

Os Ritmos da Vida - Uma Visão Actualizada da Cronobiologia Aplicada

The Rhythms of Life - An Uptaded Vision of Applied Chronobiology

Ana Rita Acúrcio, Luís Monteiro Rodrigues

Lab. Fisiologia Experimental, Universidade de Lisboa (Fac. Farmácia),
1647 006 Lisboa, Portugal

monteirorodrigues@sapo.pt

Resumo

As flutuações ambientais, tais como o ciclo dia-noite, as estações do ano e as variações de temperatura e humidade, são um desafio à sobrevivência dos seres vivos, os quais desenvolveram mecanismos de ajustamento e adaptação dos seus processos fisiológicos a essas variações cíclicas - o chamado Relógio Endógeno. Este relógio percebe a variação temporal, é regulado por diversos sincronizadores e, informa todo o organismo através de sistemas humorais e neurais.

A Cronobiologia é um novo ramo da ciência que estuda os ritmos das funções biológicas relacionando-os com a saúde e com a doença, dando origem a outras ciências como a cronofarmacologia, a cronotoxicologia e a cronoterapia, cujos princípios (cronobiológicos) são hoje utilizados para, por exemplo, determinar a melhor hora do dia para a administração de um fármaco de forma a maximizar a eficácia e a minimizar as reacções adversas.

A presente revisão pretende definir e explicar os conceitos básicos e o funcionamento do relógio endógeno e dos ritmos circadianos, defini-lo para os diferentes sistemas biológicos e, através da pele, demonstrar como o conhecimento prático destas especialidades, contribui, de forma aplicada, para o desenvolvimento do nosso conhecimento específico, ilustrando assim o estado-da-arte destes domínios

Palavras chave: Ritmos Circadianos, Cronobiologia, Relógio Endógeno, Ritmo Circadiano da Pele.

Abstract

Environmental fluctuations, such as the day-night cycle, the year seasons and temperature and humidity changes, are a challenge to the living beings survival whose developed mechanisms allowing to adjust their physiological processes to those cyclic variations, the so-called endogenous clock. This clock recognizes time variation, is regulated by several synchronizers, and informs the whole organism by humoral and neural systems. Chronobiology is a new science branch studying the biological rhythms, relating them to health and disease, from which other medical sciences, such as chronopharmacology, chronotoxicology and chronotherapy emerged. It's principles are actually used to determine, e.g., the best schedule for drug administration in order to maximize their efficiency and to minimize adverse reactions.

This review intends to define and to explain the basic concepts and functioning of the endogenous clock and circadian rhythms, to define them in different biological systems and, through the skin, to demonstrate how the knowledge of these specialties contributes, in practical terms, to the development of our specific knowledge, illustrating the "state of the art" of this area of knowledge.

Key words: Circadian Rhythms, Chronobiology, Endogenous Clock, Circadian Rhythm of the Skin.

Recebido em 04/09/2009

Aceite em 16/11/2009

Rev. Lusófona de Ciências e Tecnologias da Saúde, 2009; (6) 2: 216-234

Versão electrónica: <http://revistas.ulusofona.pt/index.php/revistasaude>

Introdução

Todos os seres vivos estão expostos a variações cíclicas que ocorrem no meio ambiente, como por exemplo a alternância dia-noite, as variações de temperatura e as estações do ano. Todas estas flutuações ambientais constituem um desafio à sua sobrevivência. Para a sua adaptação, alguns mecanismos desenvolvidos ao longo da sua evolução, permitem antecipar e ajustar os seus processos fisiológicos aquelas alterações rítmicas, cíclicas, preparando adequada e atempadamente esses Ritmos Biológicos.

O termo Circadiano vem de *circa diem* (lat: “cerca de um dia”) e designa o período de aproximadamente um dia (24 horas), onde se verifica uma alternância luz-escuro, e sobre o qual se baseia todo o ciclo biológico do corpo humano, fundamentalmente determinado pela luz solar^[10]. Para acompanhar esta alternância luz-escuro há necessidade de um “relógio” que marque o tempo de forma independente de qualquer alteração ambiental, assim como de “sensores” que percebam a variação temporal, os *sincronizadores*, e de sistemas humorais e neurais que informem todos os componentes do sistema do estado de iluminação ambiental. A este relógio endógeno dá-se o nome de **Relógio Biológico**, o qual permite a antecipação a variações cíclicas do meio ambiente, permitindo que o indivíduo se prepare para o sono, para o acordar, e para todas as actividades que tem de desenvolver, consoante as condições impostas pelo ambiente.

A Cronobiologia nasceu em 1729, quando Mairan mostrou que o ritmo diário de abertura e fecho das folhas das plantas era mantido mesmo no escuro constante^[11]. Esta observação levou a sugerir que a planta teria um relógio biológico endógeno que lhe permitiria reconhecer as noites, funcionando como um cronómetro^[11]. No entanto, só no século passado, no final dos anos cinquenta, começaram a ser descobertas doenças secundárias a alterações de ritmos, ritmos alterados por doenças, fármacos que modificam ritmos e, ritmos que modificam o metabolismo de alguns fármacos, entre outros.

Na actualidade, a Cronobiologia é reconhecida como um novo ramo da ciência biomédica que se dedica ao estudo dos ritmos das funções biológicas e á sua relação com a saúde e a doença. A Cronofarmacologia incluindo a cronofarmacocinética, a cronoestesia, e a cronoergia, A Cronotoxicologia, e a Cronoterapia são áreas de especialização com interesse crescente^[12,11]. De resto, a identificação de critérios cronoérgicos para a administração de medicamentos é um dos objectivos mais interessantes da cronoterapia, procurando restituir a estrutura temporal alterada ou perdida que acompanha a maioria das doenças crónicas, otimizar a hora de administração dos medicamentos, tendo em conta tanto a sua tolerância face ao seu efeito

Introduction

All the living beings are exposed to cyclical variations that take place in the environment, such as the day-night cycle, the temperature variations and the year seasons. All these environmental changes represent a true challenge to the organism's survival. To fully adapt, they created mechanisms allowing to anticipate and to adjust their physiological processes to those rhythmical cyclic variations, to get adequately ready in due time - the Biological Rhythms.

The Circadian term comes from the latin *circa diem* (“about one day”) meaning the period of approximately one day (24 hours), coinciding with the light-dark sequence, on which most of the human body's biological cycles are based, mostly influenced by the solar light^[10]. To follow this light-dark cycle, a "clock" marking the time independently from any environmental change, and “sensors” - *Synchronizers* recognizing time's variation, are essential. Humoral and neural systems that inform the whole organism about the environmental light are always present. This endogenous clock, the **Biological Clock**, allows to anticipate the environment's cyclical variations, helping the body to get ready for sleep, for waking up and, in the meantime, to perform all the normal daily activities, in accordance with the conditions imposed by the environment.

Chronobiology was born in 1729, when Mairan showed that the daily rhythm of plant leave's opening and closing was maintained even in the constant darkness^[11]. This observation lead him to conclude that the plant would have an endogenous biological clock allowing the recognition of nights, like a chrono-watch^[11].

Only in the last century, by the end of the fifties, diseases secondary to rhythm alterations and rhythm altered by diseases were described, along with drugs modifying rhythms and rhythms modifying the metabolism of some drugs as well. Today, Chronobiology is recognized as a new branch of biomedical science being dedicated to the study of the rhythmicity of biological functions and its relation to health and disease. Chronopharmacology Includes chronopharmacokinetic, cronoestesy, and cronoergy. Chronotoxicology and Chronotherapy are specialization areas with increasing interest^[11,12]. Moreover, the identification of chronoergic criteria for medicine's administration, is one of the most interesting objectives of chronotherapy, trying to restore the altered (or lost) time-structure that is present in a wide variety of chronic diseases, to optimize the medicine's administration timing, taking into account its tolerance as a function of its therapeutic effect, and to detect the rhythmical variations of disease's signs and symptoms, to decide the better time for to intervene^[12].

The present review focus the basic concepts underlying

terapêutico, e detectar as variações rítmicas dos sinais e sintomas de doenças de modo a decidir o momento mais adequado para a administração dos medicamentos [12].

A presente revisão aborda os conceitos básicos subjacentes ao funcionamento do relógio endógeno e aos diversos ritmos circadianos do indivíduo. O impacto do conhecimento acumulado sobre estas matérias é ilustrado com a abordagem da cronobiologia da pele humana.

Fisiologia do Relógio Circadiano

O Relógio Biológico, que permite que a ritmicidade circadiana endógena, é constituído por dois pequenos aglomerados de neurónios que se localizam na base do terceiro ventrículo, sobre o quiasma óptico, na parte anterior do hipotálamo, denominados Núcleos Supraquiasmáticos (NSQ).

O ajuste entre o meio ambiente e o relógio é feito por via neural. A alternância luz-escuro é a principal oscilação ambiental percebida pelo relógio biológico. Os NSQ recebem aferências externas, principalmente através da retina. Aí dá-se a fotopercepção, através de células especializadas (bastonetes e cones), que traduzem a onda luminosa num sinal químico, e que o enviam aos NSQ através da via retinohipotálâmica (directa) e da via genículo-hipotalâmica (indirecta). Além das aferências visuais, os NSQ recebem também projecções dos núcleos da rafe, do tálamo, de outros núcleos do hipotálamo e do septo. O feixe retinohipotálâmico também projecta para as áreas hipotalâmicas lateral e anterior e para a região retroquiasmática. As aferências principais dos NSQ são outros núcleos do hipotálamo (núcleo paraventricular, ventro e dorsomediano, hipotálamo posterior), os núcleos da rafe (relacionados com o sono), o tálamo e a área preóptica [12]. Para atingir estes órgãos-alvo, os NSQ actuam por duas vias, a via humoral e a via neural. A via neural é a que se processa através do sistema nervoso autónomo, sendo a comunicação feita de forma rápida e directa. A via humoral, ou endócrina, vai actuar na epífise, controlando a síntese de melatonina, sendo esta comunicação feita de forma mais difusa e integradora

the endogenous clock functioning and the several known circadian rhythms. The impact of the accumulated knowledge on these matters is illustrated by the human skin chronobiology.

The Circadian Clock Physiology

The biological clock, which justifies the endogenous circadian rhythm, involves two small neuron agglomerates, located on the third ventricle basis, on the anterior hypothalamus optical chiasm, the so-called Suprachiasmatic Nucleus (SQN). The environment and the clock agreement is achieved by neural pathway. The light-dark alteration is the main environmental oscillation perceived by the biological clock. The SQN receive external afferences, mostly by the retina, where the photoperception takes place, through specialized cells (rods and cones), that translate the light wave into a chemical signal, sent to the SQN by the retinohypothalamic (direct) and by the geniculohypothalamic (indirect) pathways. Besides the visual afferences, the SQN receive also projections from the raffe nucleus, from thalamus, from other hypothalamus nucleus and from the septum. The retinohypothalamic pathway also projects for the lateral and anterior hypothalamics areas and for the retrochiasmatic region. The SQN main efferences are other hypothalamus nucleus (paraventricular nucleus, ventral and dorsomedial, posterior hypothalamus), the raffe nucleus (related with the sleep), the thalamus and the preoptical area [12]. To reach these target-organs, the SQN acts both by the humoral and the neural pathways. The neural way uses the nervous autonomic system, ensuring a vary fast, straight forward communication way. The humoral (endocrine) pathway, acts on the pineal gland, controlling the melatonin synthesis, in a diffuse but also integrative communication way.

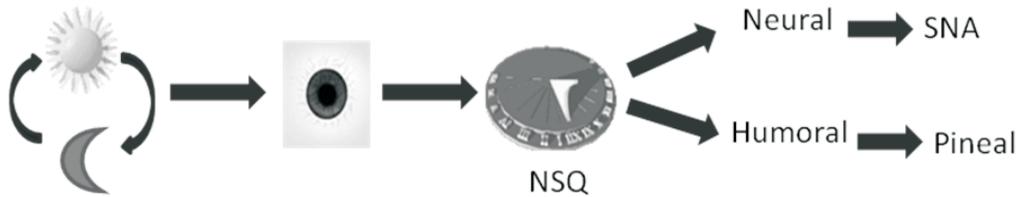


Figura 1. Esquema do funcionamento dos Núcleos Supraquiasmáticos (NSQ). As aferências externas, principalmente a alternância luz-escuro, são recebidas através da retina, traduzidas em sinais químicos, transmitidas através de vias próprias para os NSQ que vão modular os ritmos do organismo, através da via neural (Sistema Nervoso Autônomo SNA) e da via humoral, controlando a produção de melatonina pela Pineal (epífise). (Adaptado de ref. 14)

Figure 1. Schematic illustration of Suprachiasmatic nuclei (NSQ) function. External afferents, in particular light-dark sequences, are received through retina, transduced into chemical signals and transmitted by proper pathways to NSQ. These will modulate body rhythms by neural (SNA Autonomic Nervous System) and humoral routes, controlling the pineal production of Melatonin (Adapted from ref. 14)

A importância do papel dos NSQ ficou comprovada através de estudos em que se transplantaram núcleos, provenientes de fetos de rato, para o terceiro ventrículo cerebral de ratos adultos com uma lesão total daqueles núcleos^{[12],[14]}. Este procedimento possibilitou restaurar a ritmicidade circadiana que tinha sido perdida com a lesão, confirmando o papel de oscilador primário exercido pelos NSQ^{[12],[14]}. No entanto, muitos dos indivíduos que são cegos totais, sem nenhuma percepção luminosa consistente, são capazes de ajustar o relógio biológico ao ciclo claro-escuro ambiental, o que sugere que exista uma via de percepção da luz que não atinge o córtex mas sim o hipotálamo, sendo portanto independente da visão^[14]. Alguns estudos sugerem que a ativação da via retino-hipotalâmica seria possível por uma fototransdução humoral de informações pelo sangue na sequência da ação da luz sobre proteínas fotossensíveis como a hemoglobina e a bilirrubina^[17]. Além disso, os ritmos biológicos, apesar de fortemente regulados pelo relógio biológico dos NSQ, são também regulados por outros osciladores presentes noutros órgãos, como por exemplo a pele, que possui fotoreceptores^[17].

A sincronização deste relógio é feita primariamente por via endógena, geneticamente ou por substâncias como a melatonina e o cortisol, ou por via exógena (secundariamente), por meio de sincronizadores (zeitgebers) sincronizadores secundários como a luz solar, ou por aspectos sociais e culturais, pela alimentação, pela variação do ruído e da temperatura, entre outros^[1, 2, 11-13]. O papel dos Sincronizadores é então o de transmitir informação ao relógio biológico para ajustar o meio interno ao meio ambiente.

O sincronizador exógeno mais importante é a luz solar. A presença de luz solar de dia e a sua ausência à noite permite a existência de um ciclo de sono-vigília que

The importance of the Suprachiasmatic Nucleus was demonstrated in adult rats with total injury of the 3rd ventricle transplanted with Suprachiasmatic nucleus from mice foetus^{[12],[14]}. This procedure allowed to restore the circadian rhythm with the injury, confirming the primary oscillator role of the Suprachiasmatic Nucleus^{[12],[14]}. Nevertheless, totally blind individuals, without any bright perception, are able to adjust the biological clock to the light-dark environmental cycle, suggesting that there may be a light perception way that does not reaches the cortex but the hypothalamus, probably independent from the vision^[14]. Some studies suggest that the retino-hypothalamic activation could be achieved by humoral information phototransduction, through the blood, following the light action on photosensitives proteins like hemoglobin and bilirubin^[17].

In spite of being strongly regulated by the SQN biological clock, biological rhythms are also regulated by other oscillators in other organs, such as the skin, which contains photoreceptors^[17].

The clock synchronization is primarily ensured endogenously, by genetics or by intermediate substances such as melatonin and cortisol. Secondly it is also achieved by exogenous synchronizers (zeitgebers) like the solar light, but also by social and cultural aspects, the food, the noise and the temperature seasonal variation, amongst others^[1,2,11-13]. In any case Synchronizers are essential to transmit information to the biological clock in order to adjust the internal medium to the environment.

The solar light is the most important exogenous synchronizer. The presence of light during the day and its absence at night evokes a sleep-vigil cycle which regulates the quotidian and the overall brain function of the living beings. During the sleeping periods (REM

regula o quotidiano e todas as funções do cérebro e do organismo dos seres vivos em geral. A cada momento do sono (REM e NREM) as respostas do indivíduo são diferentes, conhecendo-se a variação dos níveis de produção de hormonas como a Hormona do Crescimento (GH), a Prolactina, a Melatonina e a Tireotrofina (TSH) visando a reparação das funções fisiológicas^[15,16].

As rotinas diárias são também condicionantes do relógio endógeno. Sem alterações na rotina os ritmos circadianos são apenas influenciados pelos componentes endógenos^[2]. O acto de comer tem várias influências: o aspecto social, a rotina (“são horas de comer”), as oportunidades e a sensação de fome. Diversos estudos permitiram concluir que os alimentos funcionam também como sincronizadores do relógio biológico mas que actuam de forma independente dos NSQ^{[18],[19]}. A imposição da restrição de horários de alimentação sincroniza os processos fisiológicos associados ao balanço energético e à digestão^[13].

Quanto à localização do relógio sincronizado pelos alimentos, um estudo considera que o estômago, o fígado e o pâncreas são importantes reguladores metabólicos periféricos que interactuam com o sistema nervoso central através de mecanismos de feedback^[13]. Constatou-se que, sob condições de sincronização pelos alimentos, o fígado é capaz de antecipar a chegada do alimento. Sugere-se assim que o fígado contenha um sistema de estimação do tempo e, portanto, funcione como um oscilador circadiano^[13], embora mais estudos sejam necessários para melhor compreender a sua função como oscilador sincronizado pelos alimentos, assim como para determinar os mecanismos pelos quais os alimentos funcionam como sincronizadores da ordem temporal do organismo.

A Melatonina é o sincronizador endógeno mais importante^[17]. Trata-se de uma hormona produzida principalmente na epífise, apesar de haver produção local noutros tecidos como a retina, NSQ, testículos^[20], em função do ritmo de exposição à luz, sendo libertada apenas durante a noite. É através do sinal humoral, transmitido pelos NSQ, que esta hormona é libertada e vai exercer a sua acção sobre todo o corpo. É apenas na fase do escuro que se dá a síntese da enzima N-acetiltransferase (NAT). A transcrição do gene responsável pela produção desta enzima é feita através da estimulação dos receptores $\beta 1$ noradrenérgicos no período de escuro^[21]. O segundo mensageiro (AMP cíclico) desta via de transdução não só induz a transdução do gene, como também a estabilização da proteína. Posteriormente, a enzima NAT vai metabolizar a serotonina em N-acetil-serotonina. Parte deste produto lipossolúvel é lançado na circulação, mas outra parte é metabolizado pela enzima hidroxil-indol-O-metil-transferase (HIOMT) em melatonina que

and NREM) body responses differ as a consequence of many factors. Hormones like the Growth Hormone (GH), Prolactin, Melatonin and the Thyroid Stimulating Hormone (TSH) are normally related with physiological functions recovery and are known to present characteristic rhythms^[15,16].

Daily routines are also important controlling factors to the endogenous clock. Without routine alterations the circadian rhythms are only influenced by the endogenous components^[2]. Let's look at “eating” as an example. Eating has many influences - the social aspect, the repetitive routine (“it is time for eating”), the opportunities and the “hunger”. Several studies concluded that the food also works as a biological synchronizer but independently from the SQN^{[18],[19]}. The regular feeding times synchronizes the physiologic processes associated to the energetic balance and to the digestion^[13]. This specific clock has not been clearly located yet. The stomach, the liver and the pancreas are important metabolic peripheral regulators that interact with the nervous central system through feedback mechanisms^[13]. It was also noticed that the liver is able to anticipate the food arrival, suggesting that the liver contains a time estimation system working as a circadian oscillator^[13]. Nevertheless, more studies are necessary to better understand its function as an oscillator synchronized by food, as well as to determine the mechanisms for which food works as timing synchronizer of the organism.

Melatonin is the most important endogenous synchronizer^[17]. It is an hormone produced mostly in the pineal gland, although other tissues like the retina, SQN, testicles^[20], may also produce it as a function of the light rhythm, since it is only produced during the night. It is by the humoral signal, transmitted by the SQN, that this hormone is released to impact the entire body. It is only in the darkness phase that the N-acetyltransferase enzyme (NAT) synthesis happens. The gene transcription responsible for the production of this enzyme is made through $\beta 1$ noradrenergic receptors stimulation^[21]. The second messenger (cyclic AMP) not only induces the gene transduction, but also the protein stabilization. Subsequently, the NAT enzyme metabolizes the serotonin into N-acetylserotonin. Part of this liposoluble product is launched in the circulation, while other part is metabolized by the hydroxy-indol-O-methyl-transferase (HIOMT) into melatonin which is also liposoluble and launched in the circulation. The melatonin secretion stops during the day since the NAT enzyme is degraded by the proteosome system activated by light which is not degraded at night, due to the fosforilation made by intracellular products derived from the simpathetic stimulation^[14].

também é lipossolúvel e lançada na circulação. A melatonina deixa de ser secretada durante o dia pois a enzima NAT é degradada pelo sistema de proteossoma por estimulação da luz e não é degradada à noite, devido à fosforilação exercida por produtos intracelulares derivados da estimulação simpática^[14].

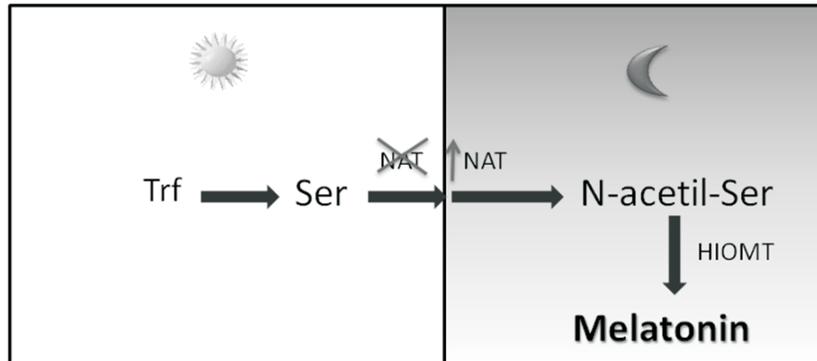


Figura 2. O ciclo claro-escuro controla a síntese de melatonina. A enzima N-acetiltransferase (NAT) é apenas produzida no período de escuro através da estimulação dos receptores β_1 pela noradrenalina libertada neste período. Esta enzima vai metabolizar a serotonina (Ser) em N-acetil-serotonina. Parte deste produto é metabolizado pela enzima hidroxi-indol-O-metil-transferase (HIOMT) em melatonina, que é lipossolúvel, e que vai ser lançada na circulação. A melatonina deixa de ser secretada durante o dia pois a enzima NAT é degradada pelo sistema de proteossoma por estimulação da luz. (Trf: Tryptofano) (Adaptado de ref. 14)

Figure 2. The light-dark cycle controls melatonin synthesis. N-acetyltransferase (NAT) is only produced during the darkness period by the nor-adrenaline stimulation of β_1 receptors. The enzyme will transform serotonin (Ser) into N-acetyl-serotonine. Part of this substance is transformed into Melatonin by hidroxi-indol-O-metil-transferase (HIOMT) a liposoluble enzyme. Melatonin stops being produced in the day light because NAT is degraded by the light stimulated proteosome system (Trf: Tryptophan) (Adapted from ref. 14)

A Melatonina é, hoje em dia, vista como um potencial cronofármaco, administrada por via oral, baseado no seu aparente efeito sincronizador do oscilador circadiano e de promoção do sono. Contudo, há estudos que defendem que a melatonina não exerce um efeito promotor do sono, pois é secretada sempre à noite, tanto em animais diurnos como nos notívagos, podendo afectar o sono indirectamente, através da sua influência na fase dos osciladores circadianos^[14]. Alguns autores sugerem mesmo que o efeito da melatonina pode ser comparado ao de uma benzodiazepina, mas um estudo clínico controlado comparando o efeito da melatonina com o temazepam, concluiu que a melatonina não diferia do placebo no sono tardio (23.30 horas), mas exibia efeito semelhante ao temazepam no sono precoce, melhorando o tempo total de sono, reduzindo o período de latência para adormecer e aumentando o número de episódio de sono REM^[22]. Estes dados ajudam a justificar a prescrição de melatonina em perturbações circadianas do sono como o síndrome da fase retardada do sono, o jet-lag,

Melatonin is actually regarded as a highly probable chronopharmaceutical, orally administered, mostly from its circadian oscillator synchronizer and sleep promotion effects. Nevertheless, some studies disregard the melatonin sleep promotion effect, since it is always secreted at night, both in diurnal as in nocturnal animals, suggesting rather an indirect effect over sleep, from its influence in the circadian oscillators phase^[14]. Knowing that, sometimes, the melatonin effect is compared to benzodiazepines, a clinically controlled study compared the effect of the melatonin with the temazepam, and concluded that the melatonin effect was no different from placebo in the late sleep (23.30 hours). However it was very similar to temazepam in the early sleep, improving the total sleep time, reducing the latency period (to fall asleep) and increasing the number of REM episodes^[22]. These facts help to justify why melatonin may be recommended for sleep circadian perturbations such as the retarded sleep phase syndrome, jet-lag and other disturbances related with nocturnal jobs, insomnia in advanced age,

transtornos associado a trabalhos nocturno, insónia na velhice, depressão major, transtornos do sono da doença de Alzheimer e doença afectiva estacional, cada caso destes com o seu característico esquema posológico^[12]. A acção reguladora da melatonina no sono parece assim resultar de uma acção combinada do seu efeito promotor do sono, do seu efeito de resincronização e da sua acção sobre a temperatura corporal, visto que parece diminuir a latência do sono, a temperatura corporal e a vigília, se administrada ao meio-dia,. Estes efeitos na temperatura corporal parecem participar, além dos efeitos sobre o relógio circadiano, na indução do sono^[12].

Recentemente descobriu-se que o funcionamento do relógio biológico não é meramente modular, dependendo também da interacção de múltiplos mecanismos de feedback positivos e negativos^{[12],[14]}. Sabe-se que os genes do relógio (“clock” (clk); “period” (per); “frequency” (frq); “timeless” (tim), “double-time” (dbt), etc.) são expressos de forma rítmica, sendo encontrados em vários locais do sistema nervoso central e mesmo em células somáticas^[23]. Actualmente existe um esquema aceite para o funcionamento dos genes do relógio, segundo o qual dois tipos de proteínas reguladoras da transcrição (PAS) iniciam o ciclo. Estas proteínas reguladoras podem ter expressão constitutiva ou transitória e, ao dimerizarem, vão desencadear a expressão de genes centrais do relógio. Assim, são codificadas proteínas funcionais que podem ter três funções - entrar no núcleo e inibirem a sua expressão génica; estimular a síntese de mais proteínas reguladoras e/ou aumentarem os genes a jusante regulados pelo relógio^[12].

major depression, disturbances associated to the Alzheimer's disease and affective seasonal dysfunction. For each case, a specific posological scheme may be found^[12]. So, the sleep regulating action of melatonin seems to result from a combined action of its eventual promotion and resincronization capacities allied to its action on the body temperature. Around midday, it seems to reduce the sleep latency, the body temperature and the vigil. These effects over the body temperature seem also to contribute, besides the other effects on the circadian clock, on the sleep induction^[12].

As recently demonstrated the biological clock does not work only in a modular way but also depends from other positive and negative feedback mechanisms^{[12],[14]}. It is known that the clock genes (“clock” (clk); “period” (per); “frequency” (frq); “timeless” (tim), “double-time” (dbt), etc.) are expressed in a rhythmical way, being found in the central nervous system as in somatic cells^[23]. Actually, an accepted functioning scheme involving these genes, includes two types of transcription regulating proteins (PAS) that initiate the cycle. These regulating proteins may have a constitutive or transitory expression that, when dimerized, evokes the central clock genes expression. Thus, there are encoded functional proteins that may have three functions – to enter in the nucleus and to inhibit its genic expression; to stimulate the synthesis of more regulating proteins and / or to increase the downstream genes regulated by the clock^[12].

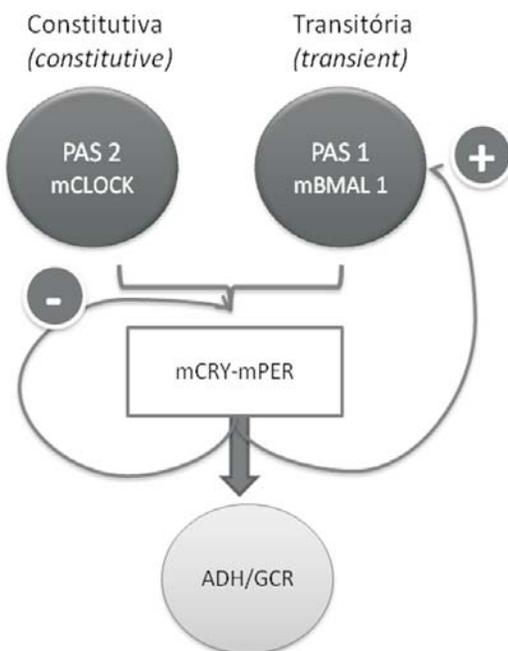


Figura 3. Modelo ilustrativo do funcionamento dos genes do Relógio Biológico (rato). Dois tipos de proteínas reguladoras da transcrição, PAS, iniciam o ciclo. Os factores PAS 1 têm expressão transitória, enquanto que os PAS 2 têm expressão constitutiva. Dá-se uma dimerização transitória, cujo heterodímero formado desencadeia a expressão dos genes do relógio (mCRY e mPER). Como resultado são codificadas proteínas que podem inibir a sua expressão genética (feedback negativo), estimular a síntese de mais factores de transcrição (feedback positivo) ou então estimular genes regulados pelo relógio (ADH, ou genes GCR) (Adaptado de ref.12)

Figure 3. Illustrative model of the rat's biological clock functioning. Two types of transcription regulatory proteins PAS starts the cycle. PAS 1 are transient while PAS 2 are constitutive. A transitory dimerization occurs and the formed heterodimer starts the expression of the clock genes (mCRY e mPER). As a result, proteins that inhibit their own genetic expression are codified (negative feedback), more transcription factors are synthesized (positive feedback) or other gene regulated by the clock are stimulated (e.g. ADH or GCR) (Adapted from ref. 12)

Um Ritmo Biológico pode ser caracterizado através de um Mapa de Fases. Este é a representação das acrofases dos distintos ritmos circadianos de um indivíduo e revela a relação temporal destes distintos processos fisiológicos^[12].

A Biological Rhythm can be characterized by a Phase Map. This map is the acrophases representation of different circadian rhythms from a given individual and reveals the timing relation of these different physiologic processes^[12].

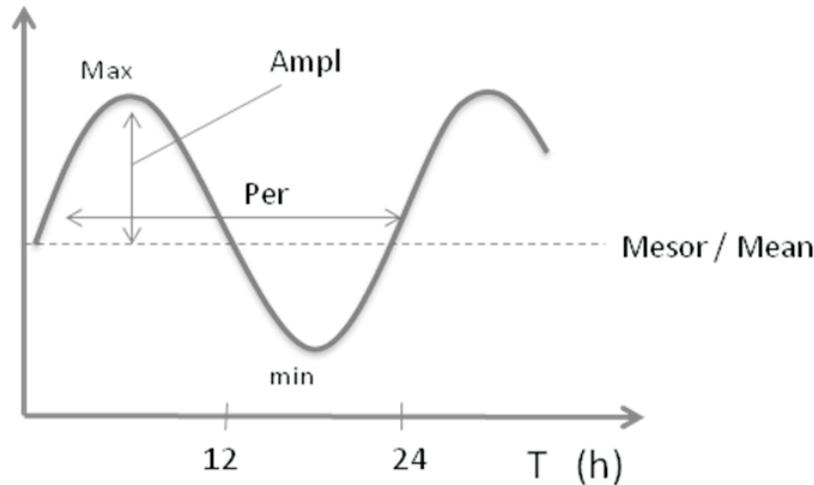


Figura 4. Mapa de fases de um ritmo biológico. Um mapa de fases normal é indicativo de saúde de um indivíduo. Um ciclo completo é representado pelo Período (Per). Mesor é o valor médio de uma variável estudada calculado ao longo de um período completo. Amplitude (Ampl) é a diferença entre o valor médio e o máximo alcançado pela variável durante o período. A fase é normalmente caracterizada pela Acrofase que é o valor máximo alcançado pela variável biológica ao longo do dia. (Adaptado de ref. 12)

Figure 4. Biological Rhythm Phase Map. A normal phase map suggests a good healthy condition. A complete cycle is represented by the Period (Per). The Mean corresponds to the mean value of the studied variable, obtained during a complete period. The Amplitude (Ampl) corresponds to the difference between the mean and the maximum value during the period. The phase is characterized by the Acrophase which corresponds to the maximum value registered during the day. (Adapted from ref. 12)

Os parâmetros fundamentais deste mapa são:

Período (T) - é o intervalo de tempo entre dois acontecimentos idênticos, ou seja, é a duração de um ciclo completo;

Mesor - valor médio de uma variável, calculado ao longo de um período completo; Amplitude - diferença entre o mesor e o valor máximo alcançado pela variável durante o período;

Fase - valor instantâneo de uma variável num determinado momento. A fase é caracterizada pela Acrofase correspondendo ao valor máximo alcançado pela variável ao longo do dia.

Os mapas de fase podem modificar-se, nas amplitudes, em casos de dessincronizações, como acontece por exemplo nas viagens trans-meridionais (no sentido este-oeste), nos trabalhos que envolvem horários rotativos e em diversas afecções crónicas. Quando isto acontece, a resincronização não ocorre com a mesma velocidade para todos os componentes rítmicos^[12]. Os sincronizadores coordenam os ritmos biológicos e

The essential parameters of this map are follows:

Period (T) - the time gap between two similar events, e.g., the duration of a complete cycle;

Mesor - the mean value of a studied variable calculated along a complete period;

Amplitude - difference between the mean and the maximum value during the period;

Phase - instant value of a given variable at a certain moment.

Acrophase - characterizes the Phase, being the maximum value registered along the day.

The phase map may be modified, specially regarding its amplitude as it happens when dessincronization occurs. This is the case with transmeridional (east-west) travelling, events related with working time-shifts, and some chronic diseases. Here, resincronization does not occur at the same speed for all the rhythmical components^[12]. Synchronizers coordinate the biological rhythms and help to maintain the respective phase map. Thus, a phase map is a sign of the

ajudam à manutenção do seu mapa de fases característico.

Podemos então dizer que um mapa de fases normal é indicativo do estado de saúde do indivíduo. Este mapa pode ser alterado devido a diversos factores, sendo a dessincronização responsável pelo aparecimento do cansaço e do baixo rendimento de trabalho de um indivíduo.

Variações circadianas dos vários sistemas biológicos e clínica relacionada

Aceita-se que o aparecimento da patologia pode não ser influenciado pelo ritmo circadiano mas que a sua expressão pode ser alterada por eventos circadianos^[25]. Tal significa que cada patologia parece ter o seu ritmo biológico, onde o agravamento ou a melhoria de certos sinais e sintomas se verifica predominantemente em determinadas horas do dia, meses ou estações do ano.

individual's health condition. The map can be altered by several factors and, when it happens, this dessincronization is the main responsible for the associated appearance and performance changes, even at work.

Circadian variations of several biological systems and related clinical aspects

It seems that, although the pathology appearance may not be influenced by the circadian rhythm, its expression can be changed by circadian events^[25]. Thus, each pathology seems to have its biological rhythm, where the aggravation or the improvement of certain signs and symptoms may predominantly happen in a certain predetermined schedule, month or year season.

Tabela 1. Relação entre ritmos biológicos e algumas patologias e respostas fisiopatológicas. São ainda referidas algumas considerações farmacoterapêuticas adequadas relacionadas.

Table 1. Relationship between biological rhythms and some pathologies and pathophysiological responses. A few pharmacotherapeutical correlations are also established.

<i>Patologia Pathology</i>	<i>Evolução do Ritmo Rhythm evolution</i>	<i>Possíveis justificações Eventual justification</i>	<i>Relações farmacoterapêuticas Pharmacotherapeutical correlations</i>
<p>Cardiovascular</p> <ul style="list-style-type: none"> - EIM (enfarte agudo do miocárdio) - Morte súbita - Angina de peito - Arritmias - Insuficiência cardíaca congestiva - Acidentes vasculares - AMI (acute myocardial infarction) - Sudden death - Angor - Arrhythmia - Cardiac heart failure - Vascular accidents 	<p>Mais comuns ao acordar e nas primeiras horas da manhã (entre as 6 e as 12 h), para indivíduos que seguem ritmos sociais normais^{[11],[12],[26],[27]}.</p> <p>More common with waking and first hours in the morning (6 to 12 AM) in normal social rhythm individuals^{[11],[12],[26],[27]}.</p>	<ul style="list-style-type: none"> ➢ Elevada PA de manhã, implicando maior risco de trombose^[28] <i>High BP in the morning involving higher risk of thrombosis^[28]</i> ➢ pico de ruptura das placas de ateroma entre as 6h e as 12h^[29] <i>Atheroma ruptures peak occurs mostly from 6h to 12h AM^[29]</i> ➢ alterações no reflexo barorreceptor^[29] <i>Changes in the baroreceptor reflex^[29]</i> ➢ maior resistência da função cardíaca e respiratória em idosos^[29] <i>Higher resistance of cardiac and respiratory function in the elderly^[29]</i> ➢ perda da vasodilatação dependente do endotélio diária em doentes com doença arterial coronária^{[30],[31]} <i>Daily lost of endothelial related vasodilatation in patients with Ischemic Heart disease^{[30],[31]}</i> ➢ alterações na dinâmica do batimento cardíaco^[32] <i>Changes in heart rate dynamics^[32]</i> ➢ maior agregação plaquetária^[12] <i>Higher platelet aggregation^[12]</i> ➢ picos de secreção durante as primeiras horas da manhã de adrenalina, cortisol e testosterona; aumento da actividade do Simpático durante o dia e um aumento da actividade Parassimpático à noite^[33] <i>Secretion peaks of adrenalin, cortisol and testosterone in the fist hours in the morning; higher sympathetic activity during the day and parasympathetic in the evening^[33]</i> 	<ul style="list-style-type: none"> ➢ Antiagregantes da família dos salicilatos à noite, pois o efeito é prolongado e cobre as primeiras horas da manhã^{[11],[12]} <i>Salicilate related anti-aggregation drugs should be used in the evening showing long lasting effects, covering the first hours in the morning^{[11],[12]}</i> ➢ Nitratos de manhã, para darem uma protecção contra a angina de esforço durante todo o dia^[11]. Para os indivíduos que trabalham de noite a dose deve ser administrada no início da noite, para suportar o stress do tempo laboral^[11] <i>Nitrates should be used in the morning to protect against angor during the day^[11]. For those night workers, the drug should be given in the evening beginning to suport the working time stress^[11]</i> ➢ Bloqueadores β lipossolúveis apresentam um efeito máximo durante a manhã, podendo provocar bradicardia excessiva. As doses únicas devem ser administradas à noite se são utilizadas como anti-hipertensores, e de manhã se se utilizam como antianginosos^[11]. <i>B-blockers exhibit a maximum effect during the morning, eventually evoking bradycardia. Single dosis should be given in the evening to act as BP reducers, and in the morning used against angor^[11].</i>

Continuação
Continuation

<p>Respiratória <i>Respiratory</i></p>	<p>– Asma / <i>Asthma</i></p>	<p>Agrava durante a noite ^[34] <i>Worse in the evening</i> ^[34]</p>	<p>➤ aumento da resposta a uma hiperreactividade dos brônquios e das células inflamatórias ^[34] <i>More intense response to bronchic and inflammatory cells hiperreactivity</i> ^[34] ➤ posição corporal <i>body positionning</i> ➤ refluxo gastro-esofágico ^[12] <i>gastro-esofagic reflux</i> ^[12] ➤ ritmos diários do diâmetro dos brônquios e da secreção de cortisol e catecolaminas ^[12] <i>daily rhythms of bronchic diameter and cortisol and catecholamine secretion</i> ^[12]</p>	<p>➤ fraccionamento da dose de corticosteróides para que esta satisfaça melhor as necessidades nocturnas aumentadas ^[11] <i>it is common to split the corticoid dosis in order to meet the night (increasing)requirements</i> ^[11]</p>
<p>Endócrina <i>Endocrine</i></p>	<p>– Obesidade / <i>Obesity</i></p>	<p>Os níveis de leptina, glucose e insulina são mais elevados ao acordar e menores durante o sono ^[35] <i>Leptine, glucose and insuline levels are increased in the wakening period and lowered during the sleep</i> ^[35]</p>	<p>➤ Uma alteração no ciclo sono-vigília, como acontece nos trabalhadores por turnos, pode levar a um aumento da leptina diária circulante com menores níveis ao acordar o que, por influência da ingestão de alimentos e do balanço energético, pode levar a aumento da prevalência de obesidade nestes indivíduos ^[35] <i>Changes in the sleep-vigil cycle, as it happens with shift workers, may lead to a daily increase of the circulating leptine . This may involved reduced levels of leptine in the wakening that, by influence of feeding and energy balance, may induce the prevalence of obesity in these individuals</i> ^[35]</p>	
	<p>– Diabetes</p>	<p>Aumento dos níveis de glucose no sangue entre as 24h e as 6h e durante o sono ^[62] <i>Circulating glucose levels increase from 0H to 06h AM and during the sleep</i> ^[62]</p>	<p>➤ Ritmo circadiano e ciclo sono-vigília são factores que afectam a tolerância à glucose e as taxas de secreção de insulina ^[62] <i>Circadian rhythm and sleep-vigil cycle are factors affecting glucose tolerance and insulin secretion rates</i> ^[62]</p>	<p>➤ A administração de insulina deve ser sincronizada com as horas de actividade e de repouso, com menor necessidade durante a noite e maior pela manhã ^[11] <i>Insulin administration should be synchronised with activity and resting periods, since the needs differ in the evening (less) compared with mornings (more)</i> ^[11]</p>
<p>Reumatológica <i>Reumathological</i></p>	<p>– Artrite Reumatóide / <i>Rheumatiid arthritis</i></p>	<p>A dor articular mais importante nas primeiras horas da manhã ^[36] <i>Joint pain is consistently relevant in the first hours in the morning</i> ^[36]</p>	<p>➤ O pico de produção de citoquinas humanas (pró-inflamatórias) situa-se entre a noite e as primeiras horas da manhã ^[36] <i>Cytokine (pro-inflammation) production peaks from the evening to the first hours in the morning</i> ^[36] ➤ os níveis de cortisol (anti-inflamatório) estão mais baixos ^[36] <i>Cortisol (anti-inflammatory) levels are reduced</i> ^[36] ➤ os níveis de melatonina (pró-inflamatório) estão mais altos ^[36] <i>Melatonin ((pro-inflammation) levels are high</i> ^[36] ➤ fase luteínica nas mulheres (maiores níveis de estrogénio e progesterona) ^[36] <i>Lutein phase (higher levels of estrogens and progesterone)</i> ^[36]</p>	
	<p>– Gota / <i>Gout</i></p>	<p>Acessos predominantes a meio da noite ^[25] <i>Episodes are predominant in the middle of the nights</i> ^[25] <i>Episodes are predominant in the middle of the nights</i> ^[25]</p>		

Continuação
 Continuation

Neuro - Psiquiátricas Neuro - Psychiatric	– Depressão <i>Depression</i>	Mais acentuada na manhã, melhorando ao longo do dia até à noite ^[37] . Tem variação sazonal, agravando no Outono ^[12] / <i>Pronounced in the morning, improving until the evening. ^[37]. It is related with the year's season, being worst in the autumn ^[12]</i>	➤ menor secreção de serotonina e maior secreção de cortisol durante a manhã ^[37] / <i>Related with lower levels of serotonin and higher levels of cortisol in the morning ^[37]</i>	➤ A privação do sono tem sido descrita como terapêutica anti-depressiva por mais de 30 anos, mas o seu mecanismo de actuação é ainda controverso ^[38] / <i>Sleep deprivation has been described as anti-depressive for the last 30 years; however the mechanism involved is still not clear ^[38]</i> ➤ Fototerapia para síndromes afectivos sazonais ^[39] / <i>Phototherapy may be used in seasonal affective syndromes ^[39]</i>
	– Psicoses maniaco-depressivas <i>Maniac-depressive psychosis</i>	Periodicidade relacionada com os dias e com as semanas, ou até mesmo com as estações do ano ^[12] / <i>Periodic, related with the days, weeks or even with seasons ^[12]</i>		
	– Alterações no sono, variações de humor e avanços e recuos de fase de vários ritmos circadianos <i>Sleep alterations, humor changes and phase changes of biological rhythms</i>	Ainda não se sabe se estas alterações são causais ou relacionadas com a doença e/ou com a medicação ^{[38],[40]} / <i>Not clear if these are related with the rhythms, medication lor other ^{[38],[40]}</i>		
Reacções Alérgicas <i>Allergology</i>	– Rinite Alérgica <i>Allergic rhinitis</i>	Variação sazonal ^[12] / <i>Seasonal variation ^[12]</i>	➤ maior produção de histamina à noite, por volta das 23h e menor pela manhã ^[11] / <i>Histamine secretion is higher in the evening around 23h compared with the morning ^[11]</i>	➤ Os testes de alergologia devem sempre ser realizados de manhã, quando a resposta biológica é mínima ^[11] / <i>Allergy test should be conducted in the morning when biological response is minimal ^[11]</i>
Gastropatias <i>Gastropathies</i>	– Gastrite / Gastritis – Úlcera péptica / Peptic ulcer	Agravamento no início da manhã . As recidivas são mais frequentes na primavera ^[11] / <i>It gets worse in the morning . Recidive are frequent during spring ^[11]</i>	➤ secreção de ácido gástrico máxima pela manhã e mínima à noite ^[11] / <i>Gastric acid secretion is maximal in the morning, compared with the evening ^[11]</i>	➤ A administração de inibidores das bombas de prótons deve ser feita à noite ^[11] / <i>Proton inhibitors administration should take place in the night ^[11]</i>

Continuação
Continuation

<p>Anestesia <i>Anesthesia</i></p>	<p>– Injecção anestésica <i>Anesthetic injection</i></p>	<p>Duração do efeito pode variar em função da hora do dia ^[11] / <i>The effect duration may vary with the day hour</i> ^[11]</p>	<ul style="list-style-type: none"> ➤ diferenças no número de receptores ^[11] <i>Receptor number differences</i> ^[11] ➤ permeabilidade iónica das membranas neuronais ^[11] <i>Ionic permeability changes of neuron membrane</i> ^[11] ➤ outras modificações farmacocinéticas ^[11] <i>Other pharmacokinetic changes</i> ^[11] 	
<p>Oncologia <i>Oncology</i></p>		<p>Um dos primeiros sinais de malignidade celular é a perda de variação diária na mitose ^[12]</p> <p><i>One of the first signs of malignancy is the loss of mitosis daily variation</i> ^[12]</p>		<ul style="list-style-type: none"> ➤ A cronoterapia do cancro parece melhorar a tolerabilidade e a eficácia da medicação a curto prazo ^[11] <i>Cancer chronotherapy seems to improve short term drug tolerance and efficacy</i> ^[11] ➤ O 5-fluoracilo é melhor tolerado durante a fase de actividade ^[11] <i>5-fluouracile is better tolerated during activity phase</i> ^[11] ➤ A actividade da enzima que degrada o fluouracilo e a floxuridina tem a sua actividade máxima às 0 horas ^[11] <i>Activity of the degrading enzyme of fluouracile and floxuridine is maximal at 0 h</i> ^[11] ➤ A doxorubicina é menos tóxica se administrada de manhã ^[11] <i>Doxorubicina is less toxic if administered in the morning</i> ^[11] ➤ A cisplatina fixa-se melhor às proteínas plasmáticas durante a tarde, pelo que se correlaciona com a sua nefrotoxicidade ^[11] <i>Cisplatine is better connected to plasma proteins in the afternoon, fact that is related with its nephrotoxicity</i> ^[11]

A dessincronização dos ritmos biológicos ocorre por causas internas ou por causas externas ^[12]:

a) Internas

1. Alterações patológicas crónicas

As doenças crónicas, uma intervenção cirúrgica ou terapia intensiva, podem levar a alterações dos ritmos biológicos devido às mudanças na rotina do paciente, à presença de sinais rítmicos ambientais fracos, aos tratamentos a que estão sujeitos e à mobilidade/imobilidade do paciente. Estas alterações são, em muitos casos, corrigíveis, desde que os elementos sincronizadores dessa rotina ambiental sejam conhecidos ^[12].

Dessincronization of the biological rhythms may happen by internal or external causes ^[12]:

a) Internal

1. Chronic pathological alterations

Chronic diseases, surgery, or intensive therapy, can lead to biological rhythms alterations, mostly due to the patient's routine changes involved, including mobility / immobility, to the presence of weak environmental rhythmical signs, and to therapeutics. These alterations may, in many cases, be corrigible, if the synchronizers of the environmental routine are known ^[12].

2. Envelhecimento

À medida que a idade avança, a tolerância às trocas de horas diminui, o ciclo sono-vigília sofre alterações, sobretudo a nível da fase (o adormecer e o acordar acontecem mais cedo, e por vezes, a “sesta” torna-se mesmo necessária), e os estados depressivos aumentam^[12]. A Amplitude e o Período de diversos ritmos biológicos altera-se e perde-se a coordenação de muitos desses ritmos circadianos.

A razão destas alterações parece dever-se à degeneração celular dos NSQ^[12].

b) Externas

1. Relacionados com a actividade laboral

Os trabalhos em turno (horários rotativos) provocam sempre redução das horas de sono e, desde logo, alterações dos ritmos circadianos. Estas alterações podem levar a desordens com expressão clínica, com efeitos na saúde do próprio indivíduo, mas também na sua família e no seu desempenho profissional. Estas alterações podem ser devidas não só às alterações dos ritmos circadianos, mas também a outros factores sempre associados, como a privação do sono, o stress, os maus hábitos de alimentação, ou outras alterações sociais e comportamentais (álcool, tabaco e café)^{[2],[41]}. Por isso a úlcera péptica e a doença arterial coronária são doenças frequentemente associadas a este tipo de trabalhadores^[41]. A elevada incidência de abortos espontâneos, e de partos prematuros com baixo peso, são também comunmente referidos^[41]. A re-educação destes trabalhadores sobre como dormir, como se expor à luz, sobre a sua nutrição e de como lidar com medicamentos, pode beneficiar enormemente o quadro clínico esperado^{[25],[41]}.

2. Voos trans-meridionais

Os voos trans-meridionais permitem atravessar várias zonas horárias, mas o sistema circadiano do indivíduo permanece sincronizado com a hora do seu local de origem. A este fenómeno dá-se o nome de Jet Lag. O ajuste ao novo horário é lento efectuando-se a um ritmo de 60 minutos por dia depois de um avanço de fase (voos para Este) e de 90 minutos por dia depois de um recuo de fase (voos para Oeste)^[12]. No local de destino várias medidas de ajuste rápido do relógio biológico podem ser tomadas, adoptando de imediato as rotinas locais de refeição, de sono e sociais^[42]. Um pequeno almoço rico em proteínas e pobre em hidratos de carbono, incluindo cafeína, pode reduzir a probabilidade de voltar a adormecer^[42]. Quanto ao jantar, uma refeição pobre em proteínas e rica em hidratos de carbono parece promover a sonolência^[42].

2. Aging

With aging the tolerance to routine changes is reduced, sleep cycles changes with phase advancements (falling asleep and waking up happen earlier, and a siesta urge is sometimes required) and depressive states increase^[12]. Amplitude and Period reductions are also noticed, and the co-ordination of several circadian rhythms is lost. The reason for these alterations seems to be related with the SQN cellular degeneration^[12].

b) External

1. Related with the work

Rotating working time- shifts always reduces the sleep period and, therefore, circadian rhythms alterations emerge. These alterations can lead to several disorders with clinical expression, affecting the individual's health condition, his family and his professional performance. These alterations can be attributed to the circadian rhythms alterations, but also to other (always) associated facts such as sleep deprivation, stress, bad nutrition habits, or even to other social and behavioral habits (e.g. alcohol, tobacco and coffee)^{[2],[41]}. These alterations impact dramatically these workers, so that digestive ulcer and the arterial coronary disease, are most frequently associated pathologies^[41]. Some references on higher incidence of spontaneous abortions, and premature low weight births are also found^[41]. Re-education of these individuals, re-learning how to sleep, how to expose themselves to the light, how and when to eat properly and how to deal with medicines, may greatly reduce the expected clinical picture^{[25],[41]}.

2. Trans-meridional flights

With trans-meridional flights, several time zones are crossed, but the individual's original circadian system remains synchronized with its origin place. To this phenomenon we call Jet Lag. The adaptation to the new time-table is slow since it takes around 60 minutes in each day, after a phase advancement (flights to East) and 90 minutes / day after a phase delay (flights to West)^[12]. Reaching destination, several steps to accelerate the biological clock adaptation may be taken involving adoption of local time routines for meals, to sleep and even to socialize^[42]. A protein – rich breakfast, low in carbohydrates, with caffeine may reduce the probability of falling asleep^[42]. In the evening (dinner) a low protein high carbohydrate meal may promote drowsiness^[42].

A Pele Humana como modelo de aplicação da Cronobiologia

A pele humana constitui um bom modelo de estudo cronobiológico, conhecidos que são os ritmos de diversas das suas funções, e o papel central da luz solar como um oscilador secundário^[17].

As funções de protecção básica da pele (química, física, e biológica) depende da sua continuidade celular, mas também envolve outros intervenientes como as secreções cutâneas e a permeabilidade da barreira que controla a perda de água transepidermica. Muitos estudos têm sido dedicados á identificação das variações ciclicas da pele humana, influenciando as suas características, incluindo a sua permeabilidade e a absorção de produtos topicamente aplicados.

Applied chronobiology to the human skin

From the chronobiological view, the human skin is an excellent study model since the rhythm of many cutaneous functions is known, having in the solar light a central secondary oscillator^[17].

Basic protection functions of the skin (chemical, physical and biological) depends on its (cellular) continuity, but it also involves other intervenients such as cutaneous secretions, and the barrier permeability controlling transepidermal water. Many studies have been dedicated to identify the cyclic variations of human skin influencing its characteristics, including permeability and absorption of topically applied products.

Tabela 2. Caracterização cronobiológica da pele humana.

Table 2. Chronobiological characterization of the human skin.

Variável <i>Variable</i>	Evolução do Ritmo <i>Rhythm evolution</i>	Comentários <i>Comments</i>
Produção de sebo <i>Sebum production</i>	Máxima ao meio-dia e mínima à meia-noite ^[3] . Sensível ao <i>Cortisol</i> e dependente do seu ritmo ^[52,12] <i>Maximum at noon and minimal at midnight^[3]</i> <i>Sensitive to Cortisol and its circadian rhythm^[52,12]</i>	Este conhecimento detalhado corresponde á fronte facial; A redução das secreções sebácea e sudorípara á noite diminui a “barreira” epidérmica, e facilita a permeação transepidermica <i>This specific knowledge respects only the forehead; Reduction of sweat and sebum secretions in the night weakens epidermal “barrier” and facilitates transdermal permeation</i>
PTEA - Perda transepidermica de água <i>TEWL – Trans - epidermal water</i>	Valores mínimos de manhã (8 -10 horas) e máximos à noite (20 horas) ^[5] <i>Minimal in the morning (8 -10) and maximal at night (20)^[5]</i>	Existem dados contraditórios acerca deste assunto ^[3, 46] . O consumo de contraceptivos orais parece aumentar estes valores ^[47] . <i>This is still a controversial issue^[3, 46]. The regular use of oral contraceptives seems to potentiate the effect^[47].</i>
pH	Mais intenso durante o dia (14 -16 horas) e menor ao fim da tarde (20 horas) ^[15] , com um mínimo por volta das 4h ^[3] <i>More intense during the day (14 -16 o'clock) and reduced in the afternoon (around 20 o'clock)^[15], with its minimum estimated around 4 o'clock^[3]</i>	Resultados obtidos na face (queixo) e antebraço. O pH da pele varia entre 4 e 6.5 e os factores que o regulam ainda não são claros. Existem algumas contradições sobre a relação do pH com a PTEA ^[5] . <i>Results are referred to the face (chin) and forearm. Skin's pH ranges from 4 to 6.5 and its regulating factors are not totally known. Controversy still exists between TEWL and pH relationships^[5].</i>
Vascularização <i>Vascularization</i>	Menor de manhã, com um mínimo às 8h, e mais intensa ao fim da tarde e à noite, com um máximo entre as 20h e as 2h ^{[17],[4]} <i>Reduced in the morning with a minimum around 8 o'clock, and more intense by the end of the afternoon and evening; reaching its maximum values between 20 and 2 o'clock^{[17],[4]}</i>	Existe uma variação circadiana e ultradiana. A reduzida vascularização da pele pela manhã pode estar relacionada com os altos níveis de catecolaminas, o que promove o aumento da resistência vascular periférica ^[48] . O consumo de contraceptivos orais parece aumentar estes valores ^[47] . <i>A circadian and a ultradian rhythms are known. The reduced vascularization in the morning may be related with the high concentration of catecholamine which evokes a high peripheral vascular resistance^[48]. The regular use of oral contraceptives seems to potentiate the effect^[47].</i>

Continuação
Continuation

<p>Temperatura <i>Temperature</i></p>	<p>A temperatura de diversas regiões anatómicas (antebraço, face, dorso) parece variar ao longo do dia^[3,5]. A prevalência de prurido que caracteriza algumas doenças pode estar relacionada^[49]</p> <p><i>The temperature of several anatomical regions (forearm, face dorsum) seems to vary along the day^[3,5]. The pruritus prevalence is some diseases may be related^[49]</i></p>	<p>As alterações na barreira epidérmica não parecem estar relacionadas com esta variável^[5].</p> <p><i>Changes in the epidermal "barrier" function seems not to be related with this variable^[5].</i></p>
<p>Divisão celular <i>Cellular division</i></p>	<p>Não se verificam variações circadianas na proliferação celular mas a síntese epidérmica de DNA é maior à noite, atingindo com um pico à 1h^[43,17]</p> <p><i>There are no identified circadian variation of cell proliferation, but epidermal DNA synthesis increases in the night with a peak around 1 o'clock^[43,17]</i></p>	<p>Pode estar relacionada com o maior fluxo sanguíneo.</p> <p><i>Maybe related with higher blood flow</i></p>
<p>Reações inflamatórias da pele e dos seus anexos <i>Inflammatory reactions of skin and annex</i></p>	<p>Mais intensas à noite e menores durante o dia, com um pico máximo pelas primeiras horas da manhã^{[4],[44]}</p> <p><i>More intense in the night and reduced during the day, reaching a peak in the first morning hours^{[4],[44]}</i></p>	<p>Relacionada com a actividade anti-inflamatória do Cortisol^[52, 12].</p> <p><i>Related with the anti-inflammatory activity of Cortisol^[52, 12].</i></p>
<p>Hidratação <i>Hydration</i></p>	<p>Dados são ainda contraditórios, não se provando a sua variação ultradiana^[3,5]</p> <p><i>Data are still contradictory and its ultradian variation is not yet proved^[3,5]</i></p>	

Aparentemente, durante a noite, a “barreira” epidérmica está diminuída e portanto a sua permeabilidade aumentada, devendo ser esta a melhor hora para a aplicação de produtos tópicos^[5,50].

A geografia e as estações do ano determinam as diferentes condições ambientais e climáticas que em muito influenciam o comportamento da pele humana (Tabela 3). É conhecido como a radiação solar, a temperatura e a humidade, podem afectar a integridade e o desempenho das funções da pele. O chamado Factor Humectante Natural (FHN), está presente no estrato córneo e influencia o seu conteúdo de água. Sabe-se que estas variações sazonais modificam a composição do FHN no estrato córneo (Tabela 3)^[54].

Apparently, during the night, the epidermal "barrier" is reduced and its permeability is increased, meaning that this is probably the best time to apply topical medicines^[5,50].

The weather and the environment conditions changes with the geographical location and with the different year seasons (Table 3). The solar radiation, the temperature and the humidity greatly influence human skin functions. The so-called Natural Moisturizing Factor (NMF) is present in the stratum corneum and influences its water content^[54]. It is known that the referred seasonal variations modify the NMF composition in the stratum corneum.

Also, the skin oxygen free radical neutralizers including catalase, superoxide dismutase and glutathione superoxidase, and antioxidant such as vitamin E, glutathione ascorbate and the uric acid normally prevent the potential damage evoked by solar light, the ozone and many gaseous pollutants as main sources of free radicals^[55]. Seasonal variations modify the activity of some of these protection mechanisms (Table 3).

Tabela 3. Alterações biológicas da pele relacionáveis com as condições climáticas ao longo do ano.
Table 3. Skin biological changes related with the climate conditions along the year

Inverno <i>Autumn / Winter</i>	Notas relacionadas <i>Related notes</i>
<p><i>Dermatites</i> mais incidentes quando a temperatura e a humidade relativa são baixas^[53]</p> <p><i>Higher incidence of Dermatitis when temperature and relative humidity drop down</i>^[53]</p>	<p>➤ No inverno, a diminuição da hidratação da epiderme pode determinar o aparecimento de fissuras, pele seca, descamativa, prurido e com a elevada prevalência de dermatites^[53] justificando a utilização frequente de hidratantes tópicos</p> <p><i>In winter, reduction of skin's hydration may evoke fissures, dryness, scaling, pruritus and an increase of the incidence of dermatitis, [53] justifying the frequent use of topical moisturizers</i></p>
<p>Menores níveis de lactato, potássio, sódio e cloreto no estrato córneo^[54] implicando desidratação, redução da biomecânica e pH mais elevado^[54]</p> <p><i>Lower levels of lactate. Potassium, Sodium, and Chloride in the stratum corneum, implying dehydration, reduction of skin biomechanics and higher pH levels</i>^[54]</p>	<p>➤ Apesar das diferentes correlações destes iões inorgânicos com as diferentes propriedades físicas da pele, a sua presença reduzida no inverno sugere maior fragilidade da pele, ou seja, menor hidratação, maior dureza e pH mais elevado^[54]</p> <p><i>No matter the different correlations established for these inorganic ions with the physical properties of the skin, their reduction in winter compromises skin's physiology; a reduced hydration evokes stiffness and higher pH</i>^[54]</p>
<p>Maior conteúdo em aminoácidos^[54]</p> <p><i>Higher content in aminoacids</i>^[54]</p>	<p>➤ A quantidade em aminoácidos no estrato córneo influencia o estado de hidratação da epiderme^{[54],[60]} contribuindo para a sua biomecânica^[61] em doentes com pele atópica, ictiose vulgaris e xerose senil.</p> <p><i>The stratum corneum aminoacid concentration influences the epidermal hydration content [54],[60] contributing to its biomechanics [61] in atopic, ictiose vulgaris and senile xerosis patients.</i></p>
Primavera / Verão <i>Spring / Summer</i>	
<p>Maiores níveis de peróxidos lipídicos por redução da actividade da catalase neste período^[55]</p> <p><i>Higher levels of lipidic peroxides by seasonal reduction of catalase activity</i>^[55]</p>	<p>➤ A exposição solar observada durante o verão, reduz a actividade da catalase. A neutralização dos radicais livres de oxigénio na pele perde eficiência, enquanto que a actividade da superóxido dismutase não sofre alterações^[55].</p> <p><i>Summer sun exposure reduces catalase activity. Neutralization of oxygen free radicals is less efficient, while the superoxide dismutase activity shows no change</i>^[55].</p> <p>➤ O sebo facial, característica da chamada Pele gorda, tem os seus valores mais elevados na estação mais quente, com valores mínimos nas estações moderadas</p> <p><i>Facial sebum, a main component of the so called Oily Skin type, shows higher values during the heat season, compared with other moderate season conditions.</i></p>
<p>A temperatura e vascularização da pele estão aumentadas</p> <p><i>Skin temperature and vascularization are increased</i></p>	<p>➤ Estas variações são mais pronunciadas nas mulheres que nos homens^[56]</p> <p><i>These variations are more pronounced in women than in men</i>^[56]</p>

Outro exemplo envolve os neutralizadores de radicais livres de oxigénio como a catalase, a superóxido dismutase, a glutathiona-superoxidase, e antioxidantes como a vitamina E, o ascorbato de glutathiona e o ácido úrico [55] normalmente presentes na pele para neutralizar os radicais livres produzidos pela luz solar, pelo ozono e pela exposição a outros poluentes gasosos [55]. As variações sazonais modificam a actividade de alguns destes mecanismos de protecção (Tabela 3).

Em conclusão torna-se evidente que o conhecimento já acumulado proveniente da cronobiologia cutânea oferece imensas possibilidades de aplicação. O desenvolvimento de produtos cosméticos e de higiene corporal mais eficazes é, provavelmente, um dos exemplos mais ilustrativos desse potencial, justificando a enorme popularidade destes produtos nos últimos anos. Na actualidade, a maioria dos estudos desenvolvidos no âmbito da fisiologia cutânea ou da farmacologia aplicada á pele, incluindo a dermatologia cosmética, exibem um conjunto de princípios da cronobiologia, no seu desenho experimental. Informações sistematicamente tidas em contas incluem a hora em que os dados de cada variável são obtidos, a estação do ano, e as condições de temperatura, humidade e luminosidade em que os resultados foram obtidos. Estes princípios são, de facto essenciais para garantir uma boa prática científica, e ilustram bem a importância destas matéria no desenvolvimento do conhecimento humano.

In conclusion, it is clear that cutaneous chronobiology knowledge offers today many application possibilities. Development of more efficient cosmetic products is probably one of the main causes of its wide spreading popularity and a clear reflection of the application of different chronobiological concepts. In fact, basic chronobiological principles are systematically found in the study design of skin physiology and applied skin pharmacology studies, including cosmetic dermatology. The time of the day in which the variables are obtained, the year season, and the local temperature humidity and lighting are, amongst others, systematically considered. These principles are obviously essential to ensure a good scientific practice, and illustrates the importance of these matters in the development of the human knowledge.

Referências / References

- [1].Mehling A, Fluhr JW. Chronobiology: Biological clocks and rhythms of the skin. *Skin Pharmacol Physiol* 2006; 19: 182-189.
- [2].Waterhouse J, Minors D, Atkinson G, Benton D. Chronobiology and meal times: internal and external factors. *Br J Nutr* 1997; 77: S29-S38.
- [3].Le Fur I, Reinberg A, Lopez S, Morizot F, Mechkouri M, Tschachler E. Analysis of circadian and ultradian rhythms of skin surface properties of face and forearm of healthy women. *J Invest Dermatol* 2001; 117: 718-724.
- [4].Yosipovitch G, Sackett-Lundeen L, Goon A, Yiong Huak C, Leok Goh C, Haus E. Circadian and ultradian (12h) variations of skin blood flow and barrier function in non-irritated and irritated skin-effect of topical corticosteroids. *J Invest Dermatol* 2004; 122: 824-829.
- [5].Yosipovitch G, Xiong GL, Haus E, Sackett-Lundeen L, Ashkenazi I, Maibach HI. Time-dependent variations of the skin barrier function in humans: transepidermal water loss, stratum corneum hydration, skin surface pH, and skin temperature. *J Invest Dermatol* 1998; 110: 20-23.
- [6].Weber MA, Fodera SM. Circadian variations in cardiovascular disease: chronotherapeutic approaches to the management of hypertension. *Rev Cardiovasc Med* 2004; 5: 148-155.
- [7].Swaab DF, Van Someren EJ, Zhou JN, Hofman MA. Biological rhythms in the human life cycle and their relationship to functional changes in the suprachiasmatic nucleus. *Prog Brain Res* 1996; 111: 349-368.
- [8].Levi F, Halberg F. Circaseptan (about-7-day) bioperiodicity – spontaneous and reactive – and the search for pacemakers. *Ric Clin Lab* 1982; 12: 323-370.
- [9].Epidermal and Sensory Research and Investigation Centre. Circadian cycles: the rhythms of life. *Dermatology Nursing*

2002; 14: 173-176.

- [10].Gomes RK. Cronobiologia. In: URL: http://www.revistapersonalite.com.br/cronobiologia_54.php
- [11].Martínez-Carpio PA, Corominas A. Introducción general a la cronobiología clínica y a la manipulación terapéutica de los ritmos biológicos. *Med Clin (Barc)* 2004; 123 (6): 230-5.
- [12].Cardinali DP. Ritmos Biológicos. In: Ariznavarreta C, Cachofeiro V, Cardinali D, Escrich E, Gil Loyzaga P, Lahera Juliá V, Mora Teruel F, Romano Pardo M, Tamargo Menéndez J, editors. *Fisiología Humana*. 3rd ed. J.A.F. Tresguerres; 2005. p. 1119-1133.
- [13].Escobar C, Martínez-Merlos MT, Ángeles M, Mendoza JY. El alimento como sincronizador de los ritmos biológicos: su relevancia para la identificación de un oscilador circadiano. *Rev Fac Med UNAM* 2001; 44: 58-61.
- [14].Markus RP, Junior EB, Ferreira ZS. Ritmos Biológicos: entendendo as horas, os dias e as estações do ano. *Einstein* 2003; 1:143.
- [15].Tafner MA. O Sono, Sua Estrutura e Monitoração. Universidade Federal de Santa Catarina. In: URL:<http://www.cerebromente.org.br/n12/mente/sono.html>
- [16].Moura T, Catarino T. Princípios Gerais de Endocrinologia. Universidade Nova de Lisboa, Faculdade de Ciências e Tecnologia 2004. In: URL: http://www.dq.fct.unl.pt/cadeiras/fisiolcel/main/PDF/seminarios/Endocrino_res_2.pdf
- [17].Henry F, Arrese JE, Claessens N, Piérard-Franchimont C, Piérard GE. La peau et son horloge chronobiologique au quotidien. *Rev Med Liege* 2002; 57: 10: 661-665.
- [18].Bolles RC, Stokes LW. Rat's anticipation of diurnal and a-diurnal feeding. *J Comp Physiol Psychol* 1965; 60: 290-294.
- [19].Stephan FK, Swann JM, Sisk CL. Anticipation of 24 hr feeding schedules in rats with lesions of the suprachiasmatic nucleus. *Behav Neural Biol* 1979; 25: 346-363.
- [20].Hamada T, Ootomi M, Horikawa K, Niki T, Wakamatu H, Ishida N. The expression of the melatonin synthesis enzyme: arylalkylamine N-acetyltransferase in the suprachiasmatic nucleus of rat brain. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 258: 772-777
- [21].Markus RP. Cronofarmacologia e Melatonina - o hormônio que marca o escuro. SBPC/Labjor - Brasil 2001. In. URL: <http://www.comciencia.br/reportagens/farmacos/farma17.htm>
- [22].Stone BM, Turner C, Mills SL, Nicholson NA. Hypnotic activity of melatonin. *Sleep* 2000; 23: 663-669.
- [23].Young MW, Kay SA. Time zones: a comparative genetics of circadian clocks. *Nat Rev Genet* 2001; 2: 702-715.
- [24].Joe J. A cronobiologia em busca do tempo perdido. In. URL: <http://www.sinpro-rs.org.br/extra/jun01/ciencia.asp>
- [25].Klerman EB. Clinical aspects of Human Circadian Rhythms. *JBR* 2005; 20: 375-386.
- [26].Cohen MC, Rohtla KM, Lavery CE, Muller JE, Mittleman MA. Meta-analysis of the morning excess of acute myocardial infarction and sudden cardiac death. *Am J Cardiol* 1997; 79: 1512-1516.
- [27].Elliot WJ. Circadian variation in the timing of stroke onset: a meta-analysis. *Stroke* 1998; 29: 992-996.
- [28].White WB. Relevance of blood pressure variation in the circadian onset of cardiovascular events. *J Hypertens* 2003; 21: S9-S15.
- [29].Klawe JJ, Tafil-Klawe M, Sikorski W, Szajnoch W, Jeske K. Age-related circadian variations of cardiac and respiratory components of the carotid baroreflex in humans. *J Physiol Pharmacol* 2004; 55: S83-S88.
- [30].Shaw JA, Chin-Dusting JPF, Kingwell BA, Dart AM. Diurnal variation in endothelium-dependent vasodilatation is not apparent in coronary artery disease. *Circulation* 2001; 103: 806-812.
- [31].Otto ME, Svatikova A, Barretto RB, Santos S, Hoffmann M, Khandheria B, Somers V. Early morning attenuation of endothelial function in healthy humans. *Circulation* 2004; 109: 2507-2510.
- [32].Hu K, Ivanov PC, Hilton MF, Chen Z, Ayers RT, Stanley HE, Shea SA. Endogenous circadian rhythm in an index of cardiac vulnerability independent of changes in behavior. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 18223-18227.
- [33].Furlan R, Guzzetti S, Crivellaro W, Dassi S, Tinelli M, Baselli G, Cerutti S, Lombardi F, Pagani M, Malliani A. Continuous 24-hour assessment of the neural regulation of systemic arterial pressure and RR variabilities in ambulant subjects. *Circulation* 1990; 81: 537-547.
- [34].Kelly EA, Houtman JJ, Jarjour NN. Inflammatory changes associated with circadian variation in pulmonary function in subjects with mild asthma. *Clin Exp Allergy* 2004; 34: 227-233.
- [35].Shea SA, Hilton MF, Orlova C, Ayers RT, Mantzoros CS. Independent circadian and sleep/wake regulation of adipokines and glucose in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 2537-2544.
- [36].Cutolo M, Masi AT. Circadian rhythms and arthritis. *Rheum Dis Clin North Am* 2005; 31: 115-129.
- [37].Adalbertotripicchio. Cronobiologia (Ritmos Biológicos). Ritmopatias em Psicopatologia - parte II. 2007. In: URL: <http://www.redepsi.com.br/portal/modules/smartsection/item.php?itemid=807>
- [38].Boivin DB. Influence of sleep-wake and circadian rhythm disturbances in psychiatric disorders. *J Psychiatry Neurosci* 2000; 25: 446-458.
- [39].Marques N, Menna-Barreto L. Cronobiologia: Princípios e Aplicações. Ed. Ponto & Linha. In: URL: http://books.google.pt/books?id=Y015kohj5oEC&pg=PA160&lpg=PA160&dq=cronobiologia+e+depress%C3%A3o&source=b1&ots=8Y4hI2a2uV&sig=fUrRiDPuQlZDzn6JR_D61eEYg48&hl=pt-PT&ei=xdoSSvmxDY2O_Qb55cGjDw&sa=X&oi=book_result&ct=result&resnum=6#PPA7,M1
- [40].Martin JL, Jeste DV, Ancoli-Israel S. Older schizophrenia patients have more disrupted sleep and circadian rhythms than age-matched comparison subjects. *J Psychiatr Res* 2005; 39: 251-259.
- [41].Knutsson A. Health disorders of shift workers. *Occup Med (London)* 2003; 53: 103-108.
- [42].Amaral R. Dados actuais sobre a influência do síndrome de mudança de fuso horário (jet lag) na performance em futebol.

- Revista Digital - Buenos Aires 2003. Universidade do Porto. In: URL: <http://www.efdeportes.com/efd63/jetlag.htm>
- [43].Gelfant S. Circadian rhythms and differences in epidermal and dermal cell proliferation in involved and uninvolved psoriatic skin. *J Invest Dermatol* 1982; 78: 58-62.
- [44].Haus E, Smolensky MH. Biologic rhythms in the immune system. *Chronobiol Int* 1999; 16: 581-622.
- [45].Reinberg A, Reinberg MA. Circadian changes of the duration of action of local anaesthetic agents. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 1977; 297: 149-152.
- [46].Smith HA, Pinnagoda J, Tupker RA, Burema J, Coenraads PJ, Nater JP. Variability in transepidermal water loss of the skin: evaluation of a method to assess susceptibility to contact dermatitis in epidemiological studies. *Int Arch Occup Environ Health* 1990; 62: 509-512.
- [47].Reinberg AE, Touitou Y, Soudant E, Bernard D, Bazin R, Mechkouri M. Oral contraceptives alter circadian rhythm parameters of cortisol, melatonin, blood pressure, heart rate, skin blood flow, transepidermal water loss, and skin amino acids of healthy young women. *Chronobiol Int* 1996; 13: 199-211.
- [48].Elherik K, Khan F, McLaren M, Kennedy G, Belch JFF. Circadian variation in vascular tone and endothelial cell function in normal males. *Clin Sci* 2002; 102:547-552.
- [49].Refinetti R, Menaker M. The circadian rhythm of body temperature. *Physiol Behav* 1992; 51: 613-637.
- [50].Pershing LK, Corlett JL, Lambert LD, Poncelet CE. Circadian activity of topical 0.05% betamethasone dipropionate in human skin in vivo. *J Invest Dermatol* 1994; 102: 734-739.
- [51].Fuchs E. Skin stem cells: rising to the surface. *J Cell Biol* 2008; 180: 273-284.
- [52].Ballone GJ. Suprarrenais e Estresse. *PsiquWeb* 2005. In: URL: <http://www.psiqweb.med.br>
- [53].Uter W, Gefeller O, Schwanz HJ. An epidemiological study of the influence of season (cold and dry air) on the occurrence of irritant skin changes of the hands. *Br J Dermatol* 1998; 138: 266-272.
- [54].Nakagawa N, Sakai S, Matsumoto M, Yamada K, Nagano M, Yuki T, Sumida Y, Uchiwa H. Relationship between NMF (lactate and potassium) content and the physical properties of the stratum corneum in healthy subjects. *J Invest Dermatol* 2004; 122: 755-763.
- [55].Hellems L, Corstjens H, Neven A, Declercq L, Maes D. Antioxidant enzyme activity in human stratum corneum shows seasonal variation with an age-dependent recovery. *J Invest Dermatol* 2003; 120: 434-439.
- [56].Gardner-Medwin JM, MacDonald IA, Taylor JY, Riley PH, Powell RJ. Seasonal differences in finger temperature and microvascular blood flow in healthy men and women are exaggerated in women with primary Raynaud's phenomenon. *Br J Clin Pharmacol* 2001; 52: 17-23.
- [57].Menon GK, Elias PM, Lee SH, Feingold KR. Localization of calcium in murine epidermis following disruption and repair of the permeability barrier. *Cell Tissue Res* 1992; 270: 503-512.
- [58].Denda M, Katagiri C, Hirao T, Maruyama N, Takahashi M. Some magnesium salts and mixture of magnesium and calcium salts accelerate skin barrier recovery. *Arch Dermatol Res* 1999; 291: 560-563.
- [59].Hennings H, Holbrook KA, Yuspa SH. Potassium medication of calcium-induced terminal differentiation of epidermal cells in culture. *J Invest Dermatol* 1983; 81: 50S-55S.
- [60].Horii I, Nakayama Y, Obata M, Tagami H. Stratum corneum hydration and amino acid content in xerotic skin. *Br J Dermatol* 1989; 121; 585-592.
- [61].Jokura Y, Ishikawa S, Tokuda H, Imokawa G. Molecular analysis of elastic properties of the stratum corneum by solid-state ¹³C-nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J Invest Dermatol* 1995; 104: 806-812.
- [62].Van Cauter E, Polonsky KS, Scheen AJ. Roles of circadian rhythmicity and sleep in human glucose regulation. *Endocr Rev* 1997; 18: 716-738.