich basic leucine zipper*

PAS - Pressão Arterial Sistólica

PCR - Proteína C Reativa

PER - Período

RCV - Risco Cardiovascular

REV-ERB - *Reverse Strand of ERBA Protein*

ROR - *Retinoic acid receptor-related orphan receptor*

RPT - Resistência Periférica Total

RRE - *Rev responsive element*

SM22 α - Transgelina 1

SNA - Sistema Nervoso Aut3nomo

SNC - Sistema Nervoso Central

SNPS - Sistema Nervoso Parassimp3tico

SNS - Sistema Nervoso Simp3tico

SRAA - Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona

TAG - Triglic3ridos

TEF - *Thyrotroph embryonic factor*

TIMP 1/3 - Inibidores Tecidulares de Metaloproteinases

TM - Trombomodulina

t-PA - Ativador do plasminog3nio tecidular

TPH - Triptofano hidroxilase

VE - Volume de ejeç3o

Índice:

1	Introdução	12
2	Método de Pesquisa	13
3	Enquadramento Teórico.....	14
3.1	Ritmos Biológicos.....	14
3.2	Ritmos Circadianos e Funcionamento do Relógio Biológico.....	15
3.3	Mecanismo do Relógio Molecular em Células Mamíferas.....	20
4	Relógio Circadiano Cardiovascular	25
4.1	Função Cardiovascular.....	25
4.2.	Variáveis Fisiológicas Cardíacas	29
4.2.1.	Pressão Arterial.....	29
4.2.2.	Frequência Cardíaca.....	31
4.2.3.	Função Contráctil.....	31
4.2.4.	Sistema Hemostático.....	31
5.	Disrupção do relógio biológico como fator de risco para patologias cardiovasculares.....	33
5.1.	Fatores Ambientais	34
5.2.	Fatores Genéticos.....	37
5.3.	Patologias Cardiovasculares: variação circadiana e genes relógio	42
5.3.1.	Hipertensão Arterial.....	44
5.3.2.	Doença Cardíaca Isquémica.....	45
5.3.3.	Insuficiência Cardíaca Crónica	48
6.	Cronoterapia aplicada às patologias cardiovasculares.....	49
6.1.	Hipertensão Arterial.....	52
6.1.1.	Inibidores da Enzima de Conversão da Angiotensina (IECA)	53
6.1.2.	Antagonistas dos Recetores de Angiotensina II (ARA)	54
6.1.3.	Bloqueadores dos Canais de Cálcio (BCC)	54
6.1.4.	Ácido Acetilsalicílico.....	54
6.1.5.	Melatonina	55
6.2.	Outras patologias cardiovasculares relevantes.....	55
6.3.	Limitações.....	56
7.	Conclusões	58
8.	Referências Bibliográficas	60

Índice de Figuras:

Figura 1 - Ritmos biológicos dos seres vivos	14
Figura 2 - Sistema de temporização circadiano	17
Figura 3 - Mecanismo de secreção da melatonina	19
Figura 4 - Perfil circadiano das concentrações plasmáticas de melatonina	19
Figura 5 - Mecanismo do relógio molecular em células mamíferas	23
Figura 6 - Ciclo circadiano da pressão arterial	29
Figura 7 - Homeostasia e disrupção do relógio circadiano.....	33
Figura 8 - Relação entre a disrupção circadiana e os fatores de risco cardiovasculares	37
Figura 9 - Fisiopatologia associada à ritmicidade circadiana dos eventos CDV	43
Figura 10 - Desequilíbrio dos ritmos circadianos e aterosclerose	47
Figura 11 - Abordagens cronoterapêuticas	49

Índice de Tabelas:

Tabela 1 - Estudos (<i>in vitro e in vivo</i>) que comprovam a ritmicidade circadiana em células vasculares e cardíacas	27
Tabela 2 - Alterações nos processos cardiovasculares durante o período da manhã...	32
Tabela 3 - Estudos experimentais em modelos de ratinhos geneticamente modificados	39
Tabela 4 - Fase do dia mais comum para o início dos eventos cardiovasculares adversos	42
Tabela 5 - Genes relógio e regulação da pressão arterial.....	45

1 Introdução

A presente monografia foca-se na influência dos ritmos circadianos na fisiologia cardiovascular, uma área de investigação que nos últimos anos tem vindo a ganhar destaque. De facto, embora a presença dos ritmos circadianos nalguns sistemas fisiológicos já seja conhecida desde a década de 70, só nos finais do século passado se começou a estabelecer uma relação entre aqueles e o desenvolvimento de patologias de carácter crónico e com elevada prevalência, na qual se incluem as cardiovasculares.

Nesta revisão bibliográfica, pretende-se esclarecer a relação entre os ritmos circadianos e o desenvolvimento de patologias cardiovasculares, à luz do conhecimento atual. O objetivo principal é o de identificar os fatores, ambientais e genéticos, que conduzem a disrupções do relógio circadiano e de que modo estes fatores aumentam o risco cardiovascular e o aparecimento deste tipo de patologias. Complementarmente, pretende-se destacar a importância da cronoterapia (prevenção e tratamento da doença com base nos ritmos biológicos) no contexto das patologias cardiovasculares e o seu papel na otimização da farmacoterapia cardiovascular.

A importância que as patologias cardiovasculares assumem atualmente, não só pelo número de mortes que causam, mas também pelo impacto na sociedade e no trabalho devido aos anos potenciais de vida perdidos, e o facto de vários estudos estabelecerem relação entre fatores ambientais associados aos hábitos da vida moderna nos países desenvolvidos, desregulação do relógio biológico e aumento dessas patologias, justificam a importância de rever o conhecimento atual sobre o tema.

A monografia estrutura-se em quatro pontos: no primeiro, numa perspetiva de enquadramento teórico, são abordados conteúdos relacionados com os ritmos biológicos circadianos e o seu funcionamento a nível fisiológico e molecular; no segundo ponto é explicado o modo como os ritmos circadianos participam na regulação da fisiologia cardiovascular; no terceiro ponto, focado em diferentes categorias de estudos que sustentam a relação entre a disrupção dos ritmos biológicos circadianos e as patologias cardiovasculares, pretende-se explicar, à luz do conhecimento atual, de que modo a interrupção dos ritmos circadianos pode conduzir à doença cardiovascular; na última parte, o foco incide sobre a cronoterapia e a sua aplicação na otimização da farmacoterapia cardiovascular. Por fim, apresentam-se as principais conclusões e algumas questões suscitadas pela revisão bibliográfica.

2 Método de Pesquisa

A pesquisa bibliográfica para a elaboração desta monografia decorreu entre janeiro e julho de 2022 e teve por base a consulta de bases de dados que associam a literatura biomédica a outras áreas do conhecimento, nomeadamente, a *B-on*, *Cochrane Library*, *Google Scholar*, *PubMed*, *ScienceDirect* e *Scopus*.

Atendendo ao tema em análise e ao esboço prévio do plano de trabalho, a pesquisa nas bases de dados foi realizada utilizando as diferentes combinações das seguintes palavras-chave: *Biological Rhythms*, *Circadian Rhythms*, *Biological Clock*, *Circadian Clock*, *Clock Genes*, *Melatonin*, *Vessels*, *Endotelium*, *Chronodisruption*, *Cardiovascular Disease*, *Hypertension*, *Ischemic Heart Disease*, *Heart Failure* e *Chronotherapy*. Foram revistos e analisados artigos, preferencialmente entre os anos de 2009-2022, redigidos sobretudo em inglês e português. Foram excluídos aqueles que se encontravam repetidos entre as várias bases de dados ou escritos em línguas inacessíveis.

Para além da pesquisa de artigos científicos, foram utilizadas fontes oficiais como o site da Organização Mundial de Saúde (<https://www.who.int/>), do Centro de Prevenção e Controlo de Doenças (<https://www.cdc.gov/>) e da Federação Mundial do Coração (<https://world-heart-federation.org/>).

Para a organização e gestão das referências bibliográficas, em formato Vancouver, foi utilizado o programa informático Mendeley Reference Manager, versão 2.76.0.

3 Enquadramento Teórico

3.1 Ritmos Biológicos

Os ritmos biológicos podem ser definidos como qualquer evento endógeno (molecular, fisiológico ou comportamental) de recorrência periódica (1) e estão presentes em praticamente todas as formas de vida, das mais simples (cianobactérias) às mais complexas (mamíferos). Segundo Hernandez Fernandes, do ponto de vista evolutivo, os seres vivos incorporam eventos ambientais (2). De facto, as variações ambientais diárias e sazonais (variações de temperatura e humidade, intensidade da luz, estações do ano) e comportamentais (ciclo sono-vigília, alimentação) de carácter cíclico, impostas pelos períodos de rotação e translação do planeta, constituíram um desafio à sobrevivência dos seres vivos (3).

Assim, durante a evolução da vida na Terra, os organismos vivos tiveram necessidade de desenvolver mecanismos que permitissem sincronizar o seu funcionamento biológico com as flutuações ambientais periódicas e, deste modo, antecipar processos fisiológicos, desde os moleculares e bioquímicos até aos comportamentais. Este mecanismo de antecipação é entendido como a base do funcionamento dos relógios biológicos (osciladores endógenos responsáveis por gerar ritmos biológicos, independentemente de qualquer alteração ambiental) (3-5). O ramo da ciência biomédica que investiga os efeitos do tempo nos relógios biológicos de organismos vivos designa-se por Cronobiologia (5,6).

A Figura 1 ilustra alguns exemplos dos principais ritmos biológicos dos seres vivos.

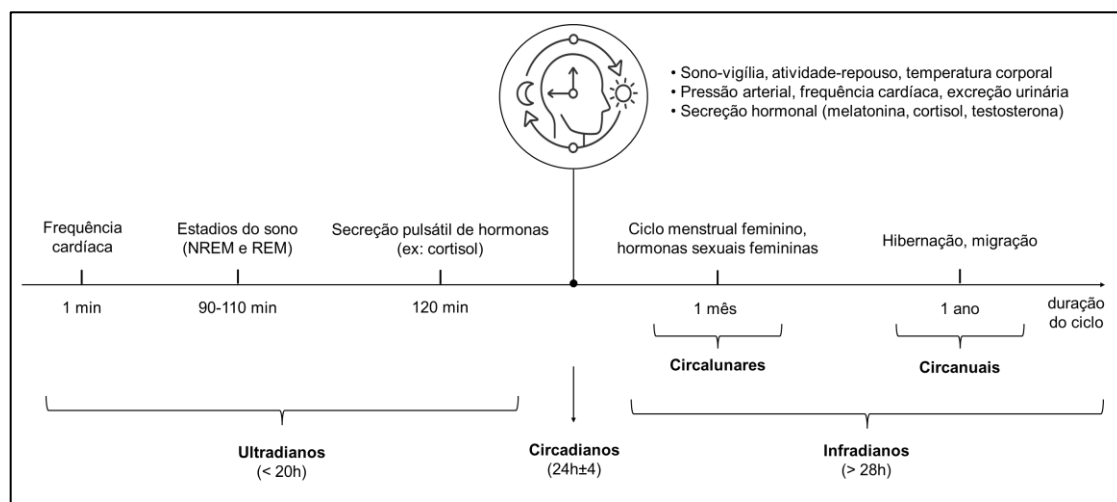


Figura 1 - Ritmos biológicos dos seres vivos (adaptado de (7))

De acordo com a figura 1, os ritmos biológicos podem ser categorizados em três grandes grupos, consoante a sua periodicidade (1,7,8):

- Ultradianos: ritmos que completam mais de um ciclo a cada 24h (período inferior a um dia). A frequência varia consideravelmente entre espécies e parâmetros fisiológicos. Exemplo: secreção pulsátil de cortisol;
- Circadianos: ritmos que duram aproximadamente 24h mimetizando o ciclo luz/escuridão. O termo circadiano provém do latim *circa* (cerca de) e *diem* (dia). Exemplos: sono-vigília; pressão arterial;
- Infradianos: ritmos que apresentam uma duração superior a 28h (período varia de dias/semanas a anos). Incluem ritmos circalunares (30 ± 5 dias) e circanuais (1 ano ± 2 meses). Exemplo: ciclo menstrual feminino.

3.2 Ritmos Circadianos e Funcionamento do Relógio Biológico

Ao longo da vida, a maioria das espécies animais, incluindo os seres humanos, está exposta a alternâncias circadianas regulares de luz e escuridão, o que justifica que a maior parte das suas respostas fisiológicas exiba ritmos circadianos (5). Estes ritmos são a manifestação de um sistema de temporização endógeno definido pelo ciclo luz/escuridão (~24h), de modo a garantir a sua sincronização com as variações ambientais externas (9-12). Os ritmos circadianos podem ser então caracterizados como fenómenos ubíquos que se repetem diariamente de forma autossustentável, sincronizada e oscilatória e permitem ao organismo adaptar-se, antecipar e responder às mudanças ambientais, mantendo a periodicidade homeostática das suas funções (13).

No ser humano, os ritmos circadianos determinam mudanças rítmicas diárias em diferentes variáveis fisiológicas e comportamentais: ciclo sono-vigília; temperatura corporal; secreção endócrina (ex. melatonina, cortisol); alimentação; desempenho físico e cognitivo; função cardiovascular (ex. pressão arterial e frequência cardíaca); metabolismo hepático e função renal (8,13,14). Tal como será explicado adiante com maior pormenor, as flutuações diárias dos processos biológicos verificam-se tanto a nível celular (expressão génica - mecanismos de transcrição, tradução e sinalização de genes relógio) como a nível orgânico e sistémico (contratilidade muscular, metabolismo, atividade física, apetite) (15).

Na tentativa de compreender as estruturas e o mecanismo responsável por regular os ritmos circadianos, Curt Richter realizou algumas experiências, em 1965 e 1967, nas

quais demonstrou que lesões progressivas do Sistema Nervoso Central (SNC), ao nível do hipotálamo de ratos, conduziam a alterações dos seus ritmos circadianos. Como tal, concluiu-se que o hipotálamo seria uma estrutura fundamental na coordenação da ritmicidade circadiana endógena (16). Experiências realizadas no início da década de 1970 por Moore e Lenn concluíram que tanto a via nervosa retino-hipotalâmica, que termina em dois núcleos hipotalâmicos (núcleos supraquiasmáticos - NSQ), como a glândula pineal eram estruturas essenciais na manutenção da ritmicidade circadiana (16). No final da mesma década, Inouye e Kawamura demonstraram que os núcleos localizados na base do cérebro seriam as estruturas centrais da regulação circadiana: os NSQ de ratos foram isolados *in vivo*, de modo a interromper todas as ligações neurais com as restantes estruturas cerebrais, tendo-se verificado que a atividade neural se mantinha apenas no interior dessas estruturas (16). Alguns animais com lesões nos NSQ foram transplantados com tecidos dos NSQ provenientes de dadores saudáveis e o ritmo circadiano foi restabelecido com o período do dador, o que reforça o papel central do NSQ na geração de ritmos biológicos (1). Posteriormente, as experiências de Krieger *et al.* (1977) e de Albers e Ferris (1984) acompanharam os ratos com NSQ lesionados, tendo-se registado a manutenção do ritmo da temperatura corporal, o que sugeriu que deveriam existir outras estruturas envolvidas na expressão da ritmicidade circadiana (16).

Embora ainda haja algumas lacunas relativas ao funcionamento dos relógios biológicos e do modo como controlam os ritmos circadianos, hoje sabe-se que, nos mamíferos, o sistema de temporização circadiano é complexo e pode ser organizado hierarquicamente em quatro componentes principais, tal como esquematizado na figura 2 (5,13,17):

- 1. Vias de entrada/aférentes (*inputs*):** recebem, traduzem e transmitem sinais externos/estímulos ambientais periódicos (ex: retina);
- 2. Relógio central/primário/*pacemaker*:** os NSQ bilaterais do hipotálamo anterior (nos humanos são constituídos por cerca de 20 000 neurónios) constituem o relógio “mestre” e são responsáveis por receber as oscilações primárias e conduzir a ritmicidade circadiana a outras áreas do encéfalo e a órgãos periféricos através de vias nervosas ou endócrinas, sincronizando uniformemente as células corporais com o tempo biológico intrínseco (10,18,19);

3. **Relógios periféricos:** estão presentes na maioria dos órgãos e tecidos periféricos (células imunitárias, tecido adiposo, músculo esquelético, coração, pulmões, fígado, rins) que embora consigam funcionar mesmo na ausência de *inputs* provenientes do NSQ, são sincronizados pelo relógio central através de vias neurais do Sistema Nervoso Autônomo (SNA), mediadores hormonais (melatonina, cortisol) e sistêmicos e pela temperatura corporal (17,19,20). O NSQ regula o ritmo destes relógios diretamente com base nas mudanças fisiológicas ou indiretamente através da libertação de fatores de sinalização neurais e hormonais e da modulação da expressão dos genes relógio (21);
4. **Vias de saída/eferentes (*outputs*):** controlam a expressão dos ritmos circadianos observados na maioria das funções fisiológicas, comportamentais e psicomotoras (ciclo sono-vigília, libertação de hormonas, flutuações de temperatura, comportamento alimentar, pressão arterial) (16). Fornecem *feedback* relativamente aos excessos rítmicos, condicionando a função dos NSQ e relógios periféricos.

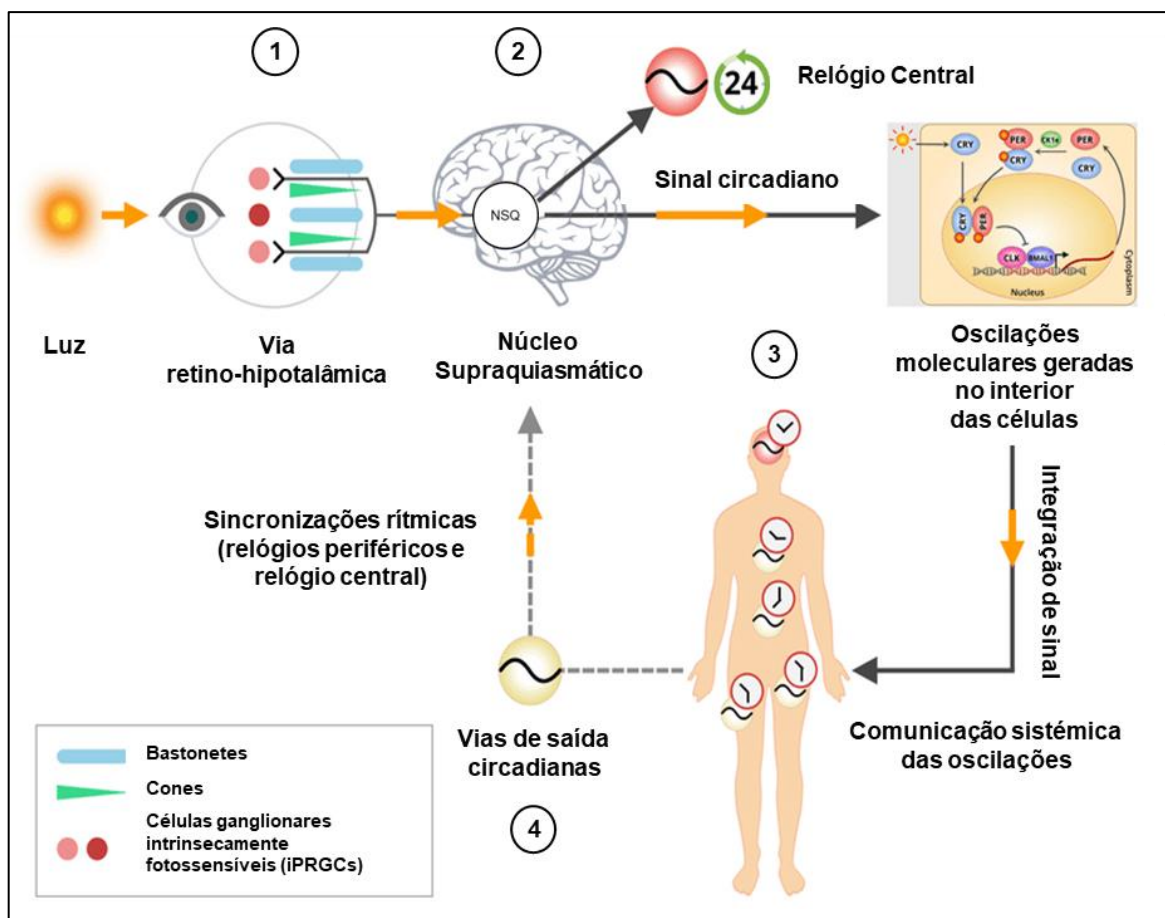


Figura 2 - Sistema de temporização circadiano (adaptado de (3))

Ainda que a sincronização do relógio central possa ocorrer graças a diferentes *zeitgebers* (do alemão *zeit* “tempo” e *geber* “doador”), endógenos (melatonina e cortisol) e exógenos (ciclo luz/escuridão, temperatura, regime alimentar, interações sociais, exercício), a luz solar é considerada o principal oscilador exógeno para a maioria dos seres vivos (3,22). A informação luminosa é detetada diretamente por um conjunto de células ganglionares da retina intrinsecamente fotossensíveis (iPRGCs - fotorreceptores especialmente sensíveis à luz de comprimento de onda curto) responsáveis por estimular a secreção de melanopsina (fotopigmento presente nos fotorreceptores da retina) e transmitir o sinal fótico até ao NSQ, através da via neural monossináptica da via retino-hipotalâmica (3,4,22). Aí, o sinal elétrico é convertido em sinais químicos responsáveis por ativar a transcrição dos genes relógio e a sua tradução em proteínas (figura 2). Além disso, é de realçar que o sinal que chega ao NSQ é depois transmitido por via endócrina até à glândula pineal (figura 3). O NSQ faz uma sinapse no núcleo paraventricular do hipotálamo (NPV), de onde as fibras prosseguem através do feixe prosencefálico medial até à medula espinhal (ME). Na ME, as fibras provenientes do SNC fazem sinapse no gânglio cervical superior (GCS) do Sistema Nervoso Simpático (SNS). A partir do GCS, as fibras nervosas simpáticas terminam na glândula pineal/epífise neural, responsável pela síntese de melatonina (1).

A melatonina (*N*-acetil-5-metoxitriptamina), neuro-hormona (23), é considerada o sincronizador endógeno mais importante do sistema circadiano e é sintetizada pelos pinealócitos (principais células da glândula pineal) a partir do aminoácido triptofano. Durante a noite (fase escura), o triptofano é hidroxilado pela enzima triptofano hidroxilase (TPH) em 5-hidroxitriptofano (5-HTP), que após descarboxilação origina a molécula de serotonina. Por sua vez, a estimulação dos recetores β_1 adrenérgicos dos pinealócitos ativa a transcrição do gene responsável pela síntese da *N*-acetiltransferase (NAT). A NAT, enzima limitante da síntese de melatonina, metaboliza a serotonina em *N*-acetil-serotonina, sendo uma parte lançada na circulação sistémica e outra convertida pela hidroxindol-*O*-metil-transferase (HIOMT) em melatonina. Uma vez sintetizada, a melatonina é libertada na circulação sistémica alcançando vários órgãos-alvo periféricos (coração, pulmões, rins) (24). Em indivíduos com padrão de atividade matutino, cerca de 80% da melatonina é sintetizada durante a noite, induzindo sonolência, e, por essa razão, esta é também apelidada de “hormona do sono”. Durante o dia (fase luminosa), pelo contrário, a NAT é degradada pelo sistema proteossomal, o

que impede a síntese de melatonina. Assim, é possível concluir que a secreção de melatonina é estimulada pela escuridão e inibida pela luz (23,25).

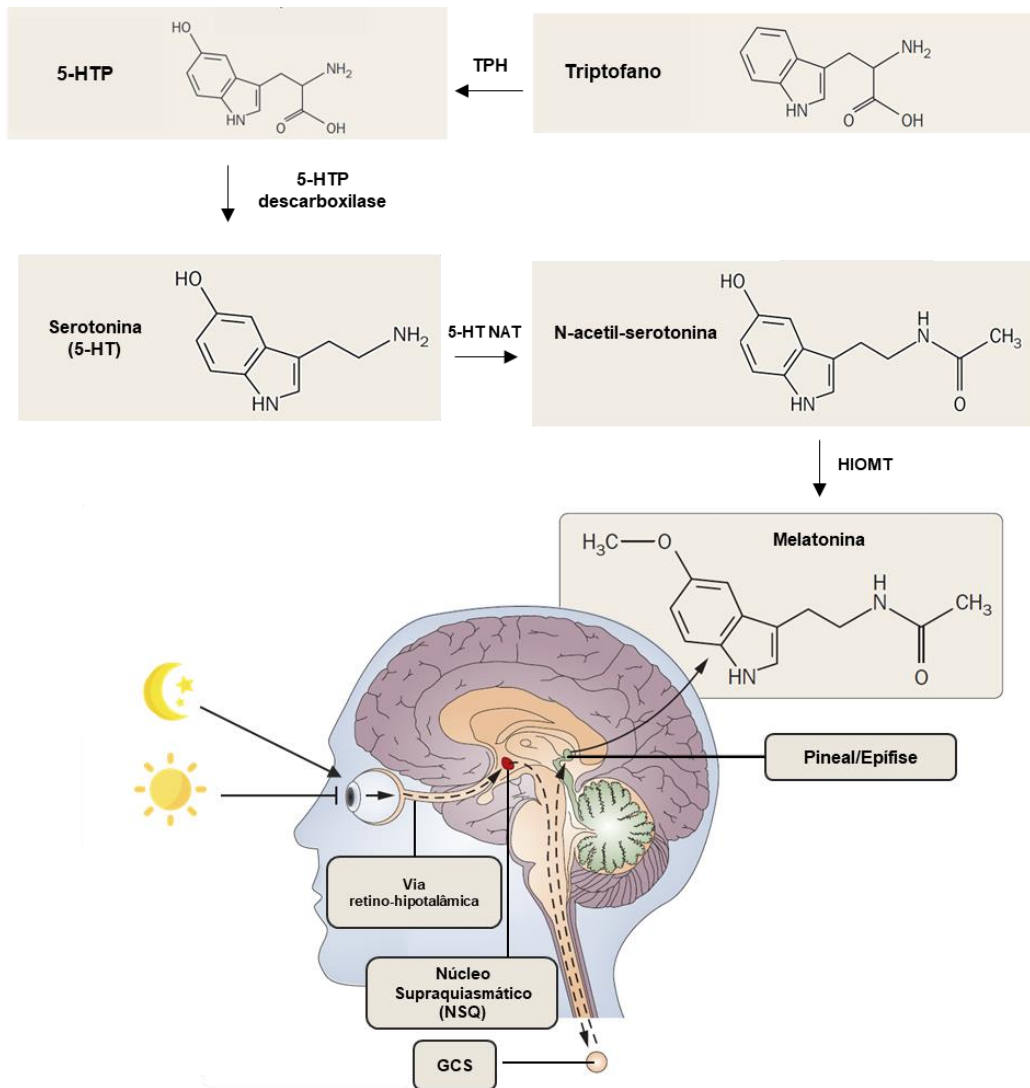


Figura 3 - Mecanismo de secreção da melatonina (adaptado de (25))

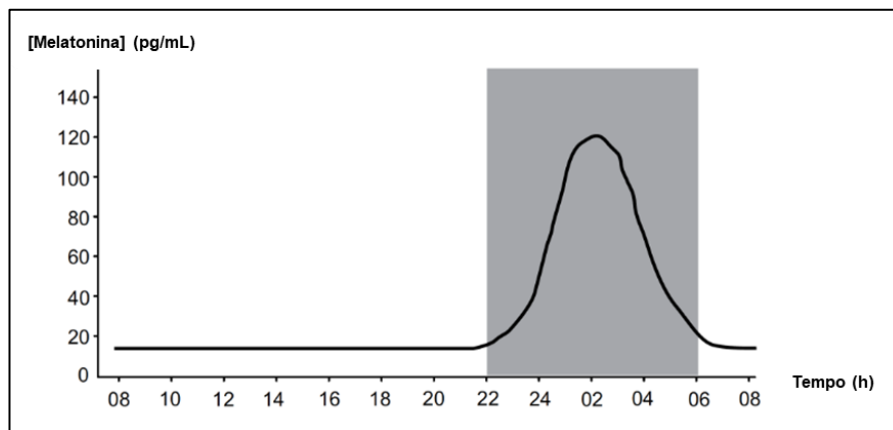


Figura 4 - Perfil circadiano das concentrações plasmáticas de melatonina (adaptado de (24))

Tal como representado na figura 4, a secreção de melatonina no ser humano inicia-se logo após o pôr do sol, atingindo um pico de concentração sensivelmente entre as 2 e as 4h da manhã. Durante a primeira metade da noite (até atingir o pico) as concentrações variam entre os 80 e os 120 pg/mL e diminuem gradualmente durante a segunda metade (depois do pico). Durante o dia, as concentrações são bastante mais reduzidas variando entre os 10 e os 20 pg/mL (3,24,25). Após integração do sinal a nível do relógio central, a comunicação sistémica da ritmicidade aos relógios periféricos envolve uma série de eferências hormonais, metabólicas e nervosas (26). Os relógios periféricos estão presentes na grande maioria dos órgãos fora do SNC, possuem um ritmo intrínseco e estão equipados com os componentes moleculares necessários para a manutenção do ritmo circadiano, permitindo-lhes desempenhar funções específicas em cada órgão e tecido (27). Além disso, também contribuem para ajustar a ritmicidade endógena às variações externas ao enviarem aos NSQ, os sinais hormonais, metabólicos e nervosos resultantes da sua atividade (16). Ao serem regulados localmente e integrados com o relógio central, formam uma rede coordenada e interligada que regula as diferentes atividades fisiológicas ao longo do dia, garantindo a homeostasia circadiana (3,13). Contudo, ao contrário dos relógios localizados no NSQ e outras áreas do cérebro, se forem removidos do corpo, os ritmos que coordenam desaparecerão enquanto os do NSQ manter-se-ão, sugerindo, uma vez mais, a subordinação dos relógios periféricos ao relógio “mestre” (1). De facto, na ausência do relógio central, nem todas as células e tecidos periféricos serão capazes de manter um ritmo circadiano autossustentado (26). Embora os relógios circadianos (centrais e periféricos) regulem muitos processos fisiológicos em função da hora do dia, é importante realçar que são capazes de operar na ausência do ciclo luz/escuridão sendo, por isso, considerados autossustentáveis. Os ritmos biológicos endógenos, expressos na ausência de qualquer influência temporal, dizem-se estar em ritmo livre (1,5,18).

3.3 Mecanismo do Relógio Molecular em Células Mamíferas

A expressão dos ritmos biológicos é conhecida em organismos unicelulares desde a década de 1960 e o facto de organismos menos evoluídos filogeneticamente manifestarem ritmicidade endógena, levava a crer que o período de rotação do planeta tinha sido de tal forma relevante na evolução dos seres vivos, que os ritmos circadianos por eles apresentados deveriam possuir uma base genética para se poderem perpetuar

(16). Anos depois, estudos genéticos realizados na mosca da fruta (*Drosophila melanogaster*), cujos genes relógio são homólogos aos dos mamíferos, foram essenciais para confirmar a teoria acima descrita: linhagens de moscas mutadas apresentavam ritmos de eclosão e locomoção alterados, sugerindo uma alteração da expressão do relógio circadiano (13,16). Na sequência destes estudos, o gene mutado na mosca da fruta foi apelidado de gene *PER*, tendo sido o primeiro gene a ser associado aos ritmos circadianos (26,28). Já nos vertebrados, o primeiro a ser identificado foi o gene *CLOCK* (29). Nos últimos quinze anos, a investigação desta temática em organismos filogeneticamente diferentes permitiu concluir que a ritmicidade circadiana intracelular, que ocorre ao nível do relógio central e relógios periféricos, é o resultado de uma rede hierárquica de circuitos de retroalimentação transcricional/transducional (positivos e negativos) autossustentados que trabalham em conjunto para produzir os padrões de expressão rítmicos (~24h) dos genes relógio (3,7,15,22,30). Os genes relógio e as proteínas resultantes da sua transcrição constituem os componentes moleculares do relógio circadiano e são responsáveis por gerar os ritmos circadianos no interior das células do organismo (9).

Nos mamíferos, o sistema circadiano engloba dois ciclos de *feedback* transcricional (figura 5): o central/primário e o auxiliar/secundário (3). O ciclo de *feedback* central inclui não só as proteínas que funcionam como reguladores positivos, responsáveis por ativar a transcrição génica (a *CLOCK* e a *BMAL1*, membros da família dos fatores de transcrição que apresentam o domínio bHLH-PAS) como também as que a inibem (proteínas repressoras *PER1/2/3* e *CRY1/2*) (3,11,29). Considerando que cada ciclo de 24h tem início durante a noite, neste período, a expressão dos genes relógio é ativada pelo heterodímero *CLOCK:BMAL1*, através do domínio PAS. As proteínas *CLOCK* e *BMAL1* heterodimerizam no núcleo e o complexo resultante liga-se a promotores génicos específicos (com uma sequência E-Box), a montante dos genes alvo (*PER* e *CRY*), ativando a sua transcrição e a de GCR (genes controlados pelo relógio - não realimentam diretamente o heterodímero mas modulam a função celular ao longo do dia). Durante o dia e após tradução dos respetivos genes, a quantidade das proteínas *PER* e *CRY* aumenta até atingir um determinado limiar, que permite a sua dimerização no citoplasma (*feedback* positivo). Após fosforilados pela CK-1 ϵ , os heterodímeros *PER:CRY* retornam ao núcleo e interagem com o complexo proteico *CLOCK:BMAL1*, inibindo a sua atividade transcricional (*feedback* negativo) (8,20,22,30). Na noite

seguinte, as proteínas PER e CRY são progressivamente fosforiladas e depois degradadas ou pela via da ubiquitina (ligases E3 específicas) ou pela proteossomal e, por conseguinte, os seus níveis de mRNA decrescem até atingirem valores insuficientes para reprimir a atividade do complexo CLOCK:BMAL1 (8). Como tal, este volta a ativar a transcrição dos genes relógio, reiniciando um novo ciclo (16). Por este motivo, considera-se a acumulação nuclear temporalmente regulada dos complexos PER:CRY, a etapa crítica para o término do ciclo de *feedback* primário. De forma bastante resumida, o processo global de ativação e repressão da expressão génica acima descrito dura cerca de 24 horas: durante o dia inicia-se sempre um novo ciclo de ativação transcricional com o término da inibição do heterodímero CLOCK:BMAL1 pelo complexo PER:CRY, durante a noite (3,28,29).

Ao mesmo tempo que se desenvolve o ciclo de *feedback* central, ocorre um ciclo de *feedback* auxiliar ou estabilizador, responsável por reprimir a transcrição periódica da BMAL1 (11,26,31). Neste caso, o mecanismo de reforço da ativação transcricional é mediado por grupos de recetores nucleares circadianos: os RORs (ROR α , ROR β e ROR γ) e os REV-ERBs (REV-ERB α e REV-ERB β codificados, respetivamente, pelos genes *NR1D1* e *NR1D2*), sob controlo transcricional do complexo CLOCK:BMAL1. O heterodímero ativa a transcrição dos genes *REV-ERBA* e *RORA* e as proteínas resultantes da transcrição dos mesmos competem entre si para se ligarem a elementos responsivos REV-ERB/ROR (RRE), no promotor do gene *BMAL1*. Contudo, a ativação ou inibição da transcrição do gene *BMAL1* depende da proteína ligada, visto que apresentam efeitos antagónicos: enquanto a ROR α ativa a transcrição do gene *BMAL1*, a REV-ERB α suprime-a (8,22,32). Assim, todos os componentes que compõem os ciclos de *feedback* centrais e auxiliares determinam os níveis de expressão dos genes do relógio central e GCR via Box-E e RRE (32). Por fim, é de realçar que a ligação do complexo CLOCK:BMAL1 à Box-E é capaz de ativar a expressão de diferentes genes relógio ao (8,27):

- a) Ligar-se a promotores de GCR, que possuem o elemento E-Box na sua região promotora, regulando assim, não só a transcrição dos genes relógio, como também de outros genes alvo, nomeadamente o *WEE1* (*G2 Checkpoint Kinase*) (16);

- b) Ligar-se à box-E, a montante dos fatores de transcrição PARbZip (subfamília de fatores de transcrição circadianos): DBP, HLF, TEF. Por sua vez, estes ligam-se a elementos da Box-D induzindo a expressão diurna de GCR (11);
- c) Regular a expressão dos genes *NR1D1/2* que codificam os recetores nucleares REV-ERB α/β , respetivamente. Estes recetores reprimem ritmicamente a transcrição dos genes *BMAL1* e *NFIL3*, ativados pelo ROR α/β . Por sua vez, a NFIL3 juntamente com a DBP, a CLOCK e a BMAL1, regulam o ritmo nos recetores REV-ERB α/β (28).

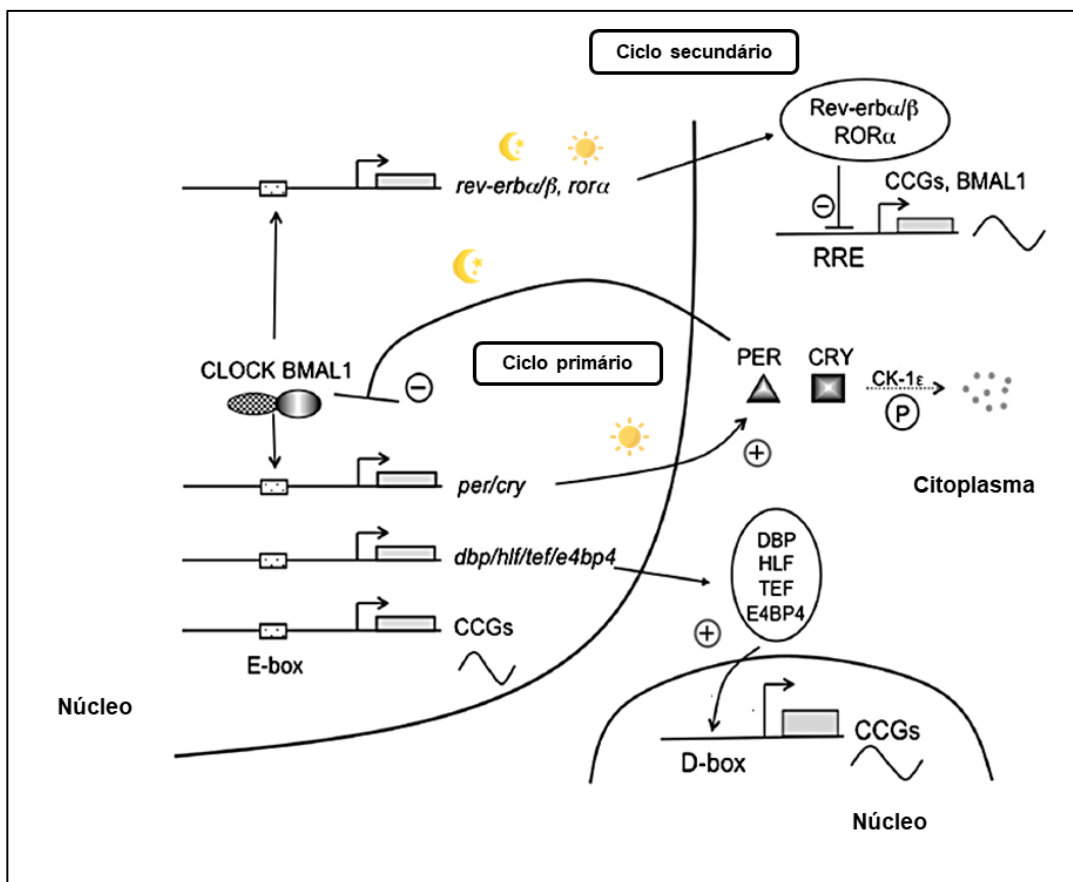


Figura 5 - Mecanismo do relógio molecular em células mamíferas (adaptado de (27))

A ritmicidade circadiana é ainda determinada por interações proteína/proteína e modificações pós-traducionais que regulam a taxa de associação, acumulação, translocação e degradação das proteínas PER e CRY (3,7). As modificações pós-traducionais são responsáveis por um atraso temporal na oscilação circadiana que se revela importante, uma vez que a sua inexistência conduziria a uma rápida acumulação dos complexos PER:CRY e, por conseguinte, a uma inibição prematura da transcrição. Entre elas destacam-se a acetilação, fosforilação (caseína cinases ϵ e δ), ubiquitinação

e SUMOilação (9). A atividade de fosforilação das caseínas cinases (CK-1 ϵ e δ) também assegura a estabilidade e a translocação nucleares: por exemplo, a CK-1 ϵ fosforila as proteínas que resultam da tradução dos GCR e, como tal, ao serem fosforilados/degradados, determinam a quantidade de heterodímeros PER:CRY que entra no núcleo de modo a inibir o complexo CLOCK:BMAL1. Deste modo, a CK-1 ϵ é responsável por regular a atividade do complexo, controlando a duração do período circadiano (3,29). A par das modificações pós-traducionais e transcricionais, também o mecanismo regulador epigenético contribui para a precisão e robustez do relógio molecular (22,27).

De facto, quase 50% de todos os genes expressos no organismo se encontram sujeitos ao mecanismo de regulação circadiana. Graças a vários estudos transcriptômicos que têm procurado salientar a importância da regulação circadiana na expressão génica, sabe-se que no ser humano, cerca de 10-15% de todos os genes expressos em células e tecidos apresentam oscilações circadianas provocando flutuações circadianas em diferentes processos fisiológicos (crescimento celular, adesão celular, metabolismo, apoptose, fibrose, função contrátil) e funções cardiovasculares (frequência cardíaca, pressão arterial, metabolismo cardíaco, função endotelial, resistência vascular, coagulação) (8,10,11,22,31).

4 Relógio Circadiano Cardiovascular

O desenvolvimento do sistema cardiovascular circadiano foi observado através da emergência de ritmos circadianos no útero e da diferenciação de células estaminais cultivadas em diferentes linhagens celulares. Sabe-se que o relógio molecular se desenvolve gradualmente durante a diferenciação e maturação (é possível verificar o aumento dos níveis de alguns dos genes relógio durante a diferenciação cardíaca) e que a expressão dos genes do relógio central se inicia a meio da gestação (22). Os níveis dos sincronizadores maternos, principalmente da melatonina, ao atravessarem a placenta, também influenciam o ritmo circadiano fetal. Só após o nascimento, decorrem as mudanças de período, amplitude e fase, de modo a alinhar o ritmo circadiano fetal com o ambiente externo (22,33). Nas 3-6 semanas após o nascimento, os relógios internos são gradualmente sincronizados com o período de 24h (5). Na verdade, o desenvolvimento do relógio circadiano inicia-se ainda durante a formação das primeiras células do ser humano sendo, mais tarde, essencial na regulação de vários aspectos da fisiologia humana, incluindo a função cardiovascular.

4.1 Função Cardiovascular

A primeira evidência da existência do relógio molecular na vasculatura foi identificada, no início do século XXI, em aortas de ratinhos isoladas em diferentes momentos ao longo de um dia (34). Poucos anos depois, foi confirmada a existência de um relógio funcional através da utilização de explantes de tecido cardiovascular. Com esta experiência, foi possível medir a atividade rítmica da luciferase em artérias e veias de ratos transgênicos Per1-Luciferase, tendo os tecidos revelado 3 a 12 ciclos circadianos de expressão gênica *in vitro* (35). Nos anos que se seguiram, após a realização de vários estudos *in vitro* e *in vivo*, demonstrou-se o envolvimento dos genes relógio na fisiologia vascular, chegando-se à conclusão que a função cardiovascular é regulada por vários constituintes celulares que apresentam relógios periféricos com ritmicidade circadiana: células endoteliais, células musculares lisas vasculares, fibroblastos, cardiomiócitos e células estaminais (20,22,27).

As células endoteliais revestem a camada interna dos vasos sanguíneos e a superfície interna das câmaras cardíacas. Libertam óxido nítrico (NO), responsável pelo relaxamento das células do músculo liso e conseqüente redução do tônus vascular, e

também endotelina-1 e angiotensina-II que, pelo contrário, promovem a sua contração e o aumento do tônus vascular. Ao regularem as trocas entre a corrente sanguínea e os tecidos circundantes, determinam a permeabilidade sangue-tecido e regulam as propriedades da superfície vascular (36). A superfície endotelial contém também vários fatores que regulam a adesão plaquetária, a coagulação (trombomodulina - glicoproteína integral de membrana com atividade anticoagulante) e a fibrinólise (PAI-1) (36).

As células musculares lisas constituem a camada média dos vasos sanguíneos e são responsáveis pela vasoconstrição e vasodilatação. O tônus do músculo liso é controlado pelas células endoteliais, mediadores circulantes, Sistema Nervoso Simpático (36) e, em alguns casos, pelo Sistema Nervoso Parassimpático (SNPS). Estão envolvidas no desenvolvimento e progressão de várias patologias cardiovasculares, nomeadamente a aterosclerose.

Os fibroblastos estão presentes na camada externa de tecido conjuntivo dos vasos sanguíneos. Desempenham, juntamente com as células endoteliais, um papel essencial na angiogénese (36).

Os cardiomiócitos são as células do músculo cardíaco. Exibem expressão circadiana dos genes relógio em resposta à norepinefrina/noradrenalina, neurotransmissor simpático que funciona como *zeitgeber*.

As células estaminais são células com capacidade de autorrenovação e diferenciação nos diferentes tipos de células. Nos tecidos adultos, desempenham um papel de extrema relevância nos processos homeostáticos e na própria progressão da doença (36).

Na tabela 1 faz-se uma síntese dos principais estudos que comprovam a existência de ritmicidade circadiana nas células e tecidos vasculares.

Tabela 1 - Estudos (*in vitro e in vivo*) que comprovam a ritmicidade circadiana em células vasculares e cardíacas

	Células	Resultados e Conclusões dos Estudos	Referências
Função Vascular	Células Endoteliais	Investigou-se se os heterodímeros CLOCK:BMAL1 e CLOCK:BMAL2 são capazes de ativar o promotor PAI-1 em células endoteliais aórticas bovinas. Concluiu-se que: - Ambos os heterodímeros ativam o promotor PAI-1; - O PAI-1 apresenta variação circadiana nas células endoteliais vasculares.	(37)
		Investigou-se a presença de GCR em células endoteliais da veia umbilical humana (HUVECs), entre eles, o gene da trombomodulina (TM). Concluiu-se que o relógio periférico das células endoteliais vasculares regula a expressão génica circadiana da trombomodulina.	(38)
	Células musculares lisas (CML)	As CML da aorta de ratinhos foram tratadas com angiotensina II, potente vasoconstritor, durante cerca de 2h. Verificou-se que: - Os genes <i>PER2</i> , <i>DBP</i> e <i>BMAL1</i> apresentam evidente oscilação circadiana; - A angiotensina II induz o aumento da expressão do gene <i>PER2</i> .	(39)
		Em CML da linhagem Movas-1, submetidas a choque séptico, analisou-se a expressão dos genes relógio e o potencial da norepinefrina e da forskolina (10^{-6} M) enquanto potenciais <i>zeitgebers</i> do gene <i>Bmal1</i> nestas células. Verificou-se que: - Além dos genes relógio, também os TIMP 1/3, COL3A1 e as proteínas SM22 α e CNN1 expressam padrões circadianos; - A norepinefrina e a forskolina são capazes de sincronizar os ritmos circadianos do gene <i>BMAL1</i> .	(40)

	Células	Resultados e Conclusões dos Estudos	Referências
	Fibroblastos	<p>Os fibroblastos de ratinhos foram expostos a altas concentrações de soro de cavalo adulto e, mais tarde, a 10µM de forskolina durante 2h, de modo a estudar a sua influência na expressão dos genes <i>rPER1</i>, <i>rPER2</i>, <i>REV-ERBA</i>, <i>DBP</i>. Verificou-se:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Oscilação circadiana de alguns genes relógio (<i>rPER1</i>, <i>rPER2</i>, <i>REV-ERBA</i>, <i>DBP</i>, <i>TEF</i>); - Indução da expressão circadiana dos genes <i>PER1/2</i> e <i>DBP</i> pela forskolina. <p>*rPer: homólogos do gene <i>PER</i> da <i>Drosophila</i></p>	(41,42)
		<p>Procedeu-se à transfeção de culturas de fibroblastos de rato-1 com um plasmídeo Bmal1:luc e de fibroblastos primários obtidos de ratinhos mPer2^{Luc-SV40}. Monitorizou-se os ritmos circadianos da expressão dos genes relógio durante 1-2 semanas. Conclui-se que os fibroblastos apresentam oscilações circadianas <i>in vitro</i> acentuadas, independentes e autossustentadas.</p>	(43)
Função Cardíaca	Cardiomiócitos	<p>A exposição aguda (2h) e crónica de ratos adultos isolados a diferentes concentrações de soro bovino fetal, 50% e 25%, respetivamente, e a 2,5% (standard da cultura) revelou a oscilação circadiana dos genes <i>BMALI</i>, <i>REV-ERBA</i>, <i>PER2</i>, <i>DBP</i> nos cardiomiócitos mesmo quando foram expostos somente a 2,5% de soro.</p> <p>Investigou-se também se a glucose (5 mM) e a norepinefrina (10µM, 2h) funcionavam como <i>zeitgebers</i> dos genes relógio nos cardiomiócitos e verificou-se que, ao contrário da norepinefrina, a glucose não induziu a expressão dos genes relógio, tanto na presença como na ausência do soro.</p>	(44)
	Células Estaminais	<p>Isolaram-se ratinhos WT* e Per-2^{m/m} para determinar se a mutação do gene <i>PER2</i> afetava a função endotelial e a angiogénese. Observou-se disfunção endotelial parcial resultante do comprometimento da função endotelial de células progenitoras endoteliais.</p> <p>*WT: <i>Wild-Type</i>; * Per-2^{m/m}: mutação homozigótica no gene <i>PER2</i></p>	(45)

4.2. Variáveis Fisiológicas Cardíacas

A maior parte das variáveis fisiológicas cardíacas, tais como a pressão arterial (PA), frequência cardíaca (FC), contratilidade cardíaca, hemostase e parâmetros eletrofisiológicos, apresenta padrões únicos de atividade circadiana, sendo o seu ritmo circadiano responsável por modular eventos cardiovasculares adversos graves, nomeadamente o Enfarte Agudo do Miocárdio e a Fibrilhação Auricular (8,12,17,19,46).

4.2.1. Pressão Arterial

A PA, medida da pressão que o sangue exerce internamente sobre as paredes das artérias ao longo de um ciclo cardíaco, é uma das variáveis fisiológicas mais importantes. É definida pelo produto do débito cardíaco ($DC = FC \times VE$) pela resistência periférica total (RPT): $PAM = DC \times RPT$ (31). De um modo geral, a PA atinge níveis mais elevados durante o período de vigília comparativamente ao período do sono. Há várias décadas que se sabe que, em indivíduos saudáveis, com padrão diurno/matutino de atividade, a PA apresenta um padrão circadiano característico: sofre um aumento acentuado ao acordar (após adoção da postura ereta), designado “aumento matinal” que coincide com o aumento da expressão de fatores de coagulação, da produção de plaquetas e da trombogênese, atingindo o pico a meio da manhã. Embora durante a tarde se inicie uma diminuição gradual dos valores de PA, é durante a noite que estes sofrem um decréscimo mais acentuado (20-22,47). Para a manutenção da saúde cardiovascular é essencial manter uma diferença entre a PA noturna e diurna de 10-20% (19). Tal como representado na figura 6, o padrão circadiano da PA resulta tanto de efeitos comportamentais (alterações cíclicas exógenas provocadas pelo ciclo sono-vigília) como de fatores ambientais que interagem com os ritmos circadianos de sistemas responsáveis por regular a PA (SNA, Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona, endotélio vascular) afetando as propriedades intrínsecas dos vasos sanguíneos (36,48,49).

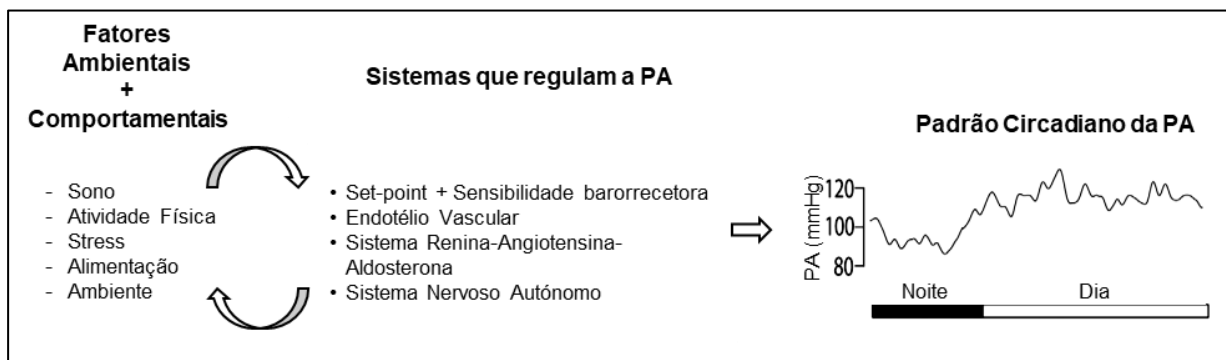


Figura 6 - Ciclo circadiano da pressão arterial (adaptado de (49))

• Sistema Nervoso Autônomo (SNA)

O SNA desempenha um papel vital nas respostas fisiológicas e patológicas do sistema cardiovascular. Enquanto o SNS induz o aumento da FC, contratilidade miocárdica e RPT, o SNPS, pelo contrário, conduz à redução da FC e da contratilidade cardíaca, embora em menor grau (53). Ambos seguem um padrão de ritmicidade circadiano: a atividade parassimpática é mais pronunciada durante a noite, enquanto o SNS apresenta um pico matinal, coincidente com a elevada sensibilidade dos recetores vasculares (46). De acordo com estudos nos quais foram feitas medições seriadas de catecolaminas plasmáticas (epinefrina e norepinefrina) durante 24h, concluiu-se que o principal determinante do padrão circadiano da PA é o SNS, visto que os valores das catecolaminas seguem um padrão idêntico ao da PA. O pico matinal da PA parece estar relacionado com o aumento da atividade do SNS: a estimulação simpática das fibras musculares cardíacas (aumento da força contrátil e da frequência de despolarização do nó sinoatrial) e dos rins (aumento da secreção de renina), traduz-se no aumento da RPT (2).

• Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (SRAA)

O Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona regula a PA e apresenta um padrão circadiano com níveis mais elevados durante o início da manhã (49). Segundo N. Ohashi *et al.* (2017), mais recentemente, o foco tem sido compreender de que modo os distúrbios do ritmo circadiano na ativação do SRAA conduzem a danos renais, hipertensão e variações diurnas da PA (50).

• Endotélio Vascular

O endotélio vascular, camada única de células que reveste toda a rede vascular, apresenta propriedades vasodilatadoras importantes na proteção contra patologias cardiovasculares (19), visto que a óxido nítrico sintetase endotelial (eNOS) possui funções ateroscleróticas: produz NO responsável por inibir a agregação plaquetária e regular a permeabilidade dos vasos (51,52). Sob condições fisiológicas, o vasorelaxamento dependente do endotélio é reduzido durante o dia, devido à menor produção de NO durante a manhã (53). Alguns estudos mostram que os relógios circadianos periféricos podem regular a expressão da eNOS, e, por conseguinte, modular a variação diurna da PA (54).

• Cortisol

O ritmo circadiano do cortisol encontra-se em estreita associação com o ciclo sono-vigília e a sua secreção responde às variações da concentração plasmática da hormona adrenocorticotrófica (ACTH), o que justifica o pico de concentração nas primeiras horas da

manhã, ao acordar (é libertada praticamente metade da concentração de cortisol o que coincide com a ativação simpática), e os valores próximos de zero à hora de dormir (12). Muitas funções cardiovasculares cíclicas são controladas pelo cortisol: este aumenta a libertação da hormona antidiurética (ADH) pela neuro-hipófise e de angiotensinogénio no fígado, elevando a PA e o DC (2).

4.2.2. Frequência Cardíaca

O padrão circadiano da FC assemelha-se bastante ao da pressão arterial sistólica (PAS) e da pressão arterial diastólica (PAD) em condições normais e revela uma forte dependência genética ao nível de valor médio diurno, amplitude de variação e horário do pico ao longo das 24h (55). Após o despertar, aumenta de modo acentuado, atingindo um pico por volta do meio-dia. Por sua vez, diminui progressivamente até por volta das 4h da manhã, quando atinge o seu valor mais baixo. Diminui durante o sono/repouso e ao acordar aumenta rapidamente, assim como o DC (10,20,22). Contrariamente à PA, a variação circadiana da FC é semelhante tanto em indivíduos com PA normal como em indivíduos hipertensos (2). É regulada pelo SNA (a nível central) e pelos relógios periféricos que controlam a expressão e função dos canais iónicos de sódio, potássio e cálcio (20).

O pico matinal do SNS e o aumento da atividade do SRAA juntamente com a diminuição do sistema parassimpático contribuem para o aumento da PA e da FC durante a manhã (46).

4.2.3. Função Contráctil

A contratilidade cardíaca varia ao longo do dia e é regulada pelos relógios moleculares presentes no miocárdio (20). É influenciada por vários mecanismos que incluem o metabolismo, sinalização celular, homeostase do cálcio e composição dos filamentos que estão sob controlo circadiano. Alguns componentes dos miofilamentos (proteína C de ligação à miosina, tropomiosina, troponinas I e T) apresentam flutuação circadiana. Contudo, o papel que tanto a oscilação diária das proteínas dos miofilamentos, como as modificações pós-traducionais dos componentes contráteis desempenham nas diferenças circadianas observadas ao nível da contratilidade cardíaca, ainda permanece sem resposta (56).

4.2.4. Sistema Hemostático

A atividade hemostática depende do equilíbrio entre a coagulação (previne a perda excessiva de sangue durante eventos hemorrágicos) e a atividade antitrombótica (previne a formação de coágulos, garantindo a perfusão aos sistemas orgânicos) (19,57). A coagulação funciona como

um mecanismo protetor mas também pode ser responsável pela ocorrência de eventos cardiovasculares graves (19). A atividade de coagulação é maior durante a manhã, enquanto a atividade antitrombótica é mais reduzida (47,49). A coagulação encontra-se aumentada durante a manhã porque a agregação plaquetária, regulada pelo relógio central (via trombopoietina), e os marcadores de ativação da superfície plaquetária (CXCL4 e β -TG) apresentam um pico matinal, entre as 6h e o 12h (58,59).

Durante o período em que se verifica o aumento da atividade coagulante, ocorre redução da atividade trombolítica, o que pode ser parcialmente explicado pela redução da concentração do complexo inibidor de plasmina (CIP) no sangue e pelo aumento da concentração do inibidor do ativador tecidual de plasminogénio tipo 1 (PAI-1) durante o período da manhã (53). O PAI-1 é um importante inibidor da atividade fibrinolítica e, como tal, a redução da sua concentração aumenta a probabilidade de desenvolvimento de coágulos sanguíneos nas primeiras horas da manhã (60). As atividades do PAI-1 e do ativador do plasminogénio tecidual (t-PA) oscilam em oposição de fase: enquanto o pico de atividade do PAI-1 ocorre durante a manhã, a do t-PA ocorre durante a tarde (60). Em resumo, durante a manhã verifica-se um aumento da expressão do *PAI-1* e da função plaquetária, níveis aumentados de fibrinogénio circulante e outros fatores de coagulação, assim como uma diminuição da atividade fibrinolítica durante as primeiras horas do dia (o *PAI-1* é inibido) (2,17,21).

A tabela 2 resume os principais efeitos da variação circadiana dos processos cardiovasculares anteriormente descritos no sistema cardiovascular.

Tabela 2 - Alterações nos processos cardiovasculares durante o período da manhã (adaptado de (59))

Processos Cardiovasculares	Atividade durante a manhã	Efeitos no sistema cardiovascular
Tónus Simpático	+	↑ PA, FC, Vasoconstrição
Endotélio Vascular	-	Formação da placa de ateroma
Agregação plaquetária	+	↑ Formação de coágulos
Atividade trombolítica	-	

5. Disrupção do relógio biológico como fator de risco para patologias cardiovasculares

Os ritmos circadianos constituem um importante componente da Fisiologia Humana (22), sendo essenciais para a manutenção de várias funções (ciclo sono-vigília, temperatura corporal, FC, PA) e para a homeostasia sistêmica (2). Assim, quando os relógios biológicos internos ficam dessincronizados dos ciclos ambientais, os diferentes níveis de organização do organismo humano (molecular, celular, tecidual e sistêmico) são também afetados: desde a regulação do genoma até ao controlo da síntese proteica, sinalização celular e várias funções fisiológicas, com consequente desenvolvimento e progressão de patologias com diferentes etiologias (neoplasias, distúrbios do sono, metabólicos, cognitivos, psiquiátricos) incluindo as patologias cardiovasculares (figura 7) (3,5,21). O comprometimento prolongado dos ritmos fisiológicos, comportamentais e bioquímicos do organismo designa-se por Cronodisrupção (14). A inter-relação entre os ritmos circadianos e a doença humana pode criar um ciclo vicioso entre a expressão da doença e a perturbação circadiana (61).

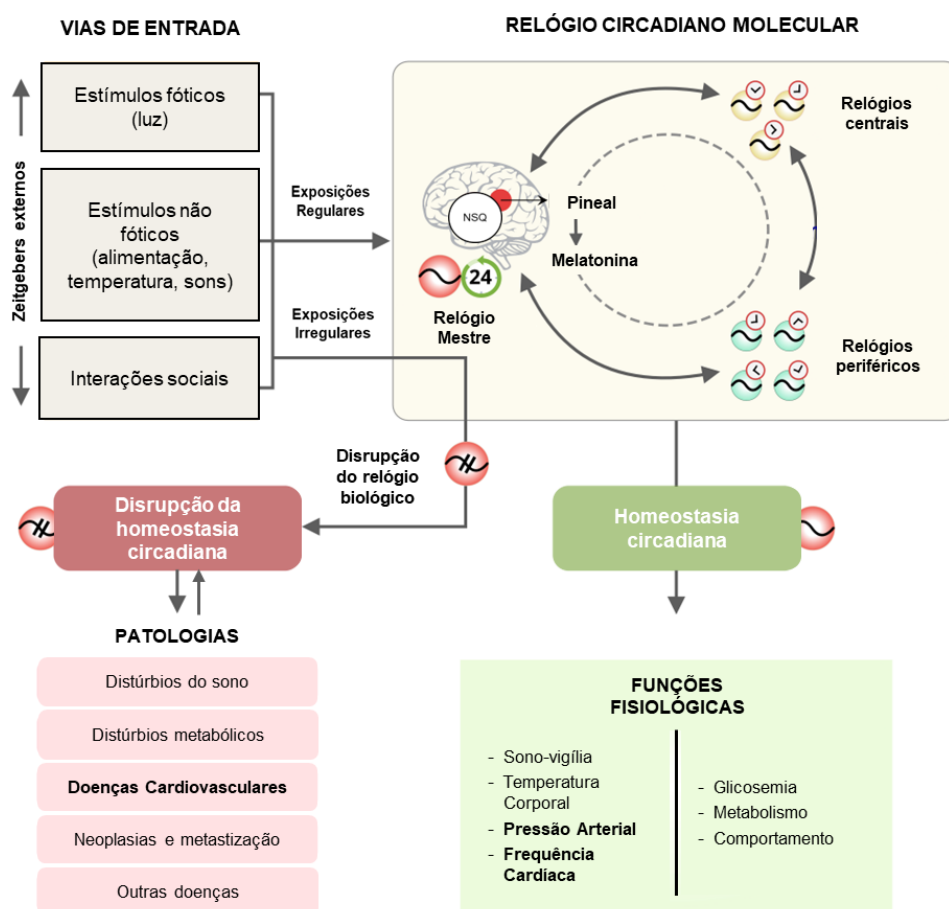


Figura 7 - Homeostasia e disrupção do relógio circadiano (adaptado de (3))

Esta monografia incide apenas sobre a disrupção do relógio biológico e a sua relação com as patologias do foro cardiovascular. É importante frisar que a disrupção do relógio circadiano (interrupção dos ritmos de 24h) contribui para o desenvolvimento de patologias cardiovasculares mas o contrário também é verdade (22). Sabe-se, hoje, que a disrupção do relógio circadiano pode ser provocada, quer por fatores ambientais quer por fatores intrínsecos, e ambos podem aumentar o risco de doença cardiovascular (DCV).

5.1. Fatores Ambientais

Alguns estudos observacionais sugerem que a dessincronização entre os relógios centrais e periféricos pode ocorrer em determinadas situações associadas aos hábitos da vida moderna dos países desenvolvidos, tais como, o trabalho por turnos, *jet lag* social, atividades noturnas prolongadas com luz artificial, distúrbios do sono, entre outras (21,30,36,62). Embora ainda não tenha sido estabelecida uma relação robusta de causalidade, sabe-se que estes distúrbios do estilo de vida podem aumentar a incidência de DCV fatais e não fatais (18). Nos indivíduos em que estes fatores ambientais levam à disrupção do relógio biológico, várias funções do sistema cardiovascular (PA, FC), ritmos de temperatura corporal e secreção hormonal são afetados (12). De seguida, apresentam-se alguns estudos epidemiológicos que mostram como estes fatores podem contribuir para o aumento dos fatores de risco cardiovasculares e para o desenvolvimento de DCV.

5.1.1. Trabalho por turnos

Em resultado da industrialização e dos avanços tecnológicos, o dia passou a estender-se muito além das horas com luz, prolongando-se as horas de vigília. Segundo estudos europeus e americanos, cerca de 15 a 30% da população desenvolve algum tipo de trabalho noturno (21,62). A troca de turno de trabalho obriga os indivíduos a estarem ativos quando deveriam estar em repouso e vice-versa (16). As pessoas que trabalham constantemente por turnos possuem maior probabilidade de apresentar piores resultados em saúde (neoplasias, diabetes, síndrome metabólico e patologias cardiovasculares) devido a vias multifatoriais que incluem fatores psicossociais, insónia, atividade física reduzida, qualidade nutricional alterada e exposição reduzida à luz (19,31,46,63,64). Segundo a Organização Mundial de Saúde (<https://www.who.int/>), o trabalho por turnos é considerado fator de risco para doença coronária, morte cardíaca súbita, entre outras patologias clínicas. Sabe-se ainda que podem desenvolver padrão de hipertensão não-*dipper* (diferença entre a PAS noturna e diurna inferior a 10%), o que aumenta o risco cardiovascular (RCV).

- Kitamura *et al.* (2002) verificaram que trabalhadores por turnos com hipertensão leve e com o mesmo horário de trabalho (4 dias de turno diurno, 2 dias de folga e 4 dias de turno noturno) apresentavam uma alteração no padrão de redução da PA. No primeiro dia do turno noturno, a variação circadiana da PA alterou de um padrão *dipper* (diferença entre a PAS noturna e diurna entre 10-20%) para um padrão *não-dipper* e ao fim de 4 dias reverteu completamente para um padrão *dipper*. Assim, concluíram que o trabalho noturno altera o ritmo diurno normal da PA em pacientes com hipertensão (65);
- Foi feita a monitorização ambulatória da pressão arterial de 24h (MAPA) em 50 enfermeiros de unidade de terapia intensiva (25 que fazem o turno da noite e 25 que fazem o turno do dia) durante 7 dias. Verificou-se que a PAS e PAD médias durante o tempo de sono foram superiores nos enfermeiros que faziam os turnos da noite (PAS: 118 mmHg vs 112 mmHg e PAD: 62 mm Hg vs 59 mm Hg). Concluiu-se que o trabalho noturno perturba os ritmos circadianos do sono, conduzindo ao *stress* mental que pode constituir um fator de risco direto para as DCV (66);
- Fujino *et al.* (2006) mostraram, através de um estudo prospetivo, que trabalhadores japoneses do sexo masculino em turnos rotativos revelaram um risco de morte por doença isquémica 2,32 vezes superior ao dos trabalhadores diurnos ou noturnos (67);
- Morris *et al.* (2017) demonstraram, através de um estudo altamente controlado em indivíduos saudáveis, que o desalinhamento circadiano observado em trabalhadores por turnos, aumenta não só a PA como também marcadores de inflamação, tais como a proteína C Reativa (PCR) (68).

5.1.2. Jet lag social

O *jet lag* social pode ser definido como a diferença entre o tempo de sono no trabalho e nos dias livres e tem vindo a tornar-se cada vez mais prevalente em adolescentes e jovens adultos. Caracteriza-se por fadiga, dores de cabeça, ritmos de sono perturbados e/ou insónia, estado de alerta e capacidade de realizar tarefas cognitivas reduzidos (63,69). Alguns estudos indicam que o *jet lag* está associado a distúrbios da FC e ao aumento do RCV, como consequência da diminuição dos níveis de HDL, aumento dos níveis de triglicéridos e diminuição da sensibilidade à insulina (30).

5.1.3. Atividades noturnas

A luz artificial e a tecnologia de que dispomos atualmente (televisão, computadores e *smartphones*) interrompe a integridade dos ritmos circadianos internos e perturba a organização temporal da fisiologia e do comportamento (5,21). A luz artificial mudou a nossa percepção da transição do dia para a noite e diluiu drasticamente a diferença entre as duas fases (4). De facto, a exposição das pessoas à luz durante a noite dessincroniza os relógios intrínsecos, com consequente supressão da produção de melatonina e alteração do ritmo de sono/vigília e jejum/alimentação. Alguns estudos mostram que a luz de comprimento de onda curto (luz azul e luz de díodo emissor de luz (LED)) é um dessincronizador bastante forte estando associado ao síndrome metabólico, distúrbios psiquiátricos, sonolência e redução da qualidade de vida, especialmente para determinados cronotipos (propensão para estar ativo, inativo ou adormecido num horário específico durante um ciclo de 24 horas) (22).

5.1.4. Distúrbios do sono

A maioria da população mundial não atinge as 7-8h diárias de sono recomendadas, seja por insónia ou outros distúrbios do sono, apresentando risco aumentado de desenvolver DCV (22). Muitas vezes, o défice de sono ou a fadiga estão associados ao consumo de cafeína. De facto, Oike *et al.* (2011) demonstraram que a cafeína (componente psicoativo que pode temporariamente afastar a sonolência, aliviar a fadiga e reduzir a ansiedade), quando consumida de modo crónico, fortalece o período de atividade locomotora mas alonga os ritmos circadianos em linhagens de células de mamíferos cultivadas (*in vitro*) e em explantes de fígado de ratinhos (*in vivo* e *ex vivo*), em condições de luz/escuridão constantes (70). Contudo, segundo Crnko *et al.*, há estudos que demonstram que os consumidores de chá e cafeína são menos propensos a desenvolver um acidente vascular cerebral (AVC) ou enfarte agudo do miocárdio (EAM) (36).

A importância dos fatores ambientais foi comprovada por estudos realizados em unidades de terapia intensiva. Por exemplo, num estudo que envolveu 568 doentes, após EAM e com idade média de 62 anos, Beauchemin *et al.* (1998) demonstraram haver uma associação entre as condições de iluminação do quarto numa unidade de terapia intensiva cardíaca e a mortalidade (71). A duração média da estadia nos quartos foi de 2,46 dias (2,3 nos quartos mais expostos à luz solar e 2,6 nos menos expostos). Concluíram que a mortalidade foi mais elevada nos quartos menos expostos à luz solar em ambos os sexos e os doentes tratados nos quartos mais iluminados obtiveram melhores resultados. Oyama *et al.* (2017) verificaram que a luz brilhante parece influenciar de forma positiva a expressão do microRNA circadiano após um EAM (72).

A figura 8 resume, de modo esquemático, a relação dos fatores que foram anteriormente apontados como possíveis disruptores dos ritmos circadianos com os processos fisiopatológicos que conduzem ao aumento do RCV.

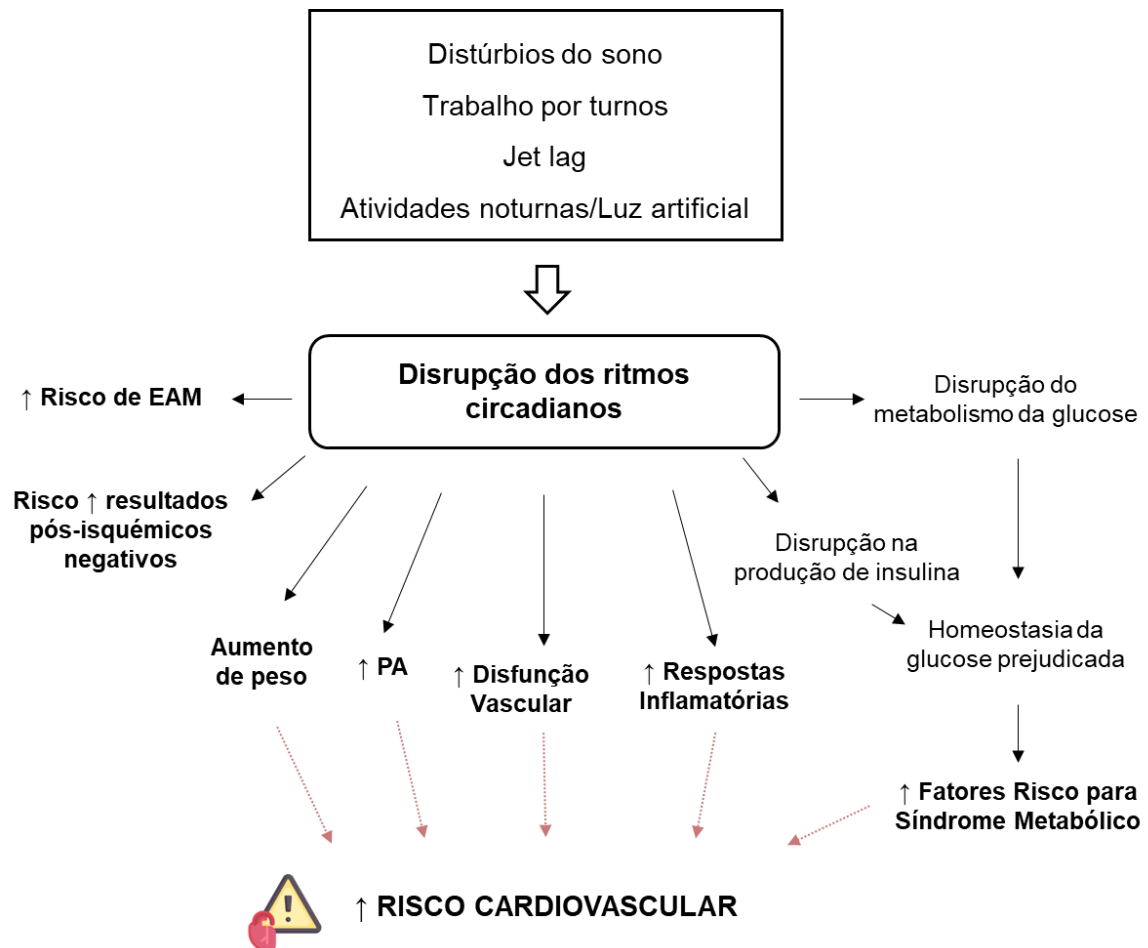


Figura 8 - Relação entre a disrupção circadiana e os fatores de risco cardiovasculares (adaptado de (21))

Apesar das várias evidências que sugerem que os fatores ambientais ao interromperem os ritmos fisiológicos podem contribuir para eventos cardiovasculares e aumentar outros fatores de risco comumente associados às DCV, o efeito que a dessincronização circadiana crônica exerce sobre os fatores de risco cardiovasculares ainda requer mais estudos.

5.2. Fatores Genéticos

As patologias cardiovasculares podem também ser induzidas por fatores genéticos relacionados com os relógios biológicos (desacoplamento entre os relógios do NSQ, resultante do envelhecimento, e/ou entre os relógios centrais e periféricos; alterações funcionais dos genes relógio) que resultam em rutura circadiana e por fatores relacionados com a supressão noturna de melatonina ou perda da ritmicidade do cortisol (cronodisruptores) (5). Os estudos mais

recentes que têm sido realizados para compreender o impacto da organização temporal dos processos biológicos circadianos na fisiopatologia cardiovascular, sustentam a ideia de que os ritmos circadianos modulam não só as funções fisiológicas cardiovasculares como também a incidência, desenvolvimento e desfecho das DCV. Estes estudos assentam, essencialmente, em análises epidemiológicas em humanos (observacionais e intervencionais) e estudos experimentais em modelos animais geneticamente modificados (8,15,27). Apesar de ambas as categorias de estudos contribuírem para a compreensão do impacto dos ritmos circadianos na fisiopatologia cardiovascular, a maior parte do conhecimento que existe provém de estudos realizados em modelos animais com interrupção do ritmo circadiano (modificação genética/disfunção completa do relógio molecular ou dessincronização dos estímulos externos com o relógio biológico intrínseco) (20,22). A maioria dos estudos realizados em humanos até ao momento foi meramente observacional. Na verdade, nos humanos, o mecanismo do relógio molecular é bastante preservado e as mutações genéticas, passíveis de serem induzidas em modelos animais, raramente se verificam (22).

A tabela 3 sintetiza as principais conclusões retiradas dos estudos experimentais mais relevantes realizados em modelos de ratos geneticamente modificados. Nestes estudos, a mutação ou deleção de alguns genes relógio fornece evidências genéticas que reforçam a relação entre a ritmicidade circadiana e a disfunção, remodelação e lesão vascular (31,36). Além disso, permitem compreender o papel que estes genes desempenham na regulação de diferentes variáveis fisiológicas cardíacas e o impacto que podem ter no desenvolvimento de fatores de risco cardiovasculares e/ou patologia cardiovascular.

Tabela 3 - Estudos experimentais em modelos de ratinhos geneticamente modificados

Genótipo	Fenótipo	Referência
Mutantes com deleção do gene <i>BMAL1</i>	Ritmo circadiano da PA e FC afetados PA reduzida devido a alterações da vasculatura (redução da produção de catecolaminas plasmáticas)	(73)
	Cardiomiopatia dilatada associada à idade (redução da espessura das paredes do miocárdio, dilatação do ventrículo esquerdo e redução da função sistólica)	(74)
	Metabolismo cardíaco interrompido e função contrátil comprometida	(75)
	Aumento dos níveis de fibrinogênio, FVW e PAI-1 ⇒ Risco de Trombose	(76)
	Estado de hipercoagulabilidade; Aumento da trombogenicidade arterial e venosa	(77)
Mutantes com deleção do gene <i>CLOCK</i>	Perda renal de sódio e hipotensão	(78)
Mutantes com deleção dos genes <i>CRY1/2</i>	Hipertensão; Redução da vasoconstrição mediada por catecolaminas; Aumento da aterosclerose	(79)
	Hipertensão sensível ao sal (níveis plasmáticos de aldosterona anormalmente elevados) Aumento da sensibilidade barorreflexa	(80)
	Elevação constante de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, TNF- α , óxido nítrico sintase induzível)	(81)
Mutantes com deleção do gene <i>PER1</i>	Hipertensão não- <i>dipper</i> apenas em ratinhos machos	(82)
	Perda renal de sódio, com redução da PA	(83)
Mutantes <i>PER2</i> (perda funcional do gene)	Diminuição discreta da PAD, ligeira elevação da FC e redução do padrão <i>dipper</i> ao longo de 24h	(84)
	Disfunção endotelial: - Diminuição da produção de prostaglandinas e NO ⇒ Respostas vasodilatadoras dependentes do endotélio afetadas - Aumento da resposta vasoconstritora mediada pela COX-1 ⇒ Aumento do risco de hipertensão	(85)
Mutantes com deleção dos fatores PAR bZIP (DBP, HLF, TEF)	Cardiomiopatia; Hipertrofia cardíaca; Disfunção ventricular esquerda	(86)

Genótipo	Fenótipo	Referência
Mutantes <i>BMAL1</i> e <i>CLOCK</i>	Remodelação vascular patológica; Lesão vascular; Disfunção endotelial	(87)
Mutantes <i>CK1ε</i> (mutantes <i>tau</i>)	Estudo simultâneo de alterações ambientais e do ritmo genético. Em ratinhos com mutação na <i>CK1ε</i> , o período do ritmo genético alterou para 22h. A viver em ambiente de 24h desenvolveram cardiomiopatia, fibrose cardíaca extensa e a contratilidade cardíaca foi afetada. Quando foram mantidos num ambiente com ciclo de 22h consistente com o seu mecanismo circadiano interno, restaurou-se a sincronia e não desenvolveram disfunção cardíaca.	(88)
Mutantes <i>REV-ERBα</i>	Aumento dos níveis séricos de colesterol, TAG, ácidos gordos livres	(89)
Ratinhos com interrupção do ritmo circadiano (não específico de tecido)	Sinais de aterosclerose (redução do diâmetro luminal e aumento da parede do vaso)	(90)
Mutantes <i>Bmal1</i> específicos de cardiomiócitos (deleção genética)	Nestes mutantes, a ritmicidade circadiana foi interrompida apenas nos cardiomiócitos e verificou-se: - Sobreexpressão da proteína <i>CLOCK</i> mutante sob o promotor da cadeia pesada da miosina; - FC inferior (bradicardia) comparativamente aos ratinhos <i>wild-type</i> ; - Tolerância diminuída à lesão de isquemia-reperfusão (I/R); - Cardiomiopatia dilatada grave com redução da esperança média de vida.	(91)
Mutantes <i>CLOCK</i> específicos de cardiomiócitos	Tolerância diminuída à lesão de I/R miocárdica; Os ritmos na lesão/disfunção miocárdica induzida por I/R estão em fase com os ritmos estabelecidos no início do EAM.	(92)
Mutantes <i>BMAL1</i> específicos de células endoteliais e do músculo liso*	Redução do ritmo circadiano da PAM e decréscimo da amplitude da mesma * Os efeitos provocados pela deficiência do gene <i>BMAL1</i> dependem do tipo de célula cardíaca. A ritmicidade da PA não é afetada pela deleção do gene <i>BMAL1</i> em cardiomiócitos ao contrário das células musculares lisas e endoteliais	(93)

Da análise da tabela é possível concluir que, o gene *BMALI* participa na regulação da PA e da FC e na manutenção da integridade estrutural e funcional do músculo cardíaco. O gene *CLOCK*, ao ser deletado, conduz à perda renal de sódio com consequente hipotensão, o que realça o papel deste gene na regulação da PA. Ambos os genes *BMALI* e *CLOCK* são importantes na regulação da função vascular. Os genes *CRY* mostraram promover a aterosclerose e ser importantes na regulação da PA. À semelhança dos genes *BMALI* e *CLOCK*, também o gene *PER1* demonstrou participar na regulação da PA. A mutação funcional do gene *PER2* mostrou que este gene participa na regulação da PA e da FC e na regulação da função vascular.

A deleção dos três principais fatores de transcrição (DBP, HLF, TEF), associados ao mecanismo do relógio molecular, permitiu concluir que estão diretamente implicados na manutenção da integridade do músculo cardíaco.

Os estudos permitem ainda concluir que os genes *BMALI*, *CLOCK*, *CRY*, *PER* e *REV-ERB* estão implicados na regulação do processo fisiopatológico da aterosclerose.

A mutação da CK1 ϵ demonstrou que, tanto a interrupção dos ritmos como a dessincronização dos relógios externos, centrais e periféricos podem conduzir ao desenvolvimento de patologias cardiovasculares e que a dessincronia entre os relógios central e periféricos exacerba a disfunção cardíaca.

5.3. Patologias Cardiovasculares: variação circadiana e genes relógio

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), as DCV são a principal causa de morte no mundo, sendo responsáveis por cerca de 17,9 milhões de mortes por ano. Nos países desenvolvidos são consideradas a causa primária de morte (29). A elevada prevalência, tanto a nível mundial como nacional, e o seu carácter crónico faz delas umas das principais causas de morbidade e invalidez, traduzindo-se na perda precoce de anos de vida e na redução da qualidade de vida.

A ritmicidade diária é importante para a manutenção de um sistema cardiovascular saudável, mas, tal como explicado no ponto anterior, também cria uma janela de vulnerabilidade para as patologias cardiovasculares (94). Há três décadas atrás, admitia-se que os eventos cardiovasculares adversos ocorriam de modo aleatório. Hoje, sabe-se que a maior parte dos eventos cardiovasculares agudos não só não ocorrem aleatoriamente como apresentam um padrão de ritmicidade circadiana, revelando um pico nas primeiras horas da manhã, na transição da fase de sono para a de vigília (4,8,18,28,29). De facto, a incidência de eventos cardiovasculares como a morte cardíaca súbita, o EAM e as arritmias ventriculares foram aproximadamente 40% mais frequentes entre as 6h e as 12h, comparativamente ao resto do dia (12,94). Na tabela 4 encontram-se alguns dos principais eventos cardiovasculares que apresentam ritmicidade circadiana, relacionados com a fase do dia mais provável para ocorrerem (2,17,27).

Tabela 4 - Fase do dia mais comum para o início dos eventos cardiovasculares adversos (adaptado de (47))

Evento Cardiovascular Adverso	Fase do dia
Morte Cardíaca Súbita	Início da manhã
Enfarte Agudo do Miocárdio	
Acidente Vascular Cerebral	Manhã
Taquicardia/Fibrilhação Ventricular	
Hemorragia subaracnóidea	Período Diurno (sem fase preferencial)
Fibrilhação Auricular	Manhã/Noite

A semelhança dos padrões temporais de diferentes eventos cardiovasculares e cerebrovasculares agudos parece sugerir a possibilidade de que compartilhem mecanismos fisiopatológicos comuns (95). Na verdade, a maior parte destes eventos

coincide com alterações fisiopatológicas que ocorrem no mesmo período: aumento matinal da PA (o que aumenta a presença de placas vulneráveis nas artérias, mais propensas à rotura) e da FC, da produção plaquetária e de fatores pró-trombóticos; o declínio da função vascular endotelial/diminuição da capacidade vasodilatadora (2,32,36,49,54). Durante o período noturno, pelo contrário, a incidência de eventos CDV é menor, visto que além do tônus vascular e da coagulabilidade sanguínea serem mais reduzidas, são também acompanhadas por uma redução da FC, da PA e da morte celular (figura 9).

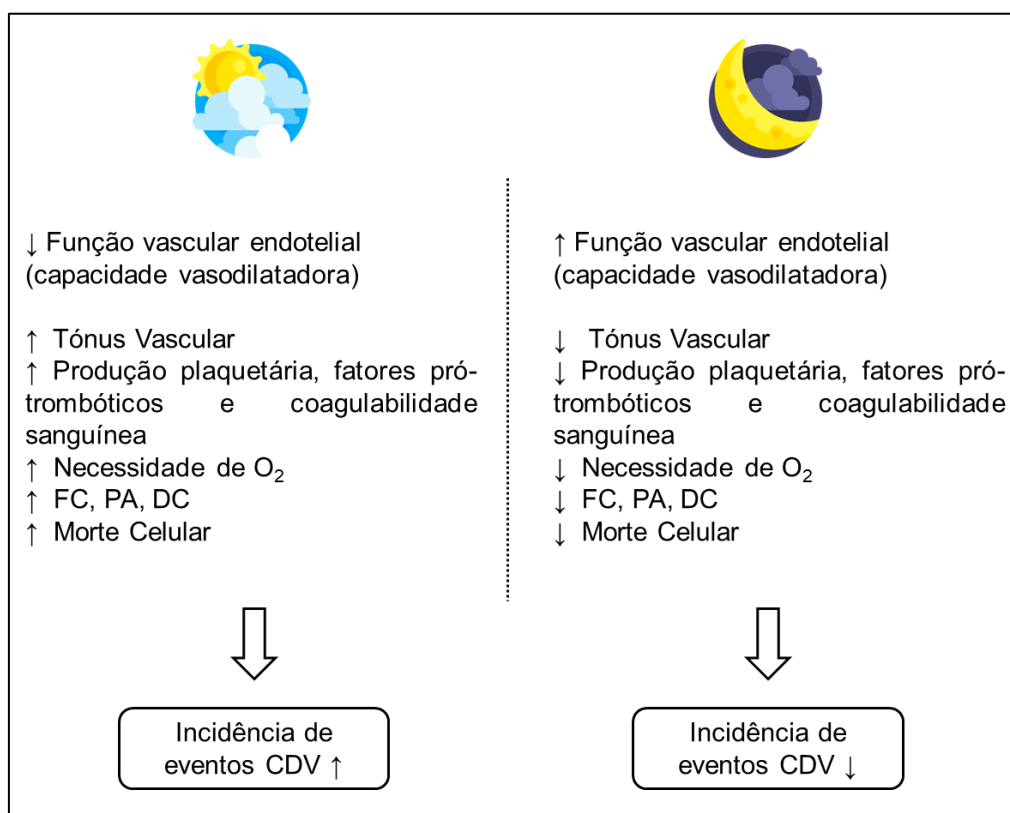


Figura 9 - Fisiopatologia associada à ritmicidade circadiana dos eventos CDV
(adaptado de (18))

Ainda assim, é importante ressaltar que os padrões circadianos das DCV podem apresentar diferenças em função do sexo, idade, etnia e condições pré-existentes (21,22). Assim, ao contrário do que foi referido anteriormente, um estudo recente considera que na bacia do Mediterrâneo a incidência do EAM é superior entre o meio-dia e a meia-noite (29). Alguns fatores, tais como o número de horas de luz solar, a desigualdade na prevalência de fatores de risco cardiovascular e o hábito de descanso à tarde (a típica “sesta”), podem explicar a diferença observada (96).

Apesar das DCV incluírem um grande número de patologias, neste trabalho focamos apenas nas que apresentam maior relevância clínica: a Hipertensão Arterial (HTA) que constitui o principal fator de risco para as DCV, a Insuficiência Cardíaca (IC) e a Doença Cardíaca Isquêmica (DCI). De seguida, serão abordados alguns aspetos relevantes relacionados com o padrão de variação circadiana de cada uma delas, incluindo os genes relógio que, atualmente, se pensa terem um papel importante no seu desenvolvimento.

5.3.1. Hipertensão Arterial

Segundo o CDC (<https://www.cdc.gov/>), a HTA provoca mais de 10 milhões de mortes por ano em todo o mundo. Caracteriza-se por um aumento, silencioso e crónico da PA, envolvendo processos patológicos de remodelação vascular, inflamação e/ou aterosclerose que comprometem a perfusão de órgãos-alvo. É considerada o principal fator de risco evitável para morte prematura e incapacidade em todo o mundo (97).

Atualmente, o método mais robusto para o diagnóstico de HTA é a monitorização ambulatória da PA de 24 horas (MAPA). Ao fornecer um número elevado de leituras ao longo de 24h comparativamente às leituras isoladas em casa ou no consultório (sujeitas a viés), permite avaliar a variabilidade circadiana da PA e obter valores mais fiáveis (98,99). Este método tem permitido identificar a existência de quatro padrões de variação da PA nos pacientes: nos pacientes *dipper*, a PA reduz 10 a 20% em relação ao valor diurno devido à diminuição do tónus simpático e ao aumento da atividade vagal durante o sono; nos pacientes *não-dipper*, a redução da PA é inferior a 10%; nos pacientes *extreme dipper* a redução da PA é superior a 20% e em pacientes *reverse/inverse dipper* a PA não só não sofre redução relativamente ao valor diurno como pode apresentar valores mais elevados (55,62,98). A hipertensão *não-dipper* está associada à ativação do SRAA, disfunção endotelial, aumento do risco de insuficiência renal e de eventos cardiovasculares fatais e não fatais (AVC, EAM, IC) (32,47,62,100,101). Apesar do padrão de PA *reverse/inverse dipper* também contribuir para um mau prognóstico, a literatura disponível sobre as possíveis implicações clínicas ainda é relativamente escassa (46). Assim, podemos depreender que, além do aumento da PA matinal, a não redução da PA noturna também pode contribuir para o aumento do risco de desenvolvimento de DCV (91). A tabela 5 resume os principais genes relógio envolvidos na regulação da PA.

Tabela 5 - Genes relógio e regulação da pressão arterial (adaptado de (102))

Genes relógio	Órgãos Envolvidos	Efeitos na PA
<i>BMAL1</i>	Coração	Hipotensão
<i>CLOCK</i>		Hipotensão
<i>PER2</i>		Diminuição discreta da PAD Redução do padrão <i>dipper</i> ao longo de 24h
<i>PER1</i>	Rim	Hipotensão (perda renal de Na ⁺)
<i>CRY1/2</i>		Hipertensão sensível ao sal

5.3.2. Doença Cardíaca Isquémica

Segundo a OMS, a Doença Cardíaca Isquémica é responsável por 85% de todas as mortes provocadas por DCV. Numa situação de isquémia miocárdica, a perfusão sanguínea é insuficiente ocorrendo défice de oxigénio e nutrientes e a não remoção dos produtos metabólicos finais celulares (103). As manifestações clínicas da DCI compreendem a Angina de Peito (*Angina Pectoris*), o EAM (manifestação aguda) e a Morte Cardíaca Súbita. O EAM é uma doença cardíaca aguda que pode ser complicada por arritmias, choque ou IC (10). Os ritmos circadianos estão envolvidos em todos os aspetos do EAM, desde a patogénese e incidência, ao seu desfecho (20,22).

A aterosclerose, doença inflamatória crónica da parede vascular, é considerada a principal causa de DCV, nomeadamente da DCI. De facto, é um processo fisiopatológico comum a várias manifestações de DCV, tais como o EAM (8). Inicia-se com a disfunção endotelial e a regulação positiva de moléculas de adesão responsáveis pelo recrutamento de leucócitos para o endotélio inflamado, levando à formação de placas ateroscleróticas (104). Muitas das vias fisiopatológicas e das moléculas envolvidas nos processos que conduzem à aterosclerose (células endoteliais, hemostasia, metabolismo lipídico, função imune) são regulados por relógios circadianos (105). Estes são responsáveis por regular (figura 10):

- A produção diurna de citocinas e o recrutamento de leucócitos, incluindo os neutrófilos, células de vida curta que apresentam uma ótima adaptação aos ritmos circadianos dos mamíferos (106);
- Os mecanismos de homeostase lipídica que controlam o metabolismo do colesterol e dos triglicéridos (TAG) (8);

- Os padrões de oscilação circadianos nas moléculas que participam no processo hemostático: os fatores de pró-coagulação, tais como o fator de *von Willebrand* (FVW), fatores de agregação plaquetária (VII, VIII, IX, X), fatores anticoagulação (antitrombina), proteína C e o PAI-1 apresentam picos matinais (60). Estas moléculas estão envolvidas na trombose, responsável pela oclusão de um vaso sanguíneo. A própria aterosclerose pode contribuir para a trombose.

A interrupção dos padrões circadianos que controlam as células inflamatórias e a função plaquetária podem contribuir para a disfunção endotelial. A disfunção endotelial e o colesterol sérico elevado induzem a expressão de moléculas de membrana que, por sua vez, recrutam leucócitos (monócitos) e outras células inflamatórias (107). A disfunção endotelial associada à aterosclerose caracteriza-se, ainda, por reduções na síntese de NO durante o dia, o que leva ao aumento da vasoconstrição e da hipercoagulabilidade, potenciando o pico matinal de eventos aterotrombóticos, entre eles o EAM (52,108). De modo sucinto, a disrupção dos ritmos circadianos pode conduzir a processos de inflamação crônica, trombose e alterações do metabolismo lipídico responsáveis por aumentar a incidência de eventos aterotrombóticos, tal como esquematizado na figura 10 (19).

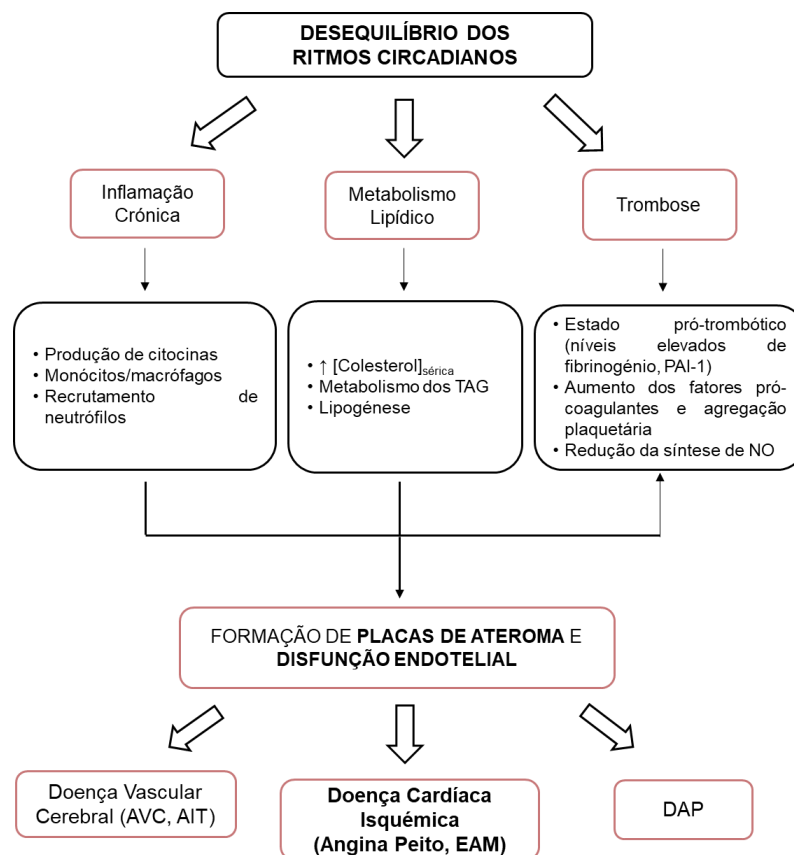
Muller *et al.* (1985) foram os primeiros a confirmar a suspeita de uma maior incidência do EAM durante a manhã (62), que chega a ser duas a três vezes superior face à noite (109). Este período matutino vulnerável parece dever-se não apenas a fatores comportamentais (alimentação, ciclo sono/vigília) mas também à regulação circadiana de variáveis como a PA, FC, SNS, hormonas vasoconstritoras, fatores pró-trombóticos (plaquetas, PAI-1), tónus vascular basal, agregação plaquetária, viscosidade sanguínea, hematócrito (55,61). A maior incidência de ocorrência do EAM durante a manhã pode ser explicada pelo (20):

- Aumento da PA e da FC sistólica, que exigem um maior aporte de oxigénio ao coração ao mesmo tempo que o tónus vascular da circulação coronária aumenta, levando a uma diminuição do fluxo sanguíneo coronário e do fornecimento de oxigénio (48);
- Aumento da viscosidade sanguínea, da agregação plaquetária e da ação insuficiente do sistema fibrinolítico, que criam um estado de hipercoagulabilidade relativa (formação de trombos e agregação plaquetária acentuada decorrente da adoção de

postura ereta) durante o período da manhã. O PAI-1 e outros marcadores de ativação da superfície plaquetária apresentam um padrão circadiano com níveis elevados pela manhã, coincidentes com o pico de hipercoagulabilidade matinal (47,48);

- Aumento da PA e do tónus vascular, que aumentam a probabilidade de rotura da placa de ateroma e a deposição de plaquetas na superfície vascular (2).

Assim, as variações circadianas do tónus dos vasos coronários e a função endotelial desempenham um papel crucial no desenvolvimento do EAM (29). De acordo com Schloss *et al.* (2016) os ritmos circadianos das células inflamatórias também parecem ter um papel importante no EAM, assim como os neutrófilos circulantes que migram para o miocárdio durante a manhã, desencadeando uma resposta inflamatória mais forte (110). Após o EAM, diferentes funções relacionadas com a remodelação cardíaca são também conhecidas por apresentarem variação circadiana (48). Apesar de ocorrer com mais frequência durante o período da manhã, o EAM também apresenta um segundo pico de ocorrência no final da noite (29).



Legenda:
 AIT - Acidente Isquémico Transitório
 DAP - Doença Arterial Periférica

Figura 10 - Desequilíbrio dos ritmos circadianos e aterosclerose (adaptado de (8))

Leibetseder *et al.* (2009) obtiveram amostras de miocárdio durante transplantes ortotópicos (método de transplante que envolve a remoção completa ou praticamente total do coração do recetor) de coração de 64 pacientes. Analisaram a expressão do mRNA dos genes relógio no coração humano e verificaram um pico de expressão do gene *BMAL1* à noite e dos genes *PER1* e *PER2* durante a manhã, o que coincide com a hora do dia mais frequente para a ocorrência do EAM (111). A interrupção de componentes positivos do mecanismo do relógio molecular (*BMAL* e *CLOCK*) em cardiomiócitos conduziu ao aumento do tamanho do enfarte em ratos e provocou morte cardíaca súbita enquanto a interrupção dos componentes negativos, *PER2* e *REV-ERB*, reduziu o seu tamanho (8,20,92). De facto, de acordo com um estudo realizado por Virag *et al.* (2010), a deleção funcional do gene *PER2* conduziu à redução da gravidade da lesão após enfarte: reduz os processos inflamatórios e a apoptose e promove a hipertrofia cardíaca, preservando assim a função cardíaca (112).

5.3.3. Insuficiência Cardíaca Crónica

De acordo com a *World Heart Federation* (<https://world-heart-federation.org/>), estima-se que, a nível mundial, 26 milhões de pessoas possuam IC crónica. Trata-se de uma síndrome clínica complexa que se traduz na incapacidade de o coração bombear sangue suficiente de modo a manter o fluxo sanguíneo necessário à manutenção das necessidades corporais, o que se traduz num maior risco de mortalidade e comprometimento da qualidade de vida (113). Caracteriza-se por respiração desordenada, hipóxia intermitente, intolerância ao exercício e tónus simpático cronicamente elevado. Em pacientes com ICC e FE reduzida, a PA deixa de apresentar variações circadianas. Já em pacientes com ICC e FE preservada, a PA é mais elevada durante o período do sono (114).

Apesar da pesquisa exaustiva, foram encontrados poucos estudos relativos aos genes relógio associados à ICC. Contudo, vale a pena referir dois deles que reforçam a importância dos genes *BMAL1* e dos genes *REV-ERBA/B* no desenvolvimento da ICC. Em ratos deficientes no gene *BMAL1* específico de cardiomiócitos, verificou-se IC com fração de ejeção reduzida, o que demonstrou o papel essencial deste gene na homeostase dos cardiomiócitos e no bombeamento cardíaco (27). De acordo com um estudo realizado por Song *et al.* (2022), a deleção dos genes *REV-ERBA/B* conduziu a cardiomiopatia dilatada e a IC letal em ratinhos (115).

6. Cronoterapia aplicada às patologias cardiovasculares

A cronoterapia, muitas vezes designada “medicina circadiana”, é a área do conhecimento que visa prevenir e tratar a doença contemplando não só os aspetos fisiopatológicos da mesma como também os princípios da cronobiologia (3,36,116,117). Tem como principais objetivos:

- Restaurar a sincronização do relógio mestre e dos relógios periféricos com o ambiente, de forma a garantir a homeostasia circadiana (3);
- Otimizar as estratégias terapêuticas respeitando a ritmicidade do relógio biológico (101).

A cronoterapia começou a ser utilizada na prática clínica no início da década de 1960, quando foi introduzido o regime alternado de corticosteróides orais durante a manhã (62). Na figura 11 encontram-se sistematizados os dois principais tipos de abordagens cronoterapêuticas atuais, que podem ser utilizadas de modo complementar (92):

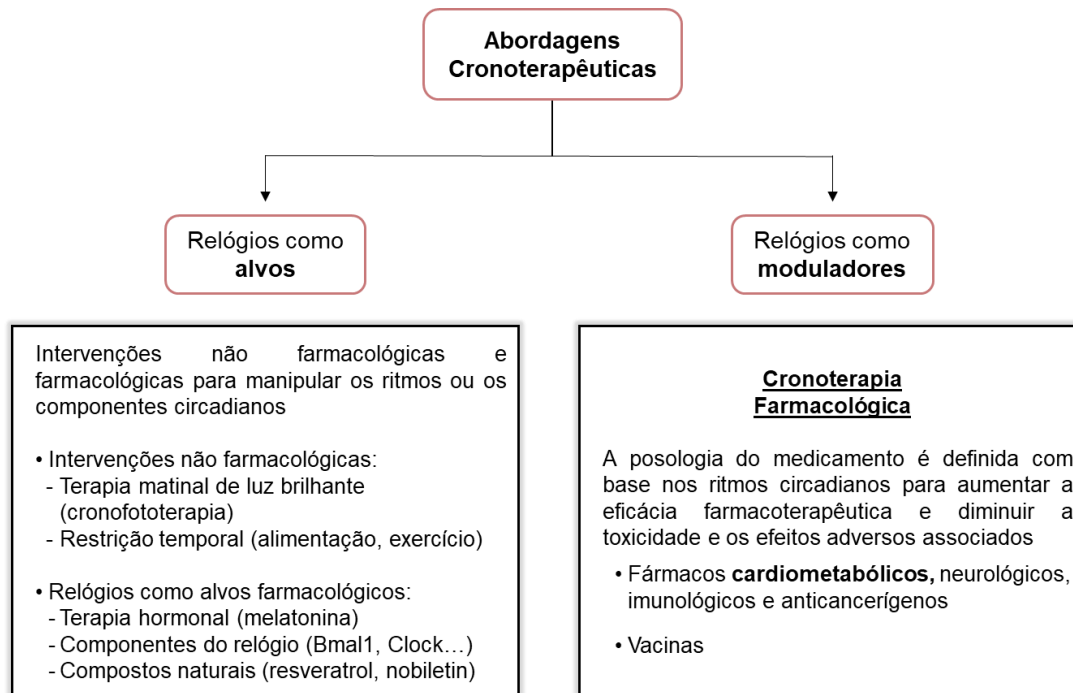


Figura 11 - Abordagens cronoterapêuticas (adaptado de (118))

Apesar da importância das estratégias terapêuticas não farmacológicas (por exemplo, a cronofototerapia, praticamente isenta de efeitos adversos e com elevado

grau de *compliance*) no restauro da sincronização dos ritmos circadianos (3), focamos essencialmente nas abordagens farmacológicas aplicadas às patologias cardiovasculares.

A cronoterapia farmacológica visa a administração de um medicamento na hora do dia em que é provável que tenha o efeito ideal/ótimo, de modo a maximizar a eficácia terapêutica mas também minimizar efeitos adversos e toxicidade associados (13,18,36,116,119). Pode dizer-se que visa melhorar o momento da administração de medicamentos, ao sincronizar a sua administração com os ritmos circadianos que influenciam as patologias, o metabolismo dos fármacos e as interações destes com os seus alvos (120,121). Alguns estudos do transcriptoma (conjunto completo de transcritos de RNA expressos na célula num determinado momento) circadiano mostram que vários recetores farmacológicos se expressam ritmicamente em diferentes tipos de tecidos (122). Esta descoberta sugere que o tempo é importante para a eficácia dos medicamentos (123). De facto, os ritmos circadianos não só afetam a saúde, como também a eficácia dos medicamentos e visto que uma grande parte dos fármacos é administrada independentemente do horário ótimo para a sua administração, a cronoterapia farmacológica constitui uma importante estratégia para minimizar esta situação (48,118).

Ainda assim, a ritmicidade circadiana do recetor é insuficiente para determinar o período ideal de administração. Com base em estudos em modelos de ratinho, foi possível concluir que um fármaco administrado na mesma dose, poderia ser letal quando administrado num horário e não o ser noutra (124). Hoje sabe-se que a toxicidade dependente do tempo e/ou eficácia dos medicamentos podem refletir a variabilidade circadiana presente nos processos farmacocinéticos (absorção, distribuição, metabolismo e excreção) e farmacodinâmicos (afinidade e especificidade para ligação ao recetor alvo; sinalização intracelular a jusante) dos fármacos (117,125). Por este motivo, um mesmo medicamento administrado em condições idênticas, pode não apresentar o mesmo perfil farmacocinético e farmacodinâmico quando administrado em diferentes horários do dia, reduzindo a sua eficácia e piorando a sua relação risco-benefício, devido ao aumento dos efeitos adversos (20). É ainda importante destacar que alguns fármacos apresentam propriedades farmacológicas que os tornam mais *clockable* (i.e., responsivo aos ritmos circadianos): por exemplo, pensa-

se que fármacos lipofílicos, devido à rápida distribuição intracelular, apresentam maior dependência da fase circadiana (126).

Com a crescente compreensão da importância do ritmo circadiano no desenvolvimento de determinadas patologias, além das características do paciente (idade, sexo e comorbilidades) comumente tidas em conta para o sucesso da terapia, também o tempo não deverá ser esquecido (18,22). Além das patologias cardiovasculares, inúmeras evidências recentes mostram que outras patologias, cujo risco e/ou intensidade dos sintomas varia previsivelmente ao longo do tempo (asma, alergias, epilepsia, neoplasias) também beneficiam da cronoterapia (2,127). Algumas farmacêuticas, em ensaios clínicos de fase III, testam a cronoterapia comparativamente às terapias convencionais, e têm revelado melhorias significativas ao nível da tolerabilidade e eficácia dos fármacos (116).

O conhecimento mais aprofundado acerca do funcionamento dos ritmos circadianos e o reconhecimento da importância que os genes relógio desempenham ao nível da fisiologia e fisiopatologia cardiovascular, renovou o interesse científico pela cronobiologia, e tem vindo a permitir direcionar o conhecimento dos ritmos circadianos para a prevenção e tratamento das DCV, com a identificação de alvos terapêuticos capazes de reduzir o RCV (36,55). Uma vez que muitos fatores de risco cardiovascular e determinados eventos cardiovasculares agudos ocorrem em horas específicas do dia, estes constituem janelas de oportunidade diárias para alinhar os tratamentos com os sintomas da doença, e assim, diminuir os riscos no momento do dia em que são mais altos - cronoprevenção - ou restaurar a fase e/ou amplitude circadiana aos valores normais (13,22,62). Apesar de ainda hoje não se saber se os ritmos circadianos são a causa das DCV ou apenas aumentam a sua suscetibilidade, com base nas evidências atualmente disponíveis, é importante ter em conta a sua influência no tratamento das DCV (51). Os efeitos dependentes do tempo devem também ser investigados durante o desenvolvimento de novos medicamentos para as DCV (48).

A cronoterapia aplicada às patologias do foro cardiovascular deve não só considerar a correção dos sintomas e/ou lesões orgânicas, como também a restauração/ressincronização do ritmo circadiano (8,36). Vários estudos apoiam a aplicação da cronoterapia às DCV pelo facto de limitar a patogénese e melhorar o tratamento após a ocorrência de eventos cardiovasculares agudos (117). Interferindo nas características farmacodinâmicas e farmacocinéticas de uma substância específica, a

cronoterapia facilita a proteção hemodinâmica e estrutural e reduz os efeitos adversos (128). Segundo Kuehn *et al.* (2016), otimizar o tempo de medicamentos cardiovasculares com base nos padrões cardiovasculares circadianos pode aumentar a sua eficácia (121). Na verdade, se devidamente confirmada em ensaios cronoterapêuticos em populações com DCV, a aplicação da cronoterapia no tratamento da hipertensão e outras patologias cardiovasculares tem potencial para oferecer uma nova abordagem terapêutica (101,129). Visto que quase metade de todos os genes codificadores de proteínas apresenta padrões de expressão controlados por ritmos circadianos, têm vindo a ser desenvolvidos fármacos para o tratamento da HTA e da IC que têm como alvo, GCR (121).

6.1. Hipertensão Arterial

Alguns estudos defendem que a administração noturna de fármacos anti-hipertensores (independentemente da classe) melhora os perfis gerais de PA e é mais eficaz do que a administração diurna, já que a PA diminui durante a noite, assim como a excreção de sódio (8,55,120). Além disso, a medicação anti-hipertensora tomada ao deitar também ajuda a prevenir a hipertensão noturna prejudicial ao coração (130). Visto que a remodelação de órgãos como o coração também ocorre à noite, a administração de fármacos anti-hipertensores neste período pode otimizar os efeitos e reduzir os danos nos órgãos (118,131). Ainda assim, tendo em conta que a maioria das patologias associadas à hipertensão apresenta incidência superior no início da manhã, muitos anti-hipertensores de toma única diária são tomados logo ao início da manhã. Deste modo, os níveis plasmáticos dos fármacos são mais altos durante o dia, quando os efeitos adversos são mais sentidos (hipotensão ortostática), e mais baixos no início da manhã, quando o efeito terapêutico é mais necessário (22).

Já na década de 1970, Bartter *et al.* reconheceram que o horário de administração de medicamentos poderia ser otimizado para o tratamento da hipertensão (31). Recentemente, Hermida *et al.* têm-se preocupado com o horário preferencial para a toma do anti-hipertensor e os seus trabalhos mostram que uma melhor regulação da PA de acordo com o horário de administração pode traduzir-se numa redução do risco de DCV e num melhor prognóstico em pacientes não-*dipper* (18,31). Num estudo MAPEC (monitorização ambulatória para previsão de eventos cardiovasculares) aleatorizado, com cerca de 2000 pacientes com hipertensão resistente, investigou-se o efeito do

tempo de administração da medicação anti-hipertensora. Demonstrou-se que a administração de pelo menos um anti-hipertensor à hora de dormir, comparativamente a todos os medicamentos anti-hipertensores administrados de manhã (independentemente da classe), reduziu o risco relativo de todos os eventos CDV e a mortalidade cardiovascular em mais de 60%, durante aproximadamente os 6 anos de acompanhamento. Foi ainda possível concluir que a dosagem noturna melhorou o controlo da PA (menor prevalência do padrão de PA não-*dipper* e PA ambulatória controlada) e diminuiu significativamente a ocorrência de desfechos cardiovasculares adversos, em comparação com a dosagem diurna (49,132). Ainda assim, os próprios autores reconhecem que a tipologia do estudo não permite a extrapolação dos resultados para a população em geral (101).

Mais recentemente, Hermida *et al.* (2020) seguiram, durante aproximadamente 6 anos, cerca de 19000 pacientes hipertensos de 40 unidades de saúde de proximidade. De acordo com os resultados do estudo, a ingestão da dose diária total de medicamentos para a hipertensão ao deitar em comparação com todos os anti-hipertensores administrados ao acordar, reduziu notavelmente o desfecho de DCV. A redução da PA média durante o sono e a redução da prevalência do padrão não-*dipper* parecem ser os principais fatores subjacentes à atenuação do risco de DCV (20,101,133). A toma de anti-hipertensores ao deitar parece ser uma estratégia terapêutica relevante, visto que a atenuação do SRAA ou do SNS pode conduzir à redução do DC, diminuição da RVP e aumento do fluxo sanguíneo periférico, resultando um padrão hemodinamicamente mais fisiológico, com redução da PA noturna (134).

Como veremos de seguida, vários estudos demonstram que a ingestão de anti-hipertensores (serão apenas mencionados aqueles cujos fármacos são comercializados em Portugal) ao deitar tem demonstrado maior eficácia cardiovascular em pacientes hipertensos, melhorando o perfil pressórico noturno (97,117,135).

6.1.1. Inibidores da Enzima de Conversão da Angiotensina (IECA)

Anti-hipertensores de longa duração de ação, nomeadamente os IECA, podem ajudar a reduzir o pico matinal de PA. Hermida *et al.* (2009,2011) mostraram que a administração de um IECA ao deitar conduz a uma PA noturna mais baixa do que a administração matinal e confirmaram ainda que uma redução na PA noturna melhora o resultado cardiovascular (136,137).

Apesar das evidências neste sentido, alguns estudos mostraram não haver benefício na administração noturna de um anti-hipertensor. Num estudo *crossover* aleatorizado envolvendo pacientes hipertensos, o efeito hipotensor da administração matinal vs administração noturna do Ramipril e do Imidapril foi semelhante (10,138,139).

6.1.2. Antagonistas dos Recetores de Angiotensina II (ARA)

Os ARA são bastante eficazes e bem tolerados por pacientes com HTA (10). A administração de Valsartan ao deitar, em oposição ao despertar, resultou no aumento de cerca de 6% na diferença entre a PA diurna e noturna e numa redução relativa de 73% no número de pacientes com padrão de hipertensão não-*dipper* (140,141). Demonstrou-se ainda que o Telmisartan, quando administrado ao deitar, auxiliou no declínio da PA durante o tempo de sono e na regulação da PA comparativamente à sua administração matinal e revelou ainda uma redução de 76% na prevalência do padrão de PA não-*dipper* (142).

6.1.3. Bloqueadores dos Canais de Cálcio (BCC)

A nifedipina, bloqueador dos canais de cálcio, também pode beneficiar da cronoterapia na redução da PA, ao promover a vasodilatação. Hermida *et al.* (2008,2009) demonstraram uma eficácia adicional na redução da PA noturna e no desenvolvimento de edema, na diminuição da prevalência do padrão de PA não-*dipper* e na redução do pico matinal de PA (143,144).

6.1.4. Ácido Acetilsalicílico

Alguns estudos prospetivos demonstram o efeito protetor do ácido acetilsalicílico (aspirina) quando administrado, em doses baixas (75 mg/dia), ao deitar, em pacientes que sofrem de hipertensão. Num estudo prospetivo aleatorizado foi possível mostrar que, em doses baixas, a aspirina apresenta um efeito dependente do tempo na PA de pacientes hipertensos não tratados: ao deitar reduziu a PA, enquanto durante a manhã chegou a elevar ligeiramente os níveis de PA (145). O efeito hipotensor dependente do tempo da aspirina foi recentemente testado em ratinhos hipertensos não parecendo refletir, no entanto, um impacto direto nos relógios circadianos ou na acetilação da COX-1 (plaquetária) (146).

Um outro estudo mais recente, aleatorizado e controlado, num grupo de pacientes com HTA de alto risco, mostrou que em comparação com o uso matinal de doses baixas

de aspirina, a mesma dose administrada à noite resultou numa redução significativa da PA e melhoria do perfil diurno da mesma (147).

6.1.5. Melatonina

A melatonina desempenha um papel importante na regulação de vários parâmetros do sistema cardiovascular (ex: pressão arterial) e é considerada um “potencial” agente anti-hipertensor, dada a sua natureza antioxidante e dos seus metabolitos. Estes têm capacidade para reduzir a carga de radicais livres das espécies reativas de oxigénio e azoto. A sua ação lipofílica permite que estes atravessem a membrana celular e possam estender a ação protetora a todas as estruturas subcelulares (148). Em pessoas saudáveis, os níveis de melatonina são mais elevados durante a noite e representam uma importante adaptação, induzida pelo NSQ, ao período de descanso e atividade. Contudo, em pacientes com padrão de HTA não-*dipper*, verificou-se, através da medição da 6-sulfatoximelatonina na urina destes pacientes, um pico na libertação noturna de melatonina mais reduzido (149) e um menor rácio (noite/dia) ao nível da concentração sérica de melatonina (150). Borghi *et al.* (2017) demonstraram que os pacientes tratados com melatonina (2-5 mg/dia durante 7-90 dias) apresentaram uma redução da PAS e PAD noturnas (151).

6.2. Outras patologias cardiovasculares relevantes

No que diz respeito a eventos isquémicos, o uso de um bloqueador beta (BB) de libertação prolongada (ex: Propranolol) à noite pode reduzir a vulnerabilidade para estes eventos durante a manhã (20). Algumas abordagens usadas em cronoterapia procuram sincronizar o direcionamento de populações de células inflamatórias com os seus padrões circadianos. Por exemplo, após o EAM, a utilização de um BB como o Metoprolol reduz a dimensão do enfarte ao interferir no recrutamento de neutrófilos e nas interações destes e das plaquetas (152).

Na medicina atual, o uso de antiplaquetários, tais como a aspirina, é essencial para a prevenção de eventos cardiovasculares, como o EAM. A aspirina apresenta efeitos anti-inflamatórios, antiplaquetários e antitrombóticos e, sendo inibidora da agregação plaquetária, atua na prevenção secundária da trombose arterial (59). Quando administrada à noite em doses baixas, pode diminuir o pico matinal de reatividade plaquetária (via COX-1) e reduzir a PA, em voluntários saudáveis. Estes efeitos podem

ser aproveitados para uma maior redução do RCV durante o pico da manhã, nomeadamente, no caso do EAM (8,36,153,154).

Tal como no caso dos anti-hipertensores, também a maior parte dos antitrombóticos são mais eficazes quando tomados ao deitar, visto que melhoram a inibição plaquetária durante as horas da manhã (59,153). Num ensaio clínico, a ingestão noturna do anticoagulante Rivaroxabano mostrou, relativamente à ingestão matinal, níveis mais baixos de trombina e menor probabilidade de eventos tromboembólicos durante o período da manhã (155).

Apesar dos mecanismos ainda não se encontrarem totalmente esclarecidos, alguns estudos demonstram a importância da melatonina, enquanto fármaco barato e bem tolerado, na terapêutica de várias DCV, além da HTA: lesão isquémia-reperfusão; aterosclerose; IC e lesão miocárdica induzida por fármacos (23).

Recentemente têm sido desenvolvidos fármacos direcionados aos recetores nucleares REV-ERB e ROR ou CRY que apresentam potenciais benefícios clínicos (156). Um estudo experimental recente demonstrou que o SR8278, um antagonista sintético do recetor heme nuclear REV-ERB, aumentou a tolerância à lesão de isquémia e reperfusão miocárdica no momento da transição do dormir para o acordar (157).

6.3. Limitações

Embora sejam crescentes as evidências de que a administração noturna de anti-hipertensores seja mais eficiente na redução da PA, existem ainda algumas inconsistências. Por exemplo, no ensaio realizado por Hermida *et al.* (2020), foram comparados os efeitos da administração noturna do tratamento na redução da PA com o RCV ao acordar numa coorte de grandes dimensões (cerca de 20 000 pacientes) (133). Embora os autores tenham afirmado que a ingestão rotineira de mais do que um medicamento reduz a PA e pode, efetivamente, resultar num melhor controlo da PA e diminuição da ocorrência de eventos cardiovasculares adversos, o estudo incluiu apenas pacientes de uma população, a redução da PA foi relativamente pequena, e não foi realizado nenhum estudo controlado aleatorizado (10,133,158). Num estudo envolvendo pacientes com patologias renais crónicas relacionadas com a HTA, Rahman *et al.* (2013) também não observaram diferenças na administração do tratamento anti-hipertensor na hora de dormir e da manhã no controlo da PA (10,159). Além disso, é importante ter em conta que grande parte da população hipertensa não pode ser

devidamente controlada exclusivamente com um único fármaco (133). Por exemplo, os resultados de um estudo que analisa a administração ao deitar da combinação de Valsartan/Amlodipina mostraram uma normalização do perfil circadiano da PA em direção ao padrão *dipper* (160).

Apesar das evidências de que a cronoterapia pode representar uma estratégia de baixo custo na redução do RCV, não é ainda amplamente recomendada no tratamento da HTA e de outras patologias cardiovasculares. De facto, são poucos os estudos multicêntricos, aleatorizados e controlados com eventos cardiovasculares e efeitos colaterais como desfechos e que permitam comparar a administração de anti-hipertensores durante a manhã e durante a noite e avaliar parâmetros tais como a morte por DCV (22,161). É necessária mais investigação e uma seleção cuidadosa dos doentes e dos anti-hipertensores de modo a avaliar o impacto definitivo da cronoterapia nas DCV.

A cronoterapia pode tornar-se, num futuro próximo, mais um pilar da medicina personalizada, ajustando o tratamento às necessidades específicas de cada indivíduo. No entanto, existem algumas barreiras que dificultam a sua aplicabilidade, nomeadamente, a existência de variação interindividual nos ritmos circadianos, que deve ser cada vez mais atendida na aplicação da cronoterapia (21).

7. Conclusões

No ser humano, os ritmos circadianos, gerados por um relógio biológico endógeno sincronizado pelo ciclo luz/escuridão, determinam muitas das respostas fisiológicas e comportamentais. Repetem-se diariamente de forma autossustentável, sincronizada e oscilatória, garantindo a periodicidade homeostática das suas funções.

A nível celular e molecular, a ritmicidade circadiana é o resultado de uma rede hierárquica de circuitos de retroalimentação transcricional/transducional (positivos e negativos) que trabalham cooperativamente para produzir os padrões circadianos dos genes relógio. O desenvolvimento do relógio circadiano inicia-se durante a formação das primeiras células do ser humano e, mais tarde, é essencial na regulação de várias funções fisiológicas, nomeadamente a função cardiovascular. Vários estudos (*in vitro* e *in vivo*) mostram que diferentes constituintes do tecido cardiovascular possuem relógios periféricos com ritmicidade circadiana.

À semelhança da maior parte das variáveis fisiológicas cardíacas que apresentam padrões únicos de atividade circadiana (por exemplo, os valores da PA e da FC são mais elevados durante o período de vigília do que durante o período de sono), também os eventos cardiovasculares adversos revelam padrões específicos de ritmicidade circadiana. Por exemplo, o EAM apresenta um pico nas primeiras horas da manhã, o que pode ser explicado por alterações fisiopatológicas que ocorrem nessa fase do dia (aumento matinal da PA e da FC, do tónus vascular, da produção plaquetária e da coagulabilidade sanguínea; diminuição da função vascular endotelial/capacidade vasodilatadora).

Alguns estudos observacionais e experimentais mostram como determinados fatores ambientais e genéticos, ao dessincronizarem o relógio biológico, podem conduzir ao aumento do risco cardiovascular e/ou ao desenvolvimento e progressão das patologias cardiovasculares. Apesar do novo foco na compreensão da relação entre os mecanismos subjacentes ao funcionamento do relógio circadiano e o aparecimento de patologias cardiovasculares, são necessários estudos adicionais capazes de estabelecer uma relação de causalidade mais robusta. Fatores como a idade, o sexo e a hora do dia devem ser tidos em conta nos estudos de interrupção do ritmo circadiano, a fim de produzir dados confiáveis, reproduzíveis, generalizáveis e clinicamente traduzíveis.

A hipertensão arterial é considerada o principal fator de risco para as DCV, sendo o padrão de hipertensão não-*dipper* aquele que está associado a um risco superior de desenvolvimento de eventos cardiovasculares fatais e não fatais. De acordo com estudos experimentais em modelos de ratinhos geneticamente modificados, verificou-se que os genes relógio *BMAL1*, *CLOCK*, *CRY1/2* e *PER1/2* estão relacionados com a regulação da PA e a sua disfunção com o desenvolvimento de hipertensão.

Os processos que conduzem à aterosclerose, principal causa de doença cardíaca isquêmica, são regulados por relógios circadianos, o que justifica a maior incidência do EAM no período da manhã, quando os genes *PER1* e *PER2* estão aumentados. Contudo, o gene *PER2*, ao reduzir a gravidade da lesão após enfarte, também possui uma função protetora. Apesar da escassez de estudos relacionados com o papel dos genes relógio na IC, estudos recentes demonstraram o papel dos genes *REV-ERBA/B* no desenvolvimento de cardiomiopatia dilatada e IC letal.

A cronoterapia farmacológica visa conciliar aspectos fisiopatológicos com os princípios da cronobiologia. Para tal, preconiza a administração de um medicamento na hora do dia em que é provável que tenha o efeito ótimo, de modo a maximizar a eficácia terapêutica e/ou minimizar efeitos adversos e toxicidade associadas. Contudo, a relevância clínica e os contributos da cronoterapia na farmacoterapia cardiovascular ainda não se encontram totalmente esclarecidos. No futuro, a descoberta de novos genes associados às patologias cardiovasculares com ritmicidade circadiana, abrirá novas oportunidades terapêuticas e/ou permitirá a utilização desses genes como marcadores de diagnóstico.

8. Referências Bibliográficas

1. Bailey AM, Demas GE, Kriegsfeld LJ. Biological Rhythms. In: Reference Module in Biomedical Sciences. Elsevier; 2014. p. 1–6. doi: 10.1016/b978-0-12-801238-3.03794-6
2. Hernandez Fernandes E, Coelho D, Missel Correa JR, Kumpinski D. Alteraciones circadianas del sistema cardiovascular. *Rev Esp Cardiol.* 2000 Nov;53(1). doi: 10.1016/S0300-8932(00)75068-8
3. Chowdhury D, Wang C, Lu AP, Zhu HL. Understanding Quantitative Circadian Regulations Are Crucial Towards Advancing Chronotherapy. *Cells.* 2019 Aug 13;8(8):883. doi: 10.3390/cells8080883
4. Pilonis V, Helfrich-Förster C, Oster H. The role of the circadian clock system in physiology. *European Journal of Physiology.* 2018 Feb;470(2):227–39. doi: 10.1007/s00424-017-2103-y
5. Švorc P. Chronobiology - The Science of Biological Time Structure. In *IntechOpen*; 2019. p. 1–9. doi: 10.5772/intechopen.88583
6. Çalıyurt O. Role of Chronobiology as a Transdisciplinary Field of Research: Its Applications in Treating Mood Disorders. *Balkan Med J.* 2017 Dec;34(6):514–21. doi: 10.4274/balkanmedj.2017.1280
7. Lamont EW, Amir S. Circadian and Ultradian Clocks/Rhythms. In: della Sala S, editor. *Encyclopedia of Behavioral Neuroscience.* 2nd ed. Elsevier Science Ltd.; 2017. p. 746–51. doi: 10.1016/B978-0-12-809324-5.00283-2
8. Peñaloza-Martínez E, Moreno G, Aroca-Crevillén A, Huertas S, Vicent L, Rosillo N, et al. Circadian rhythms in thrombosis and atherothrombotic events. *Frontiers in Bioscience-Landmark.* 2022 Feb;27(2):51. doi: 10.31083/j.fbl2702051
9. Rana S, Mahmood S. Circadian rhythm and its role in malignancy. *J Circadian Rhythms.* 2010 Mar;8(3). doi: 10.1186/1740-3391-8-3

10. Zhang J, Sun R, Jiang T, Yang G, Chen L. Circadian blood pressure rhythm in cardiovascular and renal health and disease. *Biomolecules*. 2021 Jun;11(6):868. doi: 10.3390/biom11060868
11. Helfrich-Förster C, Albrecht U, Pilonis V, Zhao J, Chen L, Xie Y, et al. New Insights Into the Circadian Rhythm and Its Related Diseases. *Front Physiol*. 2019 Jun;10(682):1–19. doi: 10.3389/fphys.2019.00682
12. Syahira A, Azmi M, Juliana N, Azmani S, Effendy NM, Fahmy Abu I, et al. Cortisol on Circadian Rhythm and Its Effect on Cardiovascular System. *J Environ Res Public Health*. 2021 Jan;18(2):676. doi: 10.3390/ijerph17240000
13. Ayyar VS, Sukumaran S. Circadian rhythms: influence on physiology, pharmacology, and therapeutic interventions. *J Pharmacokinet Pharmacodyn*. 2021 Jun 1;48(3):321–38. doi: 10.1007/s10928-021-09751-2
14. Bonmati-Carrion MA, Arguelles-Prieto R, Jose Martinez-Madrid M, Reiter R, Hardeland R, Rol MA, et al. Protecting the Melatonin Rhythm through Circadian Healthy Light Exposure. *Int J Mol Sci*. 2014;15(12):23448–500. doi: 10.3390/ijms151223448
15. Rana, S., D. Prabhu, S., & Young, M. E. Chronobiological influence over cardiovascular function. The Good, the Bad, and the Ugly. *Circulation Research*. 2020 Jan 126(2), 258–279. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.119.313349>
16. Lima L, Vargas N. O Relógio Biológico e os ritmos circadianos de mamíferos: uma contextualização histórica. *Revista da Biologia*. 2014 Jul 30;12(2):1–7. doi: 10.7594/revbio.12.02.01
17. Soares AC, Fonseca DA. Cardiovascular diseases: a therapeutic perspective around the clock. Vol. 25, *Drug Discovery Today*. Elsevier Ltd; 2020. p. 1086–98. doi: 10.1016/j.drudis.2020.04.006

18. Rabinovich-Nikitin I, Lieberman B, Martino TA, Kirshenbaum LA. Circadian-Regulated Cell Death in Cardiovascular Diseases. *Circulation*. 2019 Feb;139(7):965–80. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.118.036550
19. Man A, Li H, Xia N. Circadian rhythm: Potential therapeutic target for atherosclerosis and thrombosis. *Int J Mol Sci*. 2021 Jan;22(2):676. doi: 10.3390/ijms22020676
20. Lecour S, du Pré BC, Bøtker HE, Brundel BJM, Daiber A, Davidson SM, et al. Circadian rhythms in ischaemic heart disease: key aspects for preclinical and translational research: position paper of the ESC working group on cellular biology of the heart. *Cardiovasc Res*. 2021 Sep;1–16. doi: 10.1093/cvr/cvab293
21. Meléndez-Fernández OH, Walton JC, de Vries AC, Nelson RJ. Clocks, rhythms, sex, and hearts: How disrupted circadian rhythms, time-of-day, and sex influence cardiovascular health. *Biomolecules*. 2021 Jun;11(6):883. doi: 10.3390/biom11060883
22. Crnko S, du Pré BC, Sluijter JPG, van Laake LW. Circadian rhythms and the molecular clock in cardiovascular biology and disease. *Nat Rev Cardiol*. 2019 Jul;16(7):437–47. doi: 10.1038/s41569-019-0167-4
23. Sun H, Gusdon AM, Qu S. Effects of melatonin on cardiovascular diseases: Progress in the past year. *Curr Opin Lipidol*. 2016 Aug;27(4):408–13. doi: 10.1097/MOL.0000000000000314
24. Tordjman S, Chokron S, Delorme R, Charrier A, Bellissant E, Jaafari N, et al. Melatonin: Pharmacology, Functions and Therapeutic Benefits. *Current Neuropharmacology* 2017 Apr;15(3):434–43. doi: 10.2174/1570159X14666161228122
25. Koch BCP, Nagtegaal JE, Kerkhof GA, ter Wee PM. Circadian sleep-wake rhythm disturbances in end-stage renal disease. *Nat Rev Nephrol*. 2009 Jul;5(7):407–16. doi: 10.1038/nrneph.2009.88

26. Virag J, Lust R. Circadian influences on myocardial infarction. *Front Physiol.* 2014 Oct;5(422). doi: 10.3389/fphys.2014.00422
27. Takeda N, Maemura K. The role of clock genes and circadian rhythm in the development of cardiovascular diseases. *Cellular and Molecular Life Sciences.* 2015 May 14;72(17):3225–34. doi: 10.1007/s00018-015-1923-1
28. Rijo-Ferreira F, Takahashi JS. Genomics of circadian rhythms in health and disease. *Genome Med.* 2019 Dec 17;11:1–16. doi: 10.1186/s13073-019-0704-0
29. Škrlec I, Marić S, Včev A. Myocardial Infarction and Circadian Rhythm. In: *Visions of Cardiomyocyte - Fundamental Concepts of Heart Life and Disease* . IntechOpen; 2019. p. 1–15. doi: 10.5772/intechopen.83393
30. Pourcet B, Duez H. Nuclear Receptors and Clock Components in Cardiovascular Diseases. *Int J Mol Sci.* 2021 Sep;22(18):9721. doi: 10.3390/ijms22189721
31. Douma LG, Gumz ML. Circadian clock-mediated regulation of blood pressure. Vol. 119, *Free Radical Biology and Medicine*. Elsevier Inc.; 2018. p. 108–14. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.11.024
32. Rahman A, Ul Hasan A, Nishiyama A, Kobori H. Molecular Sciences Altered Circadian Timing System-Mediated Non-Dipping Pattern of Blood Pressure and Associated Cardiovascular Disorders in Metabolic and Kidney Diseases. *Int J Mol Sci.* 2018 Jan;19(2):400. doi: 10.3390/ijms19020400
33. Du Pré BC, van Veen TAB, Young ME, Vos MA, Doevendans PA, van Laake LW. Circadian Rhythms in Cell Maturation. *Physiology.* 2014 Jan;29(1):72–83. doi: 10.1152/physiol.00036.2013
34. Mcnamara P, Seo S-B, Rudic RD, Sehgal A, Chakravarti D, Fitzgerald GA. Circulating concentrations of some steroids undergo. *Cell.* 2001 Jun;105(7):877–89. doi: 10.1016/s0092-8674(01)00401-9.

35. Davidson AJ, London B, Block GD, Menaker M. Cardiovascular tissues contain independent circadian clocks. *Clin Exp Hypertens*. 2005 Feb;27(2–3):307–11. doi: 10.1081/CEH-200048933
36. Crnko S, Cour M, van Laake LW, Lecour S. Vasculature on the clock: Circadian rhythm and vascular dysfunction. *Vascul Pharmacol*. 2018 Sep;108:1–7. doi: 10.1016/j.vph.2018.05.003
37. Schoenhard JA, Smith LH, Painter CA, Eren M, Johnson CH, Vaughan DE. Regulation of the PAI-1 promoter by circadian clock components: differential activation by BMAL1 and BMAL2. *J Mol Cell Cardiol*. 2003 May;35(5):473–81. doi: 10.1016/s0022-2828(03)00051-8.
38. Takeda N, Maemura K, Horie S, Oishi K, Imai Y, Harada T, et al. Thrombomodulin is a clock-controlled gene in vascular endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2007 Nov;282(45):32561–7. doi: 10.1074/jbc.M705692200.
39. Nonaka H, Emoto N, Ikeda K, Fukuya H, Mohammad, Rohman S, et al. Angiotensin II Induces Circadian Gene Expression of Clock Genes in Cultured Vascular Smooth Muscle Cells. *Circulation*. 2001 Oct;104(15):1746–8. doi: <https://doi.org/10.1161/hc4001.098048>
40. Chalmers JA, Martino TA, Tata N, Ralph MR, Sole MJ, Belsham DD. Vascular circadian rhythms in a mouse vascular smooth muscle cell line (Movas-1). *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2008 Nov;295(5):1529–38. doi: 10.1152/ajpregu.90572.2008
41. Balsalobre A, Damiola Francesca, Schibler U. A Serum Shock Induces Circadian Gene Expression in Mammalian Tissue Culture Cells. *Cell*. 1998 Jun;93(6):929–37. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81199-x
42. Yagita K, Okamura H. Forskolin induces circadian gene expression of rPer1, rPer2 and dbp in mammalian rat-1 fibroblasts. *FEBS Lett*. 2000 Dec;465(1):79–82. doi: 10.1016/s0014-5793(99)01724-x.

43. Welsh DK, Yoo S-H, Liu AC, Takahashi JS, Kay SA. Bioluminescence Imaging of Individual Fibroblasts Reveals Persistent, Independently Phased Circadian Rhythms of Clock Gene Expression. *Current Biology*. 2004 Dec;14(24):2289–95. doi: 10.1016/j.cub.2004.11.057
44. Durgan DJ, Hotze MA, Tomlin TM, Egbejimi O, Graveleau C, Dale Abel E, et al. The intrinsic circadian clock within the cardiomyocyte. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005 Oct;289(4):1530–41. doi: 10.1152/ajpheart.00406.2005.
45. Wang CY, Wen MS, Wang HW, Hsieh IC, Li Y, Liu PY, et al. Increased vascular senescence and impaired endothelial progenitor cell function mediated by mutation of circadian gene *Per2*. *Circulation*. 2008 Nov;118(21):2166–73. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.790469
46. Lordkipanidzé M, Patrignani P, degli Studi UG, Chieti Pescara A, Erik Lerkevang Grove I, Buurma M, et al. Circadian Rhythm of Cardiovascular Disease: The Potential of Chronotherapy With Aspirin. *Front Cardiovasc Med*. 2019 Jun;6:84. doi: 10.3389/fcvm.2019.00084
47. Takeda N, Maemura K. Circadian clock and cardiovascular disease. Vol. 57, *Journal of Cardiology*. 2011. p. 249–56. doi: 10.1016/j.jjcc.2011.02.006
48. Cox D, Salazar-Bookaman MM, Chen L, Yang G. Recent advances in circadian rhythms in cardiovascular system. *Front Pharmacol*. 2015 Apr;6(71). doi: 10.3389/fphar.2015.00071
49. Thosar SS, Shea SA. Circadian control of human cardiovascular function. *Curr Opin Pharmacol*. 2021 Apr;57:89–97. doi: 10.1016/j.coph.2021.01.002
50. Ohashi N, Isobe S, Ishigaki S, Yasuda H. Circadian rhythm of blood pressure and the renin-angiotensin system in the kidney. *Hypertension Research*. 2017 May;40(5):413–22. doi: 10.1038/hr.2016.166
51. Thosar S, Butler M, Shea S. Role of the circadian system in cardiovascular disease. *J Clin Invest*. 2018 Jun;128(6):2157–67. doi: 10.1172/JCI80590

52. Verma S, Anderson TJ. Fundamentals of Endothelial Function for the Clinical Cardiologist. *Circulation*. 2002 Feb;105(5):546–9. doi: 10.1161/hc0502.104540
53. Takeda N, Maemura K. Circadian clock and vascular disease. *Hypertension Research*. 2010 Jul;33(7):645–51. doi: 10.1038/hr.2010.68
54. Paschos GK, Fitzgerald GA. Circadian clocks and vascular function. *Circ Res*. 2010 Mar;106(5):833–41. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.109.211706
55. Portaluppi F, Tiseo R, Smolensky MH, Hermida RC, Ayala DE, Fabbian F. Circadian rhythms and cardiovascular health. *Sleep Med Rev*. 2012 Apr;16(2):151–66. doi: 10.1016/j.smr.2011.04.003
56. Zhang J, Chatham J, Young ME. Circadian Regulation of Cardiac Physiology: Rhythms that Keep the Heart Beating. *Annu Rev Physiol*. 2020 Feb;82:79–101. doi: 10.1146/annurev-physiol-020518-114349
57. Foulkes NS, Maronde E, Brebi P, Carmona P, Mendez N, Ili CG. The Role of Clock Genes in Fibrinolysis Regulation: Circadian Disturbance and Its Effect on Fibrinolytic Activity. *Frontiers in Physiology* . 2020 Mar;11(129). doi: 10.3389/fphys.2020.00129
58. Pritchett D, Reddy AB. Circadian Clocks in the Hematologic System. *J Biol Rhythms*. 2015 Oct;30(5):374–88. doi: 10.1177/0748730415592729
59. Buurma M, van Diemen JJK, Thijs A, Numans ME, Bonten TN. Circadian Rhythm of Cardiovascular Disease: The Potential of Chronotherapy With Aspirin. *Front Cardiovasc Med*. 2019 Jun;6(84). doi: 10.3389/fcvm.2019.00084
60. Scheer FAJL, Shea SA. Human circadian system causes a morning peak in prothrombotic plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) independent of the sleep/wake cycle. *Blood*. 2014 Jan;123(4):590–3. doi: 10.1182/blood-2013-07-517060
61. Fishbein AB, Knutson KL, Zee PC. Circadian disruption and human health. *J Clin Invest*. 2021 Oct;131(19):1–12. doi: 10.1172/JCI148286.

62. Jain M, Zhang L, Sabeh M. Circadian rhythm and cardiovascular disorders. *ChronoPhysiology and Therapy*. 2014 Jul;4:27–40. doi: 10.2147/cpt.s44805
63. Foster RG, Kreitzman L. The rhythms of life: what your body clock means to you! *Exp Physiol*. 2014 Dec;99(4):599–606. doi: 10.1113/expphysiol.2012.071118
64. Arendt J. Shift work: coping with the biological clock. *Occup Med (Chic Ill)*. 2010 Jan;60(1):10–20. doi: 10.1093/occmed/kqp162
65. Kitamura T, Onishi K, Dohi K, Okinaka T, Ito M, Isaka N, et al. Circadian rhythm of blood pressure is transformed from a dipper to a non-dipper pattern in shift workers with hypertension. *J Hum Hypertens*. 2002 Mar;16(3):193–7. doi: 10.1038/sj/jhh/1001328
66. Fatima G, Jha A, Khan MA. Disruption in Circadian Rhythm Increases Cardiovascular Disease Risk Factors in Shift Working Nurses. *Indian J Cardiovasc Dis Women WINCARS*. 2021 Apr;06(2):79–85. doi: 10.1055/s-0041-1732508
67. Fujino Y, Iso H, Tamakoshi A, Inaba Y, Koizumi A, Kubo T, et al. Original Contribution A Prospective Cohort Study of Shift Work and Risk of Ischemic Heart Disease in Japanese Male Workers. *Am J Epidemiol*. 2006 Aug;164(2):128–35. doi: 10.1093/aje/kwj185
68. Morris CJ, Purvis TE, Hu K, Scheer FA. Circadian Misalignment Increases C-Reactive Protein and Blood Pressure in Chronic Shift Workers. *J Biol Rhythms*. 2017 Apr;32(2):154–64. doi: 10.1177/0748730417697537
69. Basheer R, Ode KL, Tabuchi M, Liu JA, Walton JC, Devries AC, et al. Disruptions of Circadian Rhythms and Thrombolytic Therapy During Ischemic Stroke Intervention. *Front Neurosci*. 2021 Jun;15(675732). doi: 10.3389/fnins.2021.675732

70. Oike H, Kobori M, Suzuki T, Ishida N. Caffeine lengthens circadian rhythms in mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011 Jul;410(3):654–8. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.06.049
71. Beauchemin KM, Hays P, Frcpc MB. Dying in the dark: sunshine, gender and outcomes in myocardial infarction. *Journal of the royal society of medicine .* 1998 Jul;91(7):352–4. doi: 10.1177/014107689809100703.
72. Oyama Y, Bartman CM, Gile J, Eckle T, Biology C. Circadian MicroRNAs in Cardioprotection. *Curr Pharm Des.* 2017;23(25):3723–30. doi: 10.2174/1381612823666170707165319
73. Curtis AM, Cheng Y, Kapoor S, Reilly D, Price TS, Fitzgerald GA. Circadian variation of blood pressure and the vascular response to asynchronous stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2007 Feb;104(9):3450–5. doi: 10.1073/pnas.0611680104
74. Lefta M, Campbell KS, Feng H-Z, Jin J-P, Esser KA. Development of dilated cardiomyopathy in Bmal1-deficient mice. *The American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology.* 2012 Aug;303(4):475–85. doi: 10.1152/ajpheart.00238.2012.
75. Durgan DJ, Tsai JY, Grenett MH, Pat BM, Ratcliffe WF, Villegas-Montoya C, et al. Evidence suggesting that the cardiomyocyte circadian clock modulates responsiveness of the heart to hypertrophic stimuli in mice. *Chronobiol Int.* 2011 Apr;28(3):187–203. doi: 10.3109/07420528.2010.550406
76. Somanath PR, Podrez EA, Chen J, Ma Y, Marchant K, Antoch M, et al. Deficiency in core circadian protein Bmal1 is associated with a prothrombotic and vascular phenotype. *J Cell Physiol.* 2011 Jan;226(1):132–40. doi: 10.1002/jcp.22314
77. Hemmeryckx B, Frederix L, Lijnen HR. Deficiency of Bmal1 disrupts the diurnal rhythm of haemostasis. *Exp Gerontol.* 2019 Apr;118:1–8. doi: 10.1016/j.exger.2018.12.017

78. Mercier Zuber A, Centeno G, Pradervandb S, Nikolaeva S, Maquelin L, Cardinaux L, et al. Molecular clock is involved in predictive circadian adjustment of renal function. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009 Sep;106(38):16523–8. doi: 10.1073/pnas.0904890106
79. Masuki S, Todo T, Nakano Y, Okamura H, Nose H. Reduced α -adrenoceptor responsiveness and enhanced baroreflex sensitivity in Cry-deficient mice lacking a biological clock. *J Physiol*. 2005 Jul;566:213–24. doi: 10.1113/jphysiol.2005.086728
80. Doi M, Takahashi Y, Komatsu R, Yamazaki F, Yamada H, Haraguchi S, et al. Salt-sensitive hypertension in circadian clock-deficient Cry-null mice involves dysregulated adrenal Hsd3b6. *Nat Med*. 2010 Jan;16(1):67–74. doi: 10.1038/nm.2061
81. Narasimamurthya R, Hatorib MH, Nayakb KS, Liua FL, Panda S, M. Vermaa I. Circadian clock protein cryptochrome regulates the expression of proinflammatory cytokines. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012 Jul;109(31):12662–7. doi: 10.1073/pnas.1209965109
82. Douma LG, Solocinski K, Holzworth MR, Crislip GR, Masten SH, Miller AH, et al. Female C57BL/6J mice lacking the circadian clock protein PER1 are protected from nondipping hypertension. *The American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2019 Jan;316(1):50–8. doi: 10.1152/ajpregu.00381.2017
83. Richards J, Cheng K-Y, All S, Skopis G, Jeffers L, Lynch IJ, et al. A role for the circadian clock protein Per1 in the regulation of aldosterone levels and renal Na retention. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 2013 Dec;305(12):1697–704. doi: 10.1152/ajprenal.00472.2013.
84. Vukolic A, Antic V, van Vliet BN, Yang Z, Albrecht U, Montani J-P. Role of mutation of the circadian clock gene Per2 in cardiovascular circadian rhythms. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2010 Mar;298(3):627–34. doi: 10.1152/ajpregu.00404.2009

85. Viswambharan H, Carvas JM, Antic V, Marecic A, Jud C, Zaugg CE, et al. Mutation of the Circadian Clock Gene *Per2* Alters Vascular Endothelial Function. *Circulation*. 2007 Apr;115(16):2188–95. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.653303
86. Wang Q, Maillard M, Schibler U, Burnier M, Gachon F. Cardiac hypertrophy, low blood pressure, and low aldosterone levels in mice devoid of the three circadian PAR bZip transcription factors *DBP*, *HLF*, and *TEF*. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2010 Oct;299(4):1013–9. doi: 10.1152/ajpregu.00241.2010
87. Anea CB, Zhang M, Stepp DW, Simkins B, Reed G, Fulton DJ, et al. Vascular Disease in Mice With a Dysfunctional Circadian Clock. *Circulation*. 2009 Mar;119(11):1510–7. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.827477
88. Martino TA, Oudit GY, Herzenberg AM, Tata N, Koletar MM, Kabir GM, et al. Circadian rhythm disorganization produces profound cardiovascular and renal disease in hamsters. *American Journal of Physiology*. 2008 May;294(5):1675–83. doi: 10.1152/ajpregu.00829.2007
89. Jacobi D, Liu S, Burkewitz K, Kory N, Knudsen NH, Alexander RK, et al. Hepatic *Bmal1* Regulates Rhythmic Mitochondrial Dynamics and Promotes Metabolic Fitness. *Cell Metab*. 2015 Oct;22(4):709–20. doi: 10.1016/j.cmet.2015.08.006
90. Cheng B, Anea CB, Yao L, Chen F, Patel V, Merloiu A, et al. Tissue-intrinsic dysfunction of circadian clock confers transplant arteriosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Oct;108(41):17147–52. doi: 10.1073/pnas.1112998108
91. Young ME, Brewer RA, Pelicciari-Garcia RA, Collins HE, He L, Birky TL, et al. Cardiomyocyte-Specific *BMAL1* Plays Critical Roles in Metabolism, Signaling, and Maintenance of Contractile Function of the Heart. *J Biol Rhythms*. 2014 Aug;29(4):257–76. doi: 10.1177/0748730414543141

92. Durgan DJ, Pulinilkunnil T, Villegas-Montoya C, Garvey ME, Frangogiannis NG, Michael LH, et al. Ischemia/Reperfusion Tolerance Is Time-of-Day-Dependent: Mediation by the Cardiomyocyte Circadian Clock. *Circ Res*. 2010 Feb;106(3):546–50. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.109.209346
93. Xie Z, Su W, Liu S, Zhao G, Esser K, A. Schroder E, et al. Smooth-muscle BMAL1 participates in blood pressure circadian rhythm regulation. *J Clin Invest*. 2015 Jan;125(1):324–36. doi: 10.1172/JCI76881
94. Khaper N, Bailey CDC, Ghugre NR, Reitz C, Awosanmi Z, Wainey R, et al. Implications of disturbances in circadian rhythms for cardiovascular health: A new frontier in free radical biology. *Free Radic Biol Med*. 2018 May;119:85–92. doi: 10.1016/J.FREERADBIOMED.2017.11.006
95. Manfredini R, Fabbian F, Manfredini F, Salmi R, Gallerani M, Bossone E. Chronobiology in Aortic Diseases-"Is This Really a Random Phenomenon?". *Prog Cardiovasc Dis*. 2013 Aug;56(1):116–24. doi: 10.1016/j.pcad.2013.04.001
96. López F, Lee KW, Marín F, Roldán V, Sogorb F, Caturla J, et al. Are there ethnic differences in the circadian variation in onset of acute myocardial infarction? *Int J Cardiol*. 2005 Apr;100(1):151–4. doi: 10.1016/j.ijcard.2004.12.002
97. Mathur P, Kadavath S, Marsh JD, Mehta JL. Chronotherapy for hypertension: improvement in patient outcomes with bedtime administration of antihypertensive drugs. *Eur Heart J*. 2020 Dec;41(48):4577–9. doi: 10.1093/eurheartj/ehz836
98. Cuspidi C, Sala C, Tadic M, Gherbesi E, de Giorgi A, Grassi G, et al. Clinical and prognostic significance of a reverse dipping pattern on ambulatory monitoring: An updated review. *J Clin Hypertens*. 2017 Jul;19(7):713–21. doi: 10.1111/jch.13023.
99. Smolensky MH, Hermida RC, Geng YJ. Chronotherapy of cardiac and vascular disease: timing medications to circadian rhythms to optimize treatment effects and outcomes. *Curr Opin Pharmacol*. 2021 Apr;57:41–8. doi: 10.1016/j.coph.2020.10.014

100. Monfredi O, Lakatta EG. Complexities in cardiovascular rhythmicity: perspectives on circadian normality, ageing and disease. *Cardiovasc Res.* 2019 Sep;115(11):1576–95. doi: 10.1093/cvr/cvz112
101. Simko F, Baka T. Chronotherapy of cardiovascular pathologies: a hopeful strategy. *Ther Adv Chronic Dis.* 2022 Apr;13:1–3. doi: 10.1177/20406223221092372
102. Richards J, Diaz AN, Gumz ML. Clock Genes in Hypertension: Novel Insights from Rodent Models. *Blood Press Monit.* 2014;19(5):1–11. doi: 10.1097/MBP.0000000000000060
103. Steenbergen C, Frangogiannis NG. Ischemic Heart Disease. In: *Muscle.* Elsevier Inc.; 2012. p. 495–521. doi: 10.1016/B978-0-12-381510-1.00036-3
104. Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature.* 2011 May;473(7347):317–25. doi: 10.1038/nature10146
105. Bass J, Lazar MA. Circadian time signatures of fitness and disease. *Science* (1979). 2016 Nov;354(6315):994–9. doi: 10.1126/science.aah4965
106. Scheiermann C, Rankin SM, Hidalgo A, Aroca-Crevillén A, Adrover JM. Circadian Features of Neutrophil Biology. *Front Immunol.* 2020 Apr;11(576). doi: 10.3389/fimmu.2020.00576
107. Moore K, Sheedy F, Fisher E. Macrophages in atherosclerosis: a dynamic balance. *Nat Rev Immunol.* 2013 Oct;13(10):709–21. doi: 10.1038/nri3520
108. Förstermann U, Xia N, Li H. Roles of Vascular Oxidative Stress and Nitric Oxide in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *Circ Res.* 2017 Feb;120(4):713–35. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.309326
109. Čulić V. Chronobiological rhythms of acute cardiovascular events and underlying mechanisms. *Int J Cardiol.* 2014 Jun;174(2):417–9. doi: 10.1016/j.ijcard.2014.04.043

110. Schloss MJ, Horckmans M, Nitz K, Duchene J, Drechsler M, Bidzhekov K, et al. The time-of-day of myocardial infarction onset affects healing through oscillations in cardiac neutrophil recruitment. *EMBO Mol Med*. 2016 Aug;8(8):937–48. doi: 10.15252/emmm.201506083
111. Leibetseder V, Humpeler S, Svoboda M, Schmid D, Thalhammer T, Zuckermann A, et al. Clock genes display rhythmic expression in human hearts. *Chronobiol Int*. 2009 May;26(4):621–36. doi: 10.1080/07420520902924939
112. Virag JAI, Dries JL, Easton PR, Friesland AM, Deantonio JH, Chintalgattu V, et al. Attenuation of myocardial injury in mice with functional deletion of the circadian rhythm gene *mPer2*. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2010 Mar;298(3):1088–95. doi: 10.1152/ajpheart.01280.2008
113. Rivera-Caravaca JM, Asunción Esteve-Pastor M, Rivera-Caravaca M. Heart Failure and Cardiac Events: Is a Consecutive Measurement of Biomarkers a Simple and Practical Approach? *Thromb Haemost*. 2019 Dec;119(12):1891–3. doi: 10.1055/s-0039-3400274
114. Lewis R, Hackfort BT, Schultz HD. Chronic heart failure abolishes circadian rhythms in resting and chemoreflex breathing. *Adv Exp Med Biol*. 2018;1071:129–36. doi: 10.1007/978-3-319-91137-3_16
115. Song S, Tien CL, Cui H, Basil P, Zhu N, Gong Y, et al. Myocardial Rev-erb-Mediated Diurnal Metabolic Rhythm and Obesity Paradox. *Circulation*. 2022 Feb;145(6):448–64. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.121.056076
116. Ballesta A, Innominato PF, Dallmann R, Rand DA, Lévi Warwick Medical School AB FA, Mathematics Institute WA. Systems Chronotherapeutics. *Pharmacol Rev*. 2017 Apr;69(2):161–99. doi: 10.1124/pr.116.013441
117. Yang G, Chen F, Wang N, Martino TA, Tsimakouridze E v, Alibhai FJ. Therapeutic applications of circadian rhythms for the cardiovascular system. *Front Pharmacol*. 2015 Apr;6(77). doi: 10.3389/fphar.2015.00077

118. Lee Y, Field JM, Sehgal A. Circadian Rhythms, Disease and Chronotherapy. *J Biol Rhythms*. 2021 Dec;36(6):503–31. doi: 10.1177/07487304211044301
119. Mckenna H, van der Horst GTJ, Reiss I, Martin D. Clinical chronobiology: a timely consideration in critical care medicine. *Crit Care*. 2018 May;22(1):124. doi: 10.1186/s13054-018-2041-x
120. Bowles NP, Thosar SS, Herzig MX, Shea SA. Chronotherapy for Hypertension. *Curr Hypertens Rep*. 2018 Sep;20(11):97. doi: 10.1007/s11906-018-0897-4
121. Kuehn BM. The Heart's Circadian Rhythms Point to Potential Treatment Strategies. *Circulation*. 2016 Dec;134(23):1907–8. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.116.026039
122. Mure LS, Le HD, Benegiamo G, Chang MW, Rios L, Jillani N, et al. Diurnal transcriptome atlas of a primate across major neural and peripheral tissues. *Science* (1979). 2018 Mar;359(6381). doi: 10.1126/science.aao0318
123. Ruben MD, Smith DF, FitzGerald GA, Hogenesch JB. Dosing time matters. *Science* (1979). 2019 Aug;365(6453):547–9. doi: 10.1126/science.aax7621
124. Levi F, Schibler U. Circadian rhythms: Mechanisms and therapeutic implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2007;47:593–628. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.47.120505.105208
125. Bicker J, Alves G, Falcão A, Fortuna A. Timing in drug absorption and disposition: The past, present, and future of chronopharmacokinetics. *Br J Pharmacol*. 2020 Feb;177(10):2215–39. doi: 10.1111/bph.15017
126. Selfridge JM, Gotoh T, Schiffhauer S, Liu JJ, Stauffer PE, Li A, et al. Chronotherapy: Intuitive, Sound, Founded...But Not Broadly Applied. *Drugs*. 2016 Oct;76(16):1507–21. doi: 10.1007/s40265-016-0646-4

127. Ohdo S, Koyanagi S, Matsunaga N. Chronopharmacological strategies focused on chrono-drug discovery. *Pharmacol Ther.* 2019 Oct;202:72–90. doi: 10.1016/j.pharmthera.2019.05.018
128. Ohdo S. Chronopharmaceutics: Pharmaceutics Focused on Biological Rhythm. *Biol Pharm Bull.* 2010;33(2):159–67. doi: 10.1248/bpb.33.159
129. Cooke-Ariel H, Ahmed K. Advances in chronotherapeutic applications for prevention and treatment of cardiovascular diseases. *J Integr Cardiol.* 2015;1(3):52–3. doi: 10.15761/jic.1000116
130. Hermida RC, Ayala DE, Fernández JR, Calvo C. Chronotherapy improves blood pressure control and reverts the nondipper pattern in patients with resistant hypertension. *Hypertension.* 2008 Jan;51(1):69–76. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.096933
131. Martino TA, Tata N, Simpson JA, Vanderlaan R, Dawood F, Kabir MG, et al. The primary benefits of angiotensin-converting enzyme inhibition on cardiac remodeling occur during sleep time in murine pressure overload hypertrophy. *J Am Coll Cardiol.* 2011 May;57(20):2020–8. doi: 10.1016/j.jacc.2010.11.022
132. Hermida RC, Ayala DE, Mojón A, Fernández JR. Influence of circadian time of hypertension treatment on cardiovascular risk: results of the MAPEC study. *Chronobiol Int.* 2010 Sep;27(8):1629–51. doi: 10.3109/07420528.2010.510230
133. Hermida RC, Crespo JJ, Domínguez-Sardi M, Otero A, Moyá A, Ríos MT, et al. Bedtime hypertension treatment improves cardiovascular risk reduction: the Hygia Chronotherapy Trial. *Eur Heart J.* 2020 Dec;41(48):4577–9. doi: 10.1093/eurheartj/ehz836
134. Smolensky MH, Hermida RC, Portaluppi F. Circadian mechanisms of 24-hour blood pressure regulation and patterning. *Sleep Med Rev.* 2017 Jun;33:4–16. doi: 10.1016/j.smr.2016.02.003
135. Ruan W, Yuan X, Eltzschig HK. Circadian rhythm as a therapeutic target. *Nat Rev Drug Discov.* 2021 Apr;20(4):287–307. doi: 10.1038/s41573-020-00109-w

136. Hermida RC, Ayala DE. Chronotherapy with the angiotensin-converting enzyme inhibitor ramipril in essential hypertension: Improved blood pressure control with bedtime dosing. *Hypertension*. 2009 Jul;54(1):40–6. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.130203
137. Hermida RC, Ayala DE, Mojón A, Fernández JR. Decreasing sleep-time blood pressure determined by ambulatory monitoring reduces cardiovascular risk. *J Am Coll Cardiol*. 2011 Sep;58(11):1165–73. doi: 10.1016/j.jacc.2011.04.043
138. Kohno I, Ijiri H, Takusagawa M, Yin D, Sano S, Ishihara T, et al. Effect of Imidapril in dipper and nondipper hypertensive patients: comparison between morning and evening administration. *Chronobiol Int*. 2000 Mar;17(2):209–19. doi: 10.1081/cbi-100101044
139. Zaslavskaja RM, Narmanova OZ, Teĭblium MM, Kalimurzina BS. [Time-dependent effects of ramipril in patients with hypertension of 2 stage]. *Klin Med (Mosk)*. 1999;77(10):41–4.
140. Hermida RC, Calvo C, Ayala DE, Domínguez MJ, Covelo M, Fernández JR, et al. Administration Time-Dependent Effects of Valsartan on Ambulatory Blood Pressure in Hypertensive Subjects. *Hypertension*. 2003 Sep;42(3):283–90. doi: 10.1161/01.HYP.0000084855.32823.DA
141. Hermida RC, Calvo C, Ayala DE, Fernández JR, Covelo M, Mojó A, et al. Treatment of non-dipper hypertension with bedtime administration of valsartan. *J Hypertens*. 2005 Oct;23(10):1913–22. doi: 10.1097/01.hjh.0000182522.21569.c5
142. Hermida RC, Ayala DE, Fernández JR, Calvo C. Comparison of the Efficacy of Morning Versus Evening Administration of Telmisartan in Essential Hypertension. *Hypertension*. 2007 Oct;50(4):715–22. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.094235
143. Hermida RC, Ayala DE, Mojón A, Alonso I, Fernández JR. Reduction of morning blood pressure surge after treatment with nifedipine GITS at bedtime, but

not upon awakening, in essential hypertension. *Blood Press Monit.* 2009 Aug;14(4):152–9. doi: 10.1097/MBP.0b013e32832e0d80

144. Hermida RC, Ayala DE, Mojón A, Fernández JR. Chronotherapy with nifedipine GITS in hypertensive patients: Improved efficacy and safety with bedtime dosing. *Am J Hypertens.* 2008 Aug;21(8):948–54. doi: 10.1038/ajh.2008.216
145. Hermida RC, Ayala DE, Calvo C, López JE. Aspirin administered at bedtime, but not on awakening, has an effect on ambulatory blood pressure in hypertensive patients. *J Am Coll Cardiol.* 2005 Sep;46(6):975–83. doi: 10.1016/j.jacc.2004.08.071
146. Lihong Chen, Guangrui Yang, Jiayang Zhang, Baoyin Ren, Soonyew Tang, Xuanwen Li, et al. Time-Dependent Hypotensive Effect of Aspirin in Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2018 Dec;38(12):2819–26. doi: 10.1161/ATVBAHA.118.311296
147. Krasieńska B, Paluszkiewicz L, Miciak-Ławicka E, Krasinski M, Rzymiski P, Tykarski A, et al. The impact of acetylsalicylic acid dosed at bedtime on circadian rhythms of blood pressure in the high-risk group of cardiovascular patients—a randomized, controlled trial. *Eur J Clin Pharmacol.* 2021 Jan;77(1):35–43. doi: 10.1007/s00228-020-02997-8
148. Pechanova O, Paulis L, Simko F. Peripheral and Central Effects of Melatonin on Blood Pressure Regulation. *Int J Mol Sci.* 2014 Oct;15(10):17920–37. doi: 10.3390/ijms151017920
149. Jonas M, Garfinkel D, Zisapel N, Laudon M, Grossman E. Impaired nocturnal melatonin secretion in non-dipper hypertensive patients. *Blood Press.* 2003;12(1):19–24.
150. Zeman M, Dulková K, Bada V, Herichová I. Plasma melatonin concentrations in hypertensive patients with the dipping and non-dipping blood pressure profile. *Life Sci.* 2005 Mar;76(16):1795–803. doi: 10.1016/J.LFS.2004.08.034

151. Borghi C, Cicero AFG. Nutraceuticals with a clinically detectable blood pressure-lowering effect: a review of available randomized clinical trials and their meta-analyses. *Br J Clin Pharmacol*. 2017 Jan;83(1):163–71. doi: 10.1111/bcp.12902
152. García-Prieto J, Villena-Gutiérrez R, Gómez M, Bernardo E, Pun-García A, García-Lunar I, et al. Neutrophil stunning by metoprolol reduces infarct size. *Nature Communication*. 2017 Apr;8(14780). doi: 10.1038/ncomms14780
153. Bonten TN, Saris A, van Oostrom MJ, Snoep JD, Rosendaal FR, Zwaginga JJ, et al. Effect of aspirin intake at bedtime versus on awakening on circadian rhythm of platelet reactivity. *Thromb Haemost*. 2014 Dec;112(6):1209–18. doi: 10.1160/TH14-05-0453
154. Miciak-Ławicka E, Begier-Kraśńska B, Tykarski A, Kraśński Z. Does the timing of aspirin administration influence its antiplatelet effect – review of literature on chronotherapy. *Kardiochirurgia i Torakochirurgia Polska*. 2018 Jun;15(2):125–9. doi: 10.5114/kitp.2018.76479
155. Brunner-Ziegler S, Jilma B, Schörghofer C, Winkler F, Jilma-Stohlawetz P, Koppensteiner R, et al. Comparison between the impact of morning and evening doses of rivaroxaban on the circadian endogenous coagulation rhythm in healthy subjects. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2016 Feb;14(2):316–23. doi: 10.1111/jth.13213
156. Kojetin DJ, Burris TP. REV-ERB and ROR nuclear receptors as drug targets. *Nat Rev Drug Discov*. 2014 Mar;13(3):197–216. doi: 10.1038/nrd4100
157. Mouton S, Marechal X, Modine T, Coisne A, Fayad G, et al. Daytime variation of perioperative myocardial injury in cardiac surgery and its prevention by Rev-Erb α antagonism: a single-centre propensity-matched cohort study and a randomised study. *Lancet*. 2017 Oct;391(10115):59–69. doi: 10.1016/S0140-6736(17)32132-3

158. Kreutz R, Kjeldsen SE, Burnier M, Narkiewicz K, Oparil S, Mancia G. Blood pressure medication should not be routinely dosed at bedtime. We must disregard the data from the HYGIA project. *Blood Press.* 2020 Jun;29(3):135–6. doi: 10.1080/08037051.2020.1747696
159. Rahman M, Greene T, Phillips RA, Agodoa LY, Bakris GL, Charleston J, et al. A Trial of 2 Strategies to Reduce Nocturnal Blood Pressure in Blacks With Chronic Kidney Disease. *Hypertension.* 2013 Jan;61(1):82–8. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.112.200477
160. Hermida RC, Ayala DE, Fontao MJ, Mojón A, Fernández JR. Chronotherapy with valsartan/amlodipine fixed combination: Improved blood pressure control of essential hypertension with bedtime dosing. *Chronobiol Int.* 2010 Jul;27(6):1287–303. doi: 10.3109/07420528.2010.489167
161. Zhao P, Xu P, Wan C, Wang Z. Evening versus morning dosing regimen drug therapy for hypertension. *Cochrane Database of Systematic Reviews.* 2011 Oct;2011(10). doi: 10.1002/14651858.CD004184.pub2