



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS - UFAL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

ALINE CRISTINE PEREIRA E SILVA

**ESTUDO DA RELAÇÃO ENTRE CRONOTIPOS, TRAÇOS DE ANSIEDADE,
TRAÇOS DE DEPRESSÃO E POLIMORFISMOS EM GENES CIRCADIANOS EM
UMA AMOSTRA DA POPULAÇÃO DE ALAGOAS**

Maceió
2013

ALINE CRISTINE PEREIRA E SILVA

**ESTUDO DA RELAÇÃO ENTRE CRONOTIPOS, TRAÇOS DE ANSIEDADE,
TRAÇOS DE DEPRESSÃO E POLIMORFISMOS EM GENES CIRCADIANOS EM
UMA AMOSTRA DA POPULAÇÃO DE ALAGOAS**

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Alagoas para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Dr. Tiago Gomes de Andrade

Maceió
2013

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecária Responsável: Fabiana Camargo dos Santos

S586e Silva, Aline Cristine Pereira e.

Estudo da relação entre cronotipos, traços de ansiedade, traço de depressão e polimorfismos em genes circadianos em uma amostra da população de Alagoas / Aline Cristine Pereira e Silva. – 2013.
92 f. : il.

Orientador: Tiago Gomes de Andrade.
Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Maceió, 2013.

Bibliografia: f. 78-87.
1. Cronotipo. 2. Ansiedade – Traços. 3. Depressão – Traços. 4. Jet lag.
5. Genes circadianos – Polimorfismo. I. Título.

CDU: 616.89-008



Universidade Federal de Alagoas
Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

ICBS - UFAL – Campus A. C. Simões
Av. Lourival Melo Mota, S/N
Cidade Universitária – Maceió-AL
CEP: 57072-900
E-mail: ppgcs9@gmail.com
Fone: 82 3214 1850

Defesa da Dissertação de Mestrado da mestranda Aline Cristine Pereira e Silva, intitulada: “Estudo da relação entre cronotipos, ansiedade, depressão e polimorfismos de genes circadianos em uma amostra da população de Alagoas”, orientada pelo Prof. Dr. Tiago Gomes de Andrade, apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde, da Universidade Federal de Alagoas, em 06 de março de 2013.

Os membros da Banca Examinadora consideraram a candidata

Aprovada

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Daniel Leite Góes Gitaí – (ICBS/UFAL)

Prof. Dr. Raner Miguel Ferreira Póvoa - (Instituto de Psicologia/UFAL)

Prof. Dr. Mário Pedrazzoli Neto – (USP)

***Com carinho, dedico a Deus e à minha
família***

AGRADECIMENTOS

- *Ao meu orientador, professor Dr. Tiago Gomes de Andrade pelos seus ensinamentos, confiança e paciência.*
- *Aos meus pais, João e Maria, pelo incentivo, carinho e compreensão.*
- *As minhas irmãs, Anapuan e Jaciara pela amizade, compreensão e apoio.*
- *Aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular e Expressão Gênica, Daniel, Mayara, Priscila, Anapuan e Gabriela que me ajudaram nesse trabalho.*
- *Ao professor Dr. Daniel Leite Goes Gitaí, pela contribuição, estímulo e pela disponibilidade do laboratório.*
- *As minhas colegas do Laboratório de Biologia Molecular, Bruna, Thalita, Erverlin e Mikaela, pelo carinho, incentivo e ajuda.*
- *Aos professores Dr. Raner Miguel Ferreira Póvoa e Dr. Mário Pedrazzoli Neto pela contribuição que deram a este trabalho.*
- *A todos os meus professores, desde a alfabetização até a pós-graduação, pelo apoio e por compartilharem seus conhecimentos.*
- *Aos colegas da pós-graduação que me ajudaram a crescer cientificamente.*
- *Aos meus tios, Leonora e Sebastião pelo carinho e acolhimento.*
- *À minha tia Maria Cícera e à minha prima Aline, pelo carinho com que me receberam.*
- *Ao Campus Arapiraca, onde está localizado o nosso laboratório, pela contribuição.*
- *Ao CNPq, CAPES e FAPAL pelo apoio financeiro que deram para a realização deste trabalho.*
- *A todos as pessoas que trabalham na UFAL, desde a direção até a limpeza.*

Bem aventurado é o homem que acha sabedoria e adquire conhecimento, pois a sabedoria vale mais do que a prata e rende mais do que o ouro. Mais preciosa é do que rubis, e nada do que se possa desejar se compara a ela.

Provérbios 3 :13-15

RESUMO

Os ritmos circadianos são ciclos de aproximadamente 24 horas, regulados por um oscilador central e controlados por sincronizadores externos. Durante as últimas décadas, houve um grande interesse em estudar a relação entre ritmos circadianos e distúrbios comportamentais, tais como transtorno de ansiedade e depressão. O cronotipo vespertino tem sido proposto como fator de vulnerabilidade para desenvolvimento dessas alterações. Além disso, estudos moleculares da ritmicidade circadiana envolvendo preferência circadiana e/ou doenças psiquiátricas também conquistaram um grande espaço na pesquisa científica. Polimorfismos em genes circadianos têm sido associados tanto à preferência circadiana quanto a transtornos de humor e ansiedade em diferentes populações. O objetivo desse trabalho foi realizar um estudo da relação entre cronotipos, traços de ansiedade, traços de depressão e polimorfismos em genes circadianos em uma amostra da população de Alagoas. Foram aplicados 644 questionários para a determinação dos cronotipos e dos traços de ansiedade e depressão em indivíduos de 16-25 anos de idade. Dos 644 sujeitos, 144 responderam também ao questionário de cronotipo de Monique para a avaliação da influência do *Jet lag* social nesses distúrbios. Para a análise dos polimorfismos, o DNA de 180 indivíduos foi extraído. A genotipagem dos sujeitos foi realizada através das técnicas de PCR para o polimorfismo VNTR do gene *Per3* e PCR-RFLP para os polimorfismos C111G do gene *Per2* e T3111C do gene *Clock*. Uma diferença significativa foi encontrada entre as medianas dos três questionários em relação aos sexos masculino e feminino. Uma correlação positiva foi encontrada entre os escores de ansiedade e depressão ($p < 0,001$). Houve uma correlação negativa entre os escores dos questionários de cronotipo e depressão, em ambos os sexos ($p < 0,05$). Já em relação aos questionários de cronotipo e ansiedade, houve uma correlação negativa apenas no subgrupo do sexo masculino. Houve uma correlação positiva entre os valores de depressão e *jet lag* social ($p < 0,05$). Nenhuma correlação foi encontrada entre *jet lag* social e cronotipo, acessado pelo MEQ ($p > 0,05$). Não houve diferença significativa entre as frequências alélicas e genotípicas dos três polimorfismos em relação aos cronotipos e os traços de ansiedade e depressão. As frequências alélicas dos três polimorfismos encontradas na população estudada foram 0,752 para o alelo 3111T e 0,247 para o 3111C do gene *Clock*; 0,944 para o alelo 111C e 0,56 para o alelo 111G do *Per2*; e 0,644 para o alelo de 4 repetições e 0,356 para o alelo de 5 repetições para o gene *Per3*. Em relação ao efeito combinado entre os três polimorfismos, nenhuma diferença foi encontrada entre as frequências dos genótipos dos três polimorfismos e preferência circadiana ou alterações do humor. Nossos resultados demonstram que as mulheres tendem a serem mais matutinas, depressivas e ansiosas que os homens. Comparado com os matutinos, indivíduos vespertinos apresentam maiores escores de depressão, em ambos os sexos, e ansiedade, apenas no sexo masculino. Além disso, os escores de depressão foram associados com o *jet lag* social, independentemente do cronotipo (acessado por MEQ), demonstrando que o desalinhamento entre os ritmos biológicos e os ritmos sociais pode contribuir para o desenvolvimento de distúrbios psiquiátricos.

Palavras-Chave: Cronotipo, Traços de Ansiedade, Traços de Depressão, Jet Lag Social, Genes Circadianos.

ABSTRACT

Circadian rhythms are approximately 24-hour cycles regulated by a central pacemaker and synchronized by external factors. During the last decades, there was an increase in studies involving the relationship between circadian rhythms and behavior alterations such as anxiety and depression disorders. The evening type has been considered a risk factor for development of these disorders. Furthermore, molecular studies of the circadian rhythms involving circadian preference and/or psychiatry disorders have also conquered a great space on the scientific research. Polymorphisms in clock genes have been associated with circadian preference and anxiety and depression disorders in different populations. The aim of this work was studied the relationship between chronotypes, traces of anxiety, traces of depression and polymorphisms in circadian genes on a sample of the Alagoas population. A sample of 644 subjects, aging from 16 to 25 years, answered the questionnaires for determination of the chronotypes, traces of depression and traces of anxiety. From 644 subjects, 144 also answered the Munich Chronotype Questionnaire for evaluation of the social *jet lag* influence. For the polymorphism analyze, DNA from 180 subjects was extracted. The subjects were genotyped using PCR, for VNTR polymorphism in *Per3* gene, and PCR-RFLP, for C111G polymorphism in *Per2* gene e T3111C polymorphism in *Clock* gene. A significant median difference in gender was found on the three questionnaires ($p < 0.05$). A positive correlation was found between anxiety and depression scores ($p < 0.001$). There was a negative correlation between chronotype and depression scores in both genders ($p < 0.05$). In relationship to chronotype and anxiety scores, there was a negative correlation in men ($p < 0.05$), but not in women. A positive correlation was found between depression and jet lag scores ($p < 0.05$). No correlation was found between social jet lag and chronotype, accessed by MEQ ($p > 0.05$). Genotype and allele frequencies for the three polymorphisms did not differ significantly between any of the groups (mornings, intermediate and evenings) and mood alteration (anxiety and depression). Allele frequency for the three polymorphism found on the population was 0,752 for 3111T e 0.247 for 3111C in *Clock* gene; 0.944 for 111C e 0.56 for 111G in *Per2* gene; e 0.644 for 4-repetition e 0.356 for 5-repetitions in *Per3* gene. In relationship to the combined effects of three polymorphisms, there was no difference between genotype combination and circadian preference or mood alterations. Our results demonstrated that women tend to be more mornings type, depressive and anxious than men. Compared with mornings types, evenings showed higher scores of depression (both of sexes), and anxiety (in men). Depression scores were associated with social jet lag, independently of cronotype (accessed by MEQ), demonstrating that misalignment between of the circadian rhythms and social rhythms may contribute for psychiatric disorders.

Key Words: Chronotype, Trace of anxiety, Trace of depression, Social Jet Lag, Circadian Genes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Parâmetros para a definição de um ritmo hipotético.....	17
Figura 2- Classificação dos ritmos biológicos de acordo com sua frequência.....	17
Figura 3- Posicionamento dos núcleos supraquiasmáticos.....	19
Figura 4- Interação entre as subdivisões dos Núcleos Supraquiasmáticos.....	19
Figura 5- Alça de transcrição-tradução autoregulatória dos ritmos circadianos.....	21
Figura 6- Distribuição das frequências dos valores do MEQ, BAI e CES-D.....	47
Figura 7- Correlação entre MEQ, BAI e CES-D e os sexos masculino e feminino.....	50
Figura 8- Frequência dos sujeitos com traços depressivos e sem traços depressivos nos subgrupos vespertinos e matutinos.....	51
Figura 9- Correlação negativa entre MEQ e CES-D e positiva entre CES-D e <i>Jet lag</i> social.....	52
Figura 10- Correlação Positiva ente MSFsc e <i>Jet lag</i> Social e MEQ e MSFsc.....	52
Figura 11- Correlação ente MEQ e <i>Jet lag</i> Social e BAI e <i>Jet lag</i> Social.....	52
Figura 12- Correlação entre os valores de CES-D e <i>Jet Lag</i> Social nos subgrupos vespertino, intermediário e matutino.....	53
Figura 13- Imagem do gel de agarose 2% para visualização da amplificação da PCR de <i>Per2</i>	54
Figura 14- Imagem do gel de poliacrilamida 8% para a detecção do polimorfismo de <i>Per2</i>	55
Figura 15- Imagem do gel de agarose 2% para visualização da amplificação da PCR de <i>Clock</i>	55
Figura 16- Imagem do gel de agarose 2,5% para a detecção do polimorfismo de <i>Clock</i>	56
Figura 17- Imagem do gel de agarose 2% para visualização da amplificação da PCR de <i>Per3</i>	56
Figura 18- Percentagem de sujeitos com cada um dos genótipos de repetição em cada uma das categorias do questionário de BAI.....	61

Figura 19- Percentagem de sujeitos genótipos de repetição em cada uma das duas categorias do questionário de CES-D.....	61
Figura 20- Percentagem de sujeitos com cada um dos três genótipos do polimorfismo <i>Clock T311C</i> em cada uma das categorias do questionário de BAI.....	62
Figura 21 Percentagem de sujeitos dos três genótipos do polimorfismo <i>Clock T311C</i> em cada uma das categorias do questionário de BAI.....	62
Figura 22 Percentagem de sujeitos dos três genótipos do polimorfismo <i>Per2 C111G</i> em cada uma das categorias do questionário de BAI.....	63
Figura 23 Percentagem de sujeitos dos três genótipos do polimorfismo <i>Per2 C111G</i> em cada uma das categorias do questionário de BAI.....	63
Figura 24 Distribuição das frequências das combinações dos três polimorfismos nos subgrupos matutinos e vespertinos.....	65
Figura 25 Distribuição das frequências das combinações dos genótipos dos três polimorfismos nos subgrupos sem traços de depressão e com traços de depressão.....	66
Figura 26 Distribuição das frequências das combinações dos genótipos dos três polimorfismos nos subgrupos sem traços de ansiedade normal-leve moderado e traços de ansiedade moderado severo-severo.....	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Resumo dos artigos que encontraram associação entre fenótipos psiquiátricos e preferência circadiana.....	27
Tabela 2- Resumos dos principais estudos envolvendo a associação de fenótipos circadianos com genes do relógio.....	32
Tabela 3- Resumo dos principais estudos relacionado transtornos psiquiátricos com genes do relógio biológico.....	33
Tabela 4- Concentração dos reagentes para cada reação da PCR.....	42
Tabela 5- <i>Primers</i> e condições de amplificação.....	43
Tabela 6- Número de sujeitos em função do sexo para cronotipo.....	46
Tabela 7- Teste de Mann-Whitney para amostras independentes em relação ao sexo.....	49
Tabela 8- Teste χ^2 para comparação das categorias dos questionários de MEQ, BAI e CES-D em relação ao sexo.....	49
Tabela 9- Frequência dos genótipos nos grupos matutino, vespertino e intermediário para os polimorfismos T3111C de <i>Clock</i> e C111G de <i>Per2</i> e VNTR de <i>Pe3</i>	57
Tabela 10- Distribuição das frequências alélicas e genotípicas do T3111C de <i>Clock</i> e C111g de <i>Per 2</i> para a avaliação do equilíbrio de Hardy-Weinberg.....	58
Tabela 11- Frequência dos alelos nos grupos matutino, vespertino e intermediário para os polimorfismos T3111C de <i>Clock</i> , C111G de <i>Per2</i> e VNTR de <i>Pe3</i>	59
Tabela 12- Comparação entre os valores de BAI, CES-D e MEQ e os genótipos dos polimorfismos <i>Clock T311C</i> e <i>Per2 C111G</i>	60
Tabela 13- Combinação genotípica dos polimorfismos nos genes <i>Clock</i> , <i>Per2</i> e <i>Per3</i>	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BAI	Inventário de Ansiedade de BECK
CES- D	Escala de rastreamento populacional de depressão do Cento de Estudos Epidemiológicos
CK1ε	Casein Kinase 1 epsilon
dNTP	Deoxinucleotídio trifosfato
GABA	Ácido gama-amino-butírico
GRP	Polipeptídeo liberador vasoativo
I	Intermediário
MCTQ	<i>Munich Chronotype Questionnaire</i>
ME	Matutino extremo
MEQ	<i>Morningness-Eveningness Questionnaire</i>
MM	Matutino moderado
NSQ	Núcleo supraquiasmático
PAS	Per-Arnt-Sim (domínio protéico)
pb	Pares de bases
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
r.p.m.	Rotação por minuto
RFLP	<i>Restriction fragment length polymorphism</i>
RTH	Trato retinohipotalâmico
SFAS	Síndrome da fase atrasada do sono
SFAVS	Síndrome da fase avançada do sono
SNP	Single nucleotide polymorphism
SP	Substância P
TAS	Transtorno Afetivo Sazonal
U	Unidades
VE	Vespertino extremo
VIP	Polipeptídeo intestinal vasoativo
VM	Vespertino moderado
VNTR	Variable number of tandem repeat
μL	Microlitros

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1 Ritmos Biológicos.....	16
2.2 Ritmos Circadianos em Mamíferos.....	18
2.3 Mecanismos moleculares reguladores dos ritmos circadianos.....	20
2.4 Preferência Circadiana.....	22
2.5 Ritmos Circadianos e Transtornos Psiquiátricos.....	24
2.6 Polimorfismos em genes circadianos associados com preferência circadiana e transtornos psiquiátricos.....	28
3 JUSTIFICATIVA.....	34
4 OBJETIVOS.....	36
5 METODOLOGIA.....	38
5.1 Escolha dos sujeitos.....	39
5.2 Determinação dos Cronotipos.....	39
5.3 Determinação de Traços de Depressivos.....	40
5.4 Determinação de Traços de Ansiedade.....	40
5.5 Determinação do <i>Jet lag</i> Social e da Fase Média do Sono.....	41
5.6 Coleta e Extração de DNA.....	41
5.7 Detecção dos polimorfismos através das técnicas de PCR e PCR-RFLP.....	41
5.8 Análises Estatísticas.....	44
6 RESULTADOS.....	45
6.1 Análise dos Questionários.....	46
6.2 Análise de polimorfismos em genes circadianos.....	54

6.2.1 Polimorfismo C111G do Gene <i>Per2</i>	54
6.2.2 Polimorfismo T3111C do Gene <i>Clock</i>	55
6.2.3 Polimorfismo VNTR de <i>Per3</i>	56
6.3 Estudos das frequências genotípicas e alélicas.....	57
6.4 Estudos das interações entre polimorfismos.....	64
7 DISCUSSÃO.....	68
8 CONCLUSÕES.....	75
9 APÊNDICE.....	88
10 ANEXO.....	92

1 INTRODUÇÃO

Os ritmos biológicos estão presentes em todas as espécies desde bactérias até humanos. Dentre os ritmos biológicos estão ritmos circadianos que apresentam uma duração de aproximadamente 24 horas, podendo ser eventos bioquímicos, fisiológicos ou comportamentais importantes para sobrevivência. Estes ritmos são gerados endogenamente e controlados por sincronizadores externos como a luz e a alimentação.

A harmonização entre o sistema de temporização interno e a sincronização aos ciclos ambientais, como claro/escuro, permite uma capacidade antecipatória aos organismos. Assim, os seres vivos podem organizar recursos e se prepararem para eventos e atividades que sejam necessários à manutenção da vida.

Na sociedade humana, os horários de estudo e trabalho ocorrem geralmente entre 8 e 18 horas. A capacidade de sincronização a esses horários depende do cronotipo, que é a preferência individual de realizar atividades em determinadas horas do dia (manhã ou tarde). Indivíduos que não estão biologicamente sincronizados a tais horários sociais vivem num estado dessincronizado chamado de “*Jet lag*” social, por fazer alusão à alteração temporal sofrida por viajantes aéreos que passam por vários fusos horários.

Durante as últimas décadas, houve um grande interesse em estudar a relação entre ritmos biológicos e distúrbios comportamentais. A depressão e os transtornos de ansiedade são, provavelmente, os transtornos mentais que mais referências fazem aos ritmos circadianos devido às flutuações de seus sintomas. Estudos moleculares da ritmicidade circadiana envolvendo tipologia circadiana e/ou doenças psiquiátricas também conquistaram um grande espaço na pesquisa científica.

Esses estudos constituem o motivo para o desenvolvimento de hipóteses e teorias baseadas no desalinhamento dos ritmos circadianos na depressão e na ansiedade. Dentro dessa linha, este estudo abordou a hipótese de que as manifestações de traços de depressão e de ansiedade estariam relacionadas à preferência circadiana, acessada por MEQ, e ao desalinhamento entre os ritmos circadianos e sociais, denominado de *Jet lag* social.

Além disso, alterações em genes circadianos foram associadas tanto à preferência circadiana quanto a transtornos de humor e ansiedade em diferentes populações, reforçando assim o envolvimento dos ritmos biológicos na etiologia desses fenótipos. Baseado nessa interação, o objetivo desse trabalho foi realizar um estudo da interação entre preferência diurna, traços de ansiedade e depressão e alterações em genes do relógio molecular em uma amostra da população Alagoana, localizada na região Nordeste do Brasil (latitude 9° S).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.7 Ritmos Biológicos

Desde os primórdios, os seres vivos convivem com processos rítmicos ambientais. A prova disso é a interação da Terra com o Sol e a Lua, resultando nos ciclos associados ao dia e a noite, estações do ano e alternância das marés. Além disso, diversos relatos antigos, como os de Hipócrates, Aristóteles e Galeno, descrevem a alternância e a repetição de eventos naturais (MENNA-BARRETO, 2003).

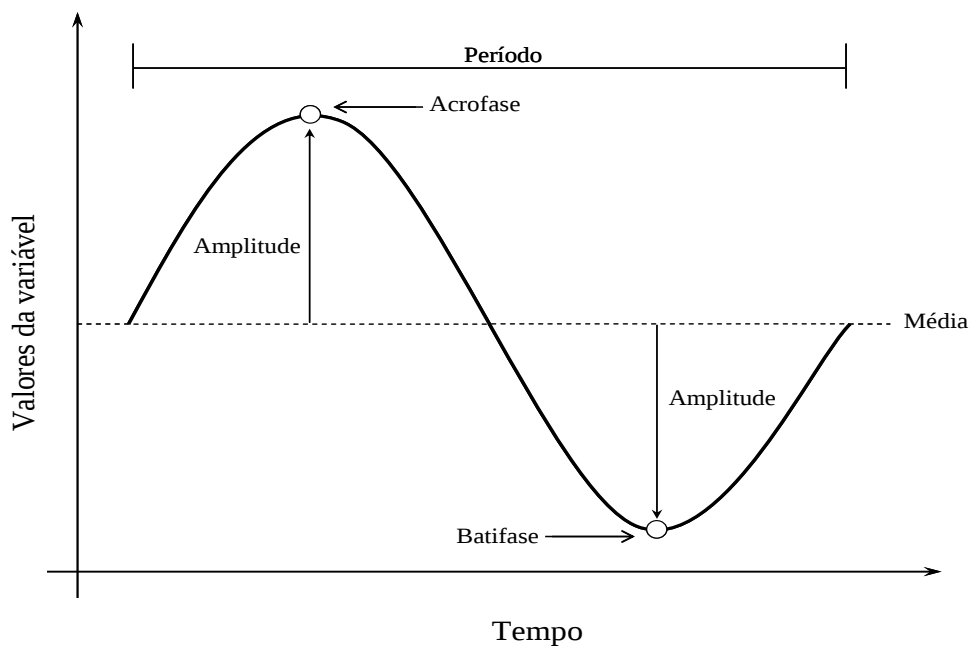
Em 325 a.C., Andróstenes de Thasos descreveu com riqueza de detalhes o movimento periódico da planta Tamarindo (RIETVELT, 1996). Este, provavelmente, foi o primeiro relato documentado de um ciclo de atividade/repouso. Movimentos foliares em plantas mantidas isoladas de claro/escuro também foram descritos por Jean Jacques De Mairan, em 1729, revelando indícios do caráter endógeno desses ritmos (MOORE-EDE, 1986). Estudos rítmicos envolvendo animais, no entanto, só foram realizados a partir do século XIX, sendo descritos em abelhas, crustáceos, coelhos e roedores (BÜNNLNG, 1965), demonstrando assim, que os ritmos biológicos se estendem a todos os seres vivos.

Em humanos, o primeiro estudo envolvendo os ritmos biológicos foi realizado em 1938, por Nathaniel Kleitman e seu aluno Bruce Rechardson, os quais passaram 33 dias isolados em uma caverna natural sem pistas ambientais. Este estudo foi um dos primeiros a revelar a existência de um controle interno em humanos. Sujeitos submetidos a escuro constante em cavernas artificiais (ASCHOFF, 1979, 1992; WEVER, 1979), mostraram que os ritmos biológicos como o ciclo de vigília e sono, anteriormente influenciados por sinais ambientais, passaram a apresentar uma duração diferente de 24 horas, revelando assim, seu período endógeno (τ).

Segundo Minors e Waterhouse (1981), pode-se definir um ritmo como sendo ‘uma sequência de eventos que ocorrem na mesma ordem e na mesma frequência’. Três parâmetros são fundamentais para a definição de um ritmo: período, amplitude e fase. O período (T) é a o intervalo de tempo no qual a variável se repete. A amplitude é a diferença entre a média dos valores da variável e seu valor máximo ou mínimo. A fase de um ritmo se refere a um momento determinado no ciclo. Denomina-se batifase, ao valor mínimo da função e acrofase,

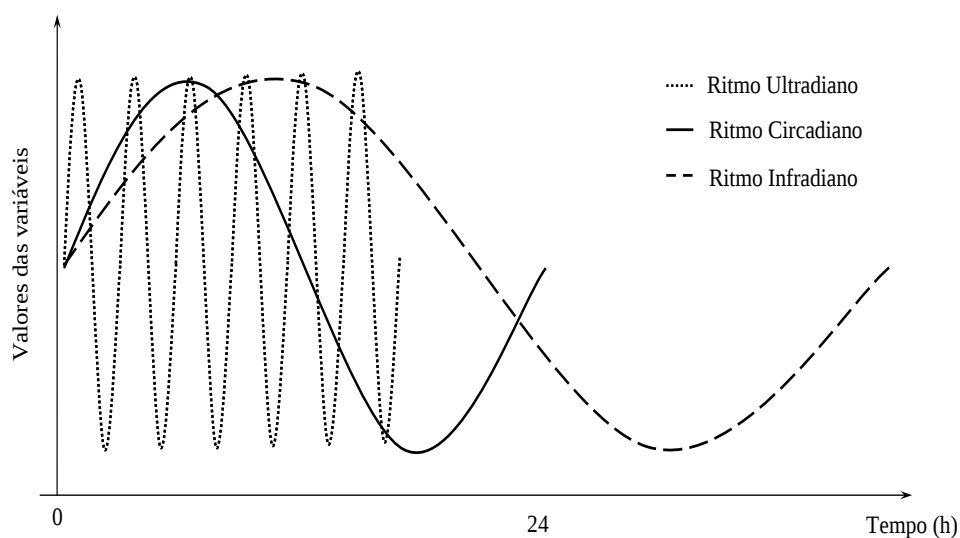
ao valor máximo da função (MENNA-BARRETO, 2003) (figura 1). Além disso, os ritmos biológicos podem ser classificados em: infradianos, que apresentam período maior que 28 horas (ex., ritmo cardíaco); ultradianos, que apresentam períodos menores que 24 horas (ex., ciclo menstrual e reprodutivo), e circadianos, que possuem períodos de 24 horas (ex., ciclo sono-vigília) (figura 2).

Figura 1 - Parâmetros para a definição de um ritmo hipotético. Período, amplitude e fase.



Fonte: BELISIO et al., 2012

Figura 2. Classificação dos ritmos biológicos de acordo com sua frequência.



Fonte: BELÍCIO et al., 2012

2.8 Ritmos Circadianos em Mamíferos

Os ritmos circadianos controlam uma variedade de processos biológicos nos seres vivos (BELL-PEDERSEN et al., 2005; LOWREY; TAKAHASHI, 2004). Esses ritmos são regulados pelo sistema de temporização interno e sincronizados por fatores ambientais como a luz e a alimentação, os quais são denominados de *Zeitgebers*, que quer dizer ‘doador de tempo’ (MARQUES; MENNA-BARRETO, 2003; SEHGAL, 2004). São exemplos destes ritmos em humanos, a secreção de hormônios, o ciclo de vigília e sono, a regulação da temperatura corporal, a pressão sanguínea e a produção de urina (MARQUES; MENNA-BARRETO).

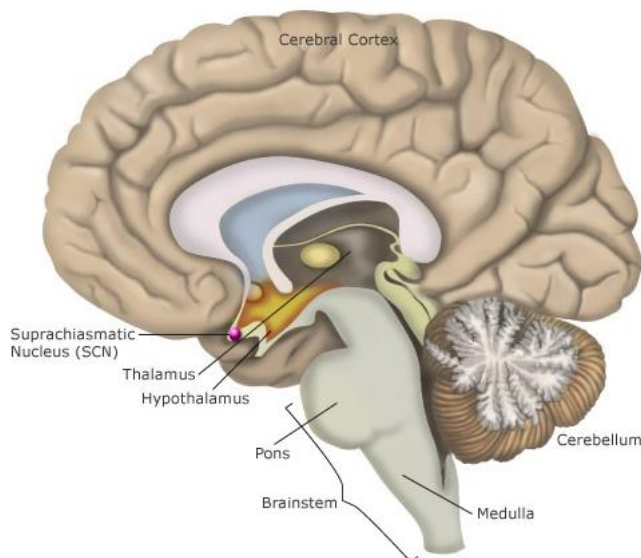
Os ritmos circadianos fazem parte de um sistema constituído por dois componentes: uma entrada (*input*), que é caracterizado por sinais ambientais (sendo a luz o principal deles), os quais sincronizam o oscilador central e, uma saída (*output*), que é caracterizada pelos processos fisiológicos e comportamentais gerados por ele (SEHGAL, 2004). O oscilador circadiano central consiste em dois núcleos localizados bilateralmente na base do Hipotálamo, denominados de Núcleos Supraquiasmáticos (NSQs) (WELSH et al., 2009). Estes núcleos são compostos de 20 mil neurônios que recebem a informação luminosa captada pelas células da retina através do trato retinohipotalâmico (SHIGEYOSHI; TAKAHASHI; KAY, 1997).

Os Núcleos Supraquiasmáticos são organizados em duas subdivisões, uma dorso-medial, denominada de *shell* e outra ventro-lateral, denominada de *core*. (ANTLE; SILVER, 2005; TAKAHASHI et al., 2008). Tais regiões são definidas fenotipicamente pelos tipos diferentes de células que as compõem. A região mais interna (*core*) recebe informações da luz através do trato retinohipotalâmico e expressa *c-fos*, *Per1* e *Per2* em resposta ao deslocamento de fase da luz, enquanto que a região mais externa (*shell*) recebe sinais vindos da região *core* através de diversos neurotransmissores, incluindo polipeptídeo intestinal vasoativo (VIP), polipeptídeo liberador vasoativo (GRP), substância P (SP) e ácido gama-amino-butírico (GABA) (ANTLE; SILVER, 2005) (figura 3).

Além disso, os NSQs coordenam a ação dos osciladores presentes em outras áreas cerebrais e em órgãos periféricos, como rins, pulmões, fígado e etc., os quais são denominados de osciladores periféricos. A ritmicidade circadiana de um organismo, incluindo a dos osciladores periféricos, pode ser abolida se os NSQs forem retirados cirurgicamente.

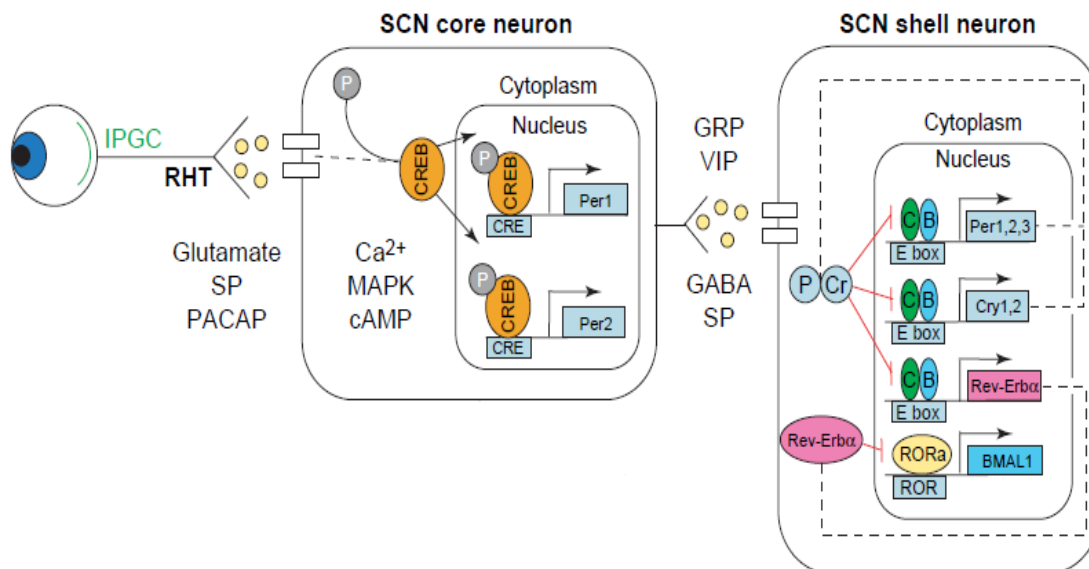
Entretanto, se o SCN é transplantado para um animal arritmico, este apresentará um padrão semelhante ao do doador (RALPH et al., 1990).

Figura 3 - Posicionamento dos Núcleos Supraquiasmáticos (NSQs) no sistema nervoso central



Fonte: <http://healthysleep.med.harvard.edu/image/200>

Figura 4 - Interação entre as subdivisões do Núcleo Supraquiasmático



A luz é transformada em sinais neurais pelas células ganglionares fotoreceptivas da retina e transmitida para a porção interna do SCN (*core*) através do trato retinohipotalâmico (RHT), que libera diferentes neurotransmissores como o glutamato, substância P (SP) e *peptídeo ativador de adenilil ciclase na pituitária* (PACAP), resultando na fosforilação da proteína CREB. Esta se liga na região CRE no promotor de *Per1* e *Per2*, ativando sua transcrição. A região *core* comunica-se com a região *shell* através de diversos neurotransmissores. Células da região *shell* contêm relógios moleculares que são regulados por uma alça de transcrição-tradução. Fonte: Imagem adaptada de Antle e Silver, 2005.

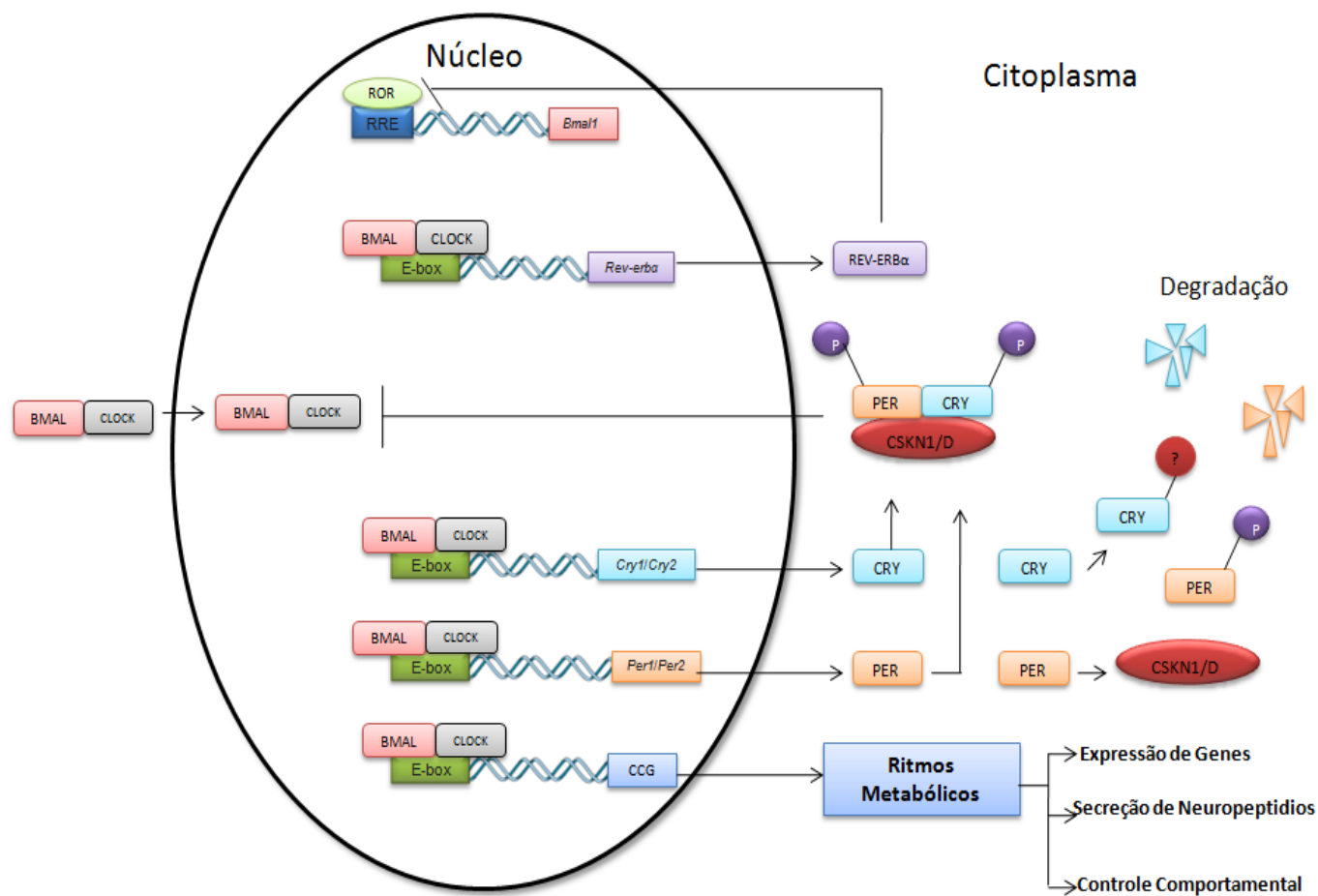
2.9 Mecanismos moleculares reguladores dos ritmos circadianos

As células da porção exterior do SCN contêm relógios moleculares que são dirigidos por uma alça de transcrição-tradução auto-regulatória. As proteínas produzidas pelos genes que compõem essa alça são necessárias para a geração e regulação dos ritmos circadianos (KO; TAKAHASHI, 2006).

Em mamíferos, o relógio circadiano é composto primariamente por uma alça de retroalimentação negativa, onde os fatores de transcrição CLOCK e BMAL1 interagem entre si, através do domínio PAS (PER-ARNT-SIM) destas proteínas, formando heterodímeros. A formação do heterodímero CLOCK-BMAL1 ativa a transcrição dos genes *Per* (*Period 1 e 2*) e *Cry* (*Cryptochrome 1 e 2*) através de sua ligação com a região regulatória *E-box* (5'-CACGTG-3'), destes genes. Além de *Cry* e *Per*, CLOCK e BMAL1 ativam a transcrição de outros genes, como *RevErba* e os *CCG* (*Clock Controlled Genes*), que também possuem a região *E-box* (UKAI; UEDA, 2010). Com o aumento da transcrição, as proteínas PER e CRY acumulam-se no citoplasma, sendo translocadas para o núcleo celular, inibindo assim, a atividade de CLOCK: BMAL1 (ALBRECHT; EICHELE, 2003) e sua própria transcrição (Figura 5).

Durante a noite, o complexo repressor PER : CRY é degradado permitindo a liberação do heterodímero CLOCK : BMAL1, o qual iniciará um novo ciclo de transcrição. A CKIε (*Casein kinase ε*) é responsável pela fosforilação das proteínas PERs, que resulta em sua degradação (SEHGAL, 2004). Uma segunda alça de retroalimentação negativa envolve o receptor de hormônio nuclear *Rev-Erba*, um alvo direto do complexo CLOCK : BMAL1, cuja proteína reprime fortemente a transcrição de *Bmal1* (também conhecido como *Arntl - hydrocarbon receptor nuclear translocator-like*, em humanos), o qual contém a região RRE (5'-(A/T)A(A/T)NT(A/G)GGTCA-3') onde o fator de transcrição ROR (*retinoic acid-related orphan receptor*) se liga (SATO et al., 2004). A transcrição de *Bmal1*, por outro lado, parece ser positivamente controlada pelas proteínas PERs e CRYs (PREITNER et al., 2002). Além desses, outros genes foram gradualmente descritos como componentes do mecanismo de regulação circadiano, tais como *Timeless*, *Dec1*, *Dec2*, *Bmal2*, *RevErbβ*, *Rorβ*, *Rory* e *E4bp4* (UKAI; UEDA, 2010).

Figura 5 - Alça de transcrição-tradução autorregulatória dos ritmos circadianos



O mecanismo molecular dos ritmos circadianos envolve uma alça de retroalimentação de transcrição- tradução composta pelos genes e seus produtos. Em mamíferos, o relógio circadiano é composto primariamente por uma alça de retroalimentação negativa envolvendo os genes *Clock* e *Bmal1*, *Period (Per) 1 e 2*, *Cryptochrome (Cry) 1 e 2*. **CLOCK** e **BMAL1** são fatores de transcrição que possuem o domínio PAS ativando a transcrição de *Per* e *Cry*. As proteínas **PER** e **CRY** formam heterodímeros, sendo translocadas para o núcleo onde interagem com o complexo **CLOCK-BMAL1**, inibindo sua própria transcrição. A segunda alça de retroalimentação autoregulatória é composta por *Rev-Erba* que é um alvo direto do complexo ativador de transcrição **CLOCK-BMAL1**. **REV-ERBα** inibe a transcrição de *Bmal1* e compete com o fator de transcrição **ROR** (*retionic acid-related orpha receptor*) para se ligar a região **RREs** no promotor do gene *Bmal1*. Fonte: Autora, baseado em Takahashi et al., 2008.

2.10 Preferência Circadiana

Matutividade e vespertinidade são exemplos de variações na ordem temporal endógena entre os indivíduos, sendo refletida na preferência individual da hora de dormir e acordar. Esta preferência por determinadas horas do dia é denominada de preferência circadiana ou cronotipo. Cronotipos matutinos preferem acordar cedo e são mais ativos durante o período da manhã, enquanto os cronotipos vespertinos executam melhor suas atividades no período da tarde e começo da noite, preferindo acordar e dormir nos horários mais avançados (VINK et al., 2001).

No entanto, a maioria dos indivíduos ocupa uma posição que está entre o tipo matutino e tipo vespertino, sendo assim definidos como tipos intermediários. Tal cronotipo tem sido apontado como mais flexível (MARQUES; MENNA-BARRETO, 2003), ajustando-se melhor aos horários impostos pelas rotinas diárias (jornada de trabalho e/ou estudo). Além disso, indivíduos matutinos e vespertinos apresentam diferenças em seus ritmos circadianos como demonstrado pela medição da temperatura corpórea em indivíduos sob condições controladas em laboratório (KERKHOF; VAN DONGEN, 1996).

Diferentes estudos envolvendo gêmeos (homozigóticos e dizigóticos) e irmãos mostram que a preferência circadiana é um caractere hereditário (DRENNAN et al., 1992; HUR et al., 1998; KOSKENVUO et al., 2007; VINK et al., 2001; BARCLAY et al., 2010). A síndrome da fase atrasada do sono (SFAS) e a síndrome da fase avançada do sono (SFAVS), que são condições raras, com padrão de herança familiar, representam os casos mais extremos da preferência diurna (JONES et al., 1999; EBISAWA et al., 2001; ARCHER, et al., 2003; PEREIRA et al., 2005).

Além disso, evidências demonstram que a preferência circadiana é influenciada por fatores individuais tais como idade e sexo, além de fatores ambientais como exposição à luz, latitude/longitude geográficas, fotoperíodo de nascimento e polimorfismos genéticos (ADAN et al., 2012). Crianças geralmente são matutinas, enquanto que adolescentes são vespertinos. Em torno dos 20 anos, as pessoas começam progressivamente a se tornarem matutinas novamente. As mulheres tendem a serem mais matutinas que os homens até a idade de 50 anos, apresentando depois disso, cronotipos semelhantes aos homens (ROENNEBERG et al., 2004).

Com relação ao fotoperíodo de nascimento, comprimento de luz em que o indivíduo é submentido no primeiro mês de vida, estudos demonstram que indivíduos nascidos durante o

fotoperíodo curto (outono-inverno) tendem a serem mais matutinos, enquanto que aqueles nascidos durante o fotoperíodo longo (primavera-verão) tendem a serem mais vespertinos (MONGRAIN et al., 2006b; NATALE; ADAN, 1999; NATALE et al., 2009; NATALE; DI MILIA, 2011). Já com relação à latitude/longitude, indivíduos matutinos são encontrados mais ao leste e norte do hemisfério e em localidades rurais, enquanto que os vespertinos são encontrados mais ao oeste e sul e em localidades urbanas (BORISENKOV et al., 2010, 2012; RANDLER, 2008).

A matutividade e a vespertividade tem sido avaliada principalmente com o *Morningness–Eveningness Questionnaire* (MEQ), de Horne e Ostberg (HORNE OSTBERG, 1976), um instrumento amplamente utilizado para diferenciar cronotipos através de uma escala que vai de 16 a 86. Além deste, outro questionário bastante utilizado é o *Munich Chronotype Questionnaire* (MCTQ), de Roenneberg (ROENNEBERG et al., 2003), que quantifica o cronotipo baseando-se no ponto médio do sono nos dias livres, corrigido para o débito de sono nos dias de trabalho.

2.11 Ritmos Circadianos e Transtornos Psiquiátricos

Nas ultimas décadas, houve um aumento significativo dos estudos envolvendo os ritmos circadianos na saúde. Um dos principais focos tem sido o entendimento dos ritmos circadianos nos transtornos do humor (GORWOOD, 2010). Alterações circadianas podem interferir no sono e na saúde mental, visto que, disfunções nos ritmos circadianos da secreção de cortisol, da temperatura corporal e do ciclo sono/vigília são sempre observadas em pacientes com depressão, esquizofrenia, transtorno bipolar e transtorno de ansiedade (BOIVIN, 2000; TUREK, 2007; WICHERS et al., 2008). Spoormaker e Bout (2005) encontraram uma alta correlação entre sono e insatisfação na ansiedade e depressão.

Desajustes circadianos entre o sistema de temporização endógeno e os horários sociais de dormir e acordar, também são a base para muitos distúrbios do sono, tais como a síndrome da fase atrasada do sono (SFAS) e a síndrome da fase adiantada do sono (SFAVS) (KAMEI et al., 1998). Nestes casos, os indivíduos apresentam episódios de sono atrasado (SFAS), resultando em sintomas semelhantes à insônia e dificuldade de levantar no horário convencional de trabalho e estudo e, episódios de sono adiantado (SFAVS), dormindo no início da noite e acordando nas primeiras horas da manhã (JONES et al., 1999; EBISAWA et al., 2007). Estas síndromes apresentam uma alta comorbidade com sintomas de depressão e ansiedade. A terapia de luz intensa é bastante eficaz em pacientes com transtorno afetivo sazonal, podendo assim, ser comparada com a eficácia dos medicamentos antidepressivos (LAM et al., 2006).

Adicionalmente, diferentes estudos relataram uma relação entre cronotipo e ansiedade e depressão (Tabela 1). Pesquisas envolvendo pacientes com Depressão (DRENNAN et al., 1991) e pacientes com Transtorno Bipolar (WOOD et al., 2009) demonstraram que ambos os pacientes eram mais vespertinos que os indivíduos do grupo controle. Sintomas depressivos também foram associados com vespertinidade em indivíduos diagnosticados com Depressão Maior (GASPAR-BARBA et al., 2009).

Além disso, estudos envolvendo indivíduos saudáveis confirmam a associação entre cronotipo e traços de ansiedade e depressão (HIDALGO et al., 2009; DÍAS-MORALES e SÁNCHEZ-LÓPEZ, 2008; KITAMURA et al., 2010). Selvi et al. (2007) e Chelminski et al. (1999) encontraram escores de depressão maior no grupo vespertino que no grupo matutino. Díaz-Morales e Sánchez-López (2008) e PABST et al. (2009) demonstraram que mulheres

vespertinas tiveram valores de ansiedade maior que mulheres matutinas. Esses achados sugerem que a vespertinidade representa um fator de risco para o desenvolvimento não só da depressão, mas também da ansiedade.

Indivíduos vespertinos, comparados aos matutinos e intermediários, apresentam uma alteração no seu ciclo de vigília/sono (MECACCI; ROCCHETTI, 1998; TAILLARD et al., 1999). Cronotipos vespertinos preferem dormir e acordar em horários mais avançados em relação aos vespertinos e intermediários, o que interfere no seu ajuste aos horários sociais de estudo e trabalho. Estudantes do ensino médio com vespertinidade extrema relataram um aumento no seu horário de sono entre os dias de estudo e os dias livres, levando a um débito de sono nos dias de estudo, que eles compensam nos dias livres (GIANNOTTI ET AL., 2002). A diferença entre os dias de estudo/trabalho e os dias livres tem sido descrita como *jet lag* social, que é o desalinhamento entre os horários sociais e biológicos (WITTMANN et al., 2006a).

Levandovski et al. (2011) demonstraram que existe uma correlação positiva entre cronotipo, acessado pelo *Munich Chronotype Questionnaire* (MCTQ) e valores de depressão; e entre valores de depressão e *jet lag* social, em uma população rural do sul do Brasil, sugerindo assim que o desalinhamento entre os horários sociais e biológicos é um fator de risco para o desenvolvimento da depressão. Entretanto, não existem estudos de correlação envolvendo cronotipo, acessado por MEQ, e *jet lag* social. O questionário de MEQ é um instrumento internacionalmente validado e bastante utilizado para a avaliação do cronotipo, tendo sido fortemente relacionado com o MCTQ (ZAVADA et al., 2005). As questões que compõem o questionário de MEQ são baseadas na preferência do horário de dormir e de acordar e de realizar atividades, enquanto que, o MCTQ usa questões baseadas nos horários de sono, distinguindo entre os dias de estudo/trabalho e os dias livres (ROENNEBERG, 2003).

Atrasos nos ritmos circadianos tão bem como outros aspectos, incluindo estado social (por exemplo, ser casado, ter filhos, estar empregado) e diferenças hormonais, podem contribuir com a diferença sexual no risco da depressão e ansiedade. Flutuações nos hormônios sexuais podem contribuir com a suscetibilidade para a depressão e ansiedade em mulheres (ALTEMUS, 2006; LEACH et al., 2008). Além disso, homens provavelmente têm mais benefícios nos papéis familiares que as mulheres, pois na maior parte dos casos são elas as responsáveis pelo cuidado da casa e dos filhos (DÍAZ-MORALES; SÁNCHEZ-LÓPEZ 2008; PLAISIER et al., 2008). Dessa forma, embora a etiologia dos transtornos do humor e de

ansiedade não seja completamente entendida, tais indícios demonstram que há uma interação dos ritmos circadianos nesses transtornos.

Tabela1 – Resumo dos artigos que encontraram associação entre preferência circadiana e ansiedade/depressão

Fenótipos Psiquiátricos	Amostra	Resultado	Referência
Ansiedade	Estudantes	Traços de ansiedade relacionada com vespertinidade em homens	MATTHEWS, 1988
Ansiedade	Adultos	Traços de ansiedade relacionados com vespertinidade em mulheres	DÍAS-MORALES E SÁNCHEZ-LÓPES, 2008
Depressão e Ansiedade	Adolescentes (mulheres)	Sinais depressivos e traços de ansiedade relacionados com vespertinidade	PABST ET al., 2009
Depressão	Estudantes	Escore de depressão relacionados com vespertinidade	CHELMINSKI et al., 1999
Depressão	Pacientes	Sintomatologia depressiva relacionados com vespertinidade	GASPAR-BARBA et al., 2009
Depressão	Adultos	Estado depressivo relacionados com vespertinidade	KITAMURA et al., 2010
Depressão	Adultos (zona rural)	Escore de depressão relacionados com vespertinidade	LEVANDOVSKI et al., 2011
Depressão	Adultos	Sinais de depressão relacionados com vespertinidade	HIDALGO et al., 2009
Depressão	Pacientes e controle	Pacientes apresentaram mais vespertinidade que os controles	DRENNAN et al., 1991
Depressão	Estudantes de medicina	Sinais depressivos associados com vespertinidade	HIRATA et al., 2007

Fonte: Autora

2.12 Polimorfismos em genes circadianos associados com preferência circadiana e transtornos psiquiátricos

Alterações em genes circadianos têm sido associadas à preferência diurna (KATZENBERG et al., 1998) (Tabela 2), distúrbios do sono como a SFAS e a SFAVS, (ARCHER et al., 2003; EBISAWA et al., 2001; JONES et al., 1999; PEREIRA et al., 2005), e distúrbios do humor como depressão (UTGE et al., 2010; LEVEBRATT et al., 2010) e transtornos de ansiedade (SIPILA et al., 2010) (Tabela 3). O polimorfismo T3111C (rs 1801260), localizado na região 3'UTR do gene *Clock*, foi o primeiro a demonstrar associação entre um gene circadiano e preferência diurna em humanos, estando o alelo 3111C associado com vespertinidade (KATZENBERG et al., 1998). Resultado semelhante também foi encontrado por Mishima et al. (2005) em uma amostra da população japonesa. Entretanto, dois outros estudos não encontraram essa associação (ROBILLIARD et al., 2002; PEDRAZZOLI et al., 2007; CHANG et al., 2011).

Estudos envolvendo esse mesmo polimorfismo (T3111C) foram realizados em pacientes com transtorno bipolar, os quais apresentaram um aumento da frequência do homozigoto C em pacientes que apresentam esse transtorno por mais de cinco anos (BENEDETII et al., 2003) e, em pacientes com depressão maior ou transtorno bipolar, os quais apresentaram um aumento da recorrência de insônia nos homozigotos 3111C (SERRETI et al., 2003). Além disso, estudos envolvendo animais *knockout* para o gene *Clock*, mostraram que camundongos portadores da mutação apresentaram estados comportamentais semelhantes à mania (ROYBAL et al., 2007). Como polimorfismos localizados na região 3'UTR tem sido demonstrado afetar a estabilidade e a meia vida do RNAm (CHATTERJEE; PAL, 2009), o polimorfismo T3111C poderia ter um efeito significativo nos níveis das proteínas CLOCKs (KATZENBERG et al., 1998), o que levaria a um atraso na ordem temporal endógena e assim, a vespertinidade (KERKHOF; DONGEN, 1996)

Um polimorfismo C111G (rs2304672), na região 5'UTR do gene *Per2*, foi associado com preferência circadiana, estando o alelo 111G associado com matutinidade (CARPEN et al., 2005). Uma diferença na predição computacional da estrutura do RNAm entre os dois alelos demonstrou que o polimorfismo C111G possivelmente interfere na tradução do gene, sendo este considerado um candidato em potencial para a síndrome da fase avançada do sono

(CARPEN et al., 2005). No entanto, outros estudos não encontraram essa associação (CHOUB et al., 2011). Uma mutação (S662G) no gene *Per2*, que afeta o sítio de fosforilação da CK1 ϵ (caseína quinase I épsilon), levando a um acúmulo da proteína PER no citoplasma e consequentemente um avanço no ciclo de vigília e sono, foi associada com a síndrome da fase avançada do sono em um estudo de família (TOH et al., 2001).

Xu et al. (2007) realizou um estudo funcional inserindo a mutação S662G em camundongos, os quais apresentaram um período endógeno curto semelhante em humanos. Como o polimorfismo C111G encontra-se na região 5'UTR (localizada no exon 2), é pouco provável que o mesmo exerça seu efeito a nível de DNA por afetar o promotor do gene, que é separado do exon 2 por um íntron de 10.4 Kb. Entretanto, esse polimorfismo poderia alterar sequência da proteína codificada e, de alguma maneira manifestar seu efeito em nível de transcrito, o que levaria a um adiantamento no sistema de temporização endógeno e consequentemente, a matutividade (Carpen et al., 2005)

Archer et al. (2003) e Pereira et al. (2005) demonstraram que um polimorfismo de repetição em tandem - VNTR (4 e 5 repetições) no gene *Per3* está associado com preferência diurna. Em ambos, a frequência do alelo curto (quatro repetições) é maior em grupos de vespertinos do que em grupos de matutinos. Diferentemente desses achados, Osland et al. (2011) não encontrou nenhuma associação entre esse polimorfismo e preferência circadiana em um grupo de estudantes universitários da Noruega.

Em um estudo realizado com pacientes com transtorno bipolar, houve uma associação entre o polimorfismo VNTR de *Per3* e a idade de início da doença (BENEDETTI et al., 2008). Indivíduos homozigotos para a variante de 5 repetições apresentaram menor idade de início do que indivíduos homozigotos para a variante de 4 repetições. Como cada uma das 4-5 s repetições do polimorfismo VNTR de *Per3* apresentam potenciais sítios de fosforilação da CK1 ϵ , que é a responsável pela fosforilação de todas as três proteínas PERs, o número reduzido de aminoácidos no sítio de fosforilação da variável de 4 repetições poderia representar um efeito funcional do polimorfismo na regulação da estabilidade e na translocação para o núcleo dessas proteínas (Archer et al., 2003).

Polimorfismo nos genes *Per1* e *NPAS2* também foram associados com preferência circadiana e transtorno afetivo sazonal (TAS) respectivamente. O polimorfismo T2434C, localizado no exon 18 do gene *Per1* foi associado com preferência diurna, sendo o alelo C

mais frequente em matutinos que vespertinos (CARPEN et al., 2006). O alelo 471Leu, do polimorfismo Leu471Ser no gene *NPAS2* foi associado com indivíduos com transtorno afetivo sazonal em relação ao grupo controle, indicando que esse genótipo pode ser um fator de risco para o TAS (JOHANSSON et al., 2003).

Três polimorfismos, T3111C do gene *Clock*, C111G do gene *Per2* e o VNTR do gene *Per3* foram associados com preferência diurna em diferentes populações, não sendo ainda conhecidas as bases moleculares para essa associação. Possíveis explicações para tais associações estão no fato de que polimorfismos localizados na região 3'UTR podem interferir na estabilidade do RNAm (CHATTERJEE; PAL, 2009). Já os localizados na região 5'UTR, podem ter um papel importante na regulação da tradução (MIGNONE et al., 2002). No caso do VNTR, cada uma das 4-5 repetições contém potenciais sítios para a fosforilação pela CK1ε, a qual é a responsável pela estabilidade e entrada no núcleo dessas proteínas (ARCHER et al., 2003).

Embora diferentes estudos demonstrem a associação de polimorfismos em genes do relógio biológico com preferência circadiana, os resultados ainda são controversos, visto que, a associação encontrada em um estudo pode não ser reproduzida em outro. Estudos sugerem que essas discrepâncias de achados podem ser resultado da influencia da latitude e/ou de *backgrounds* genéticos diferentes (ALLEBRANDT; ROENNEBERG, 2008), visto que a alternância entre claro: escuro atua como sincronizador ambiental do relógio circadiano e, que o comprimento da luz depende do dia do ano e das mudanças sazonais que ocorrem nas diferentes latitudes. Em relação ao *background* genético, frequências alélicas entre variantes genéticas podem variar significativamente entre indivíduos com ancestralidades distintas (ALLENBRADT et al., 2002). Assim, uma associação encontrada em uma população pode não ser encontrada em outras. Ainda, moduladores genéticos dos ritmos circadianos podem ser relevantes em algumas populações.

Além disso, esses diferentes estudos têm focado apenas na análise de um único gene circadiano, mas não no efeito combinatório de mais de um gene. Como, esses genes codificam proteínas que interagem fisicamente entre se, combinações de diferentes polimorfismos em diferentes genes circadianos poderiam ter um efeito sinérgico ou inibitório nos fenótipos circadianos. Pedrazzoli et. al (2010) analisaram o efeito combinado de quatro polimorfismos em quatro genes circadianos diferentes (*Per2*, *Per3*, *Clock* e *Bmal1*) de pessoas matutinas e

vespertinas extremas. Eles encontraram que uma combinação específica de polimorfismos nesses genes era mais frequente em indivíduos matutinos (4/4; G/G; C/C; T/T) e outra combinação diferente era mais frequente em vespertinos (4/4; A/G; C/C; T/T). Assim, o estudo dos efeitos combinados de diferentes genes do relógio ser mais acurado e mais informativo do que estudos envolvendo de genes individuais.

Tabela 2 – Resumo dos principais estudos envolvendo a associação de fenótipos circadianos com genes do relógio

Gene	Polimorfismo	População	Preferência Diurna/ Distúrbio do sono	Referência
<i>Clock</i>	T3111C	Europeia	Vespertinidade	KATZENBERG et al., 1998
<i>Clock</i>	T3111C	Japonesa	Vespertinidade	MISHIMA et al., 2005
<i>Per2</i>	C111G	Britânica	Matutividade	CARPEN et al., 2005
<i>Per2</i>	G2114A	Japonesa	Vespertinidade	MATSUO et al., 2007
<i>Per2</i>	G3853A	Coreana	Matutividade	LEE et al., 2011
<i>Per1</i>	T2434C	Britânica	Matutividade	CARPEN et al., 2006
<i>Per3</i>	VNTR 4-5 repetições	Britânica	Matutividade - 5 repetições e 4 –Vespertinidade	ARCHER et al., 2003
<i>Per3</i>	VNTR 4-5 repetições	Brasileira	Matutividade - 5 repetições e 4 –Vespertinidade	PEREIRA et al., 2005
<i>Per3</i>	G647	Sueca, Finlandesa, Australiana e Alemã	Matutividade	JOHANSSON et al., 2003
<i>Per3</i>	VNTR 4-5 repetições	Britânica	Matutividade - 5 repetições	ELLIS et al., 2009
<i>Per3</i>	VNTR 4-5 repetições	Britânica	Matutividade - 5 repetições e 4 –Vespertinidade	JONES et al., 2007

Fonte: Autora

Tabela 3 – Resumo dos principais estudos relacionando transtornos psiquiátricos com genes do relógio biológico

Amostra	Gene, Polimorfismo	Resultado	Referência
Pacientes com transtorno bipolar e grupo controle	<i>Clock</i> , SNP T3111C	Aumento da frequência do homozigoto C/C em pacientes com TB	BENEDETTI et al., 2003
Pacientes com depressão maior e transtorno bipolar	<i>Clock</i> , SNP T3111C	Os pacientes homozigotos C/C aumento da recorrência de insônia.	SERRETTI et al., 2003
Pacientes em fase de tratamento com antidepressivos	<i>Clock</i> , SNP T3111C	A maioria dos pacientes com insônia era homozigotos C/C	SERRETTI et al., 2005
Pacientes com transtorno Bipolar	<i>Clock</i> , SNP T3111C	Pacientes homozigotos T/T apresentaram serem mais ativos durante a tarde e ter o início sono atrasado	BENEDETTI et al., 2007
Pacientes com transtorno bipolar	<i>ARNTL</i> , <i>Clock</i> , <i>CRY2</i> , <i>CSNK1epsilon</i> , <i>DBP</i> , <i>GSK3 beta</i> , <i>NPAS2</i> , <i>Per1</i> , <i>Per2</i> e <i>Per3</i>	Haplótipos do gene <i>Bmal1</i> e <i>Per3</i> estão associados com o TB	NIEVERGELT et al., 2006
Pacientes com transtorno afetivo sazonal e grupo controle	<i>Per2</i> , <i>Bmal1</i> e <i>Npas2</i>	Associação com Transtorno Afetivo Sazonal	PARTONEM et al., 2007
Pacientes com depressão maior e transtorno bipolar	<i>Per3</i> - 1SNP no éxon 15 (T/G), 1SNP no Éxon 18(T/C), VNTR no éxon 18.	Associação destes polimorfismos com a idade de início destes transtornos	ARTIOLI et al., 2007
Pacientes com transtorno bipolar, esquizofrenia e grupo controle	<i>Bmal1</i> , <i>Clock</i> , <i>Per1</i> , <i>Per2</i> , <i>Per3</i> , <i>Cry1</i> , <i>Cry2</i> , e <i>Tim</i>	Associação entre polimorfismos nos genes <i>Tim</i> e <i>Per3</i> com esquizofrenia e uma modesta associação dos genes <i>Tim</i> e <i>Per3</i> com transtorno bipolar	MANSOU et al., 2006
Transtorno de Ansiedade: transtorno do pânico com ou sem agorafobia, fobia social, GAD, agorafobia e fobia não especificada.	<i>Bcle2</i> , <i>Drd2</i> <i>ARNTL2</i>	Associação do alelo G do polimorfismo em <i>ARNTL2</i> com fobia social	SIPILÃ et al, 2009

Fonte: Autora

3 JUSTIFICATIVA

Estudos envolvendo a relação entre preferência circadiana e transtornos de ansiedade e depressão têm aumentado constantemente. Uma pesquisa recente demonstrou uma relação entre depressão e *Jet lag* social, utilizando o *Munich Chronotype Questionnaire* (MCTQ). Como o MEQ é o questionário mais utilizado para a avaliação da tipologia circadiana em todo o mundo, realizar estudos envolvendo esse questionário e fenótipos como ansiedade, depressão e *Jet lag* social em uma amostra não psiquiátrica é de suma importância.

Além disso, como diferentes pesquisas têm encontrado polimorfismos em genes circadianos associados com cronotipo, ansiedade e depressão, é importante realizar tais estudos em populações com localização geográfica e *backgrounds* genéticos diferentes, contribuindo assim, para o entendimento de sua etiologia e modulação. Ainda, o entendimento destes mecanismos poderia possibilitar o desenvolvimento de estratégias terapêuticas no tratamento de distúrbios do sono e transtornos do humor e ansiedade.

4 OBJETIVOS

4.1 Geral:

Realizar um estudo da relação entre cronotipos, traços de ansiedade, traços de depressão e polimorfismos em genes circadianos em uma amostra da população de Alagoas.

4.2 Específicos:

1. Aplicar questionários validados para identificação dos fenótipos circadianos, traços de ansiedade e depressão em uma amostra da população de Alagoas;
2. Correlacionar os fenótipos circadianos com traços de ansiedade e depressão;
3. Avaliar a contribuição do *jet lag* social, medido pelo questionário MCTQ, no desenvolvimento de traços de ansiedade e depressão e sua possível relação com cronotipos;
4. Determinar as frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos C111G (rs2304672) na região 5'UTR do gene *Per2*, T3111C (rs1801260) na região 3'UTR do gene *Clock* e VNTR (4-5 repetições) no gene *Per3*;
5. Correlacionar as frequências alélicas e genotípicas dos três polimorfismos com os fenótipos circadianos, traços de ansiedade e depressão;
6. Correlacionar o efeito combinado das frequências genotípicas dos três polimorfismos com os fenótipos circadianos, traços de ansiedade e depressão.

5 METODOLOGIA

5.3 Escolha dos sujeitos

Estudantes da Universidade Federal de Alagoas (UFAL) e da Universidade Estadual de Alagoas (UNEAL) foram convidados a participar da pesquisa. Após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido, os estudantes preencheram um formulário com perguntas relativas a sexo, idade e etnia. Além disso, responderam aos questionários de MEQ para acessar o cronotipo e para avaliação dos traços de ansiedade e depressão, BAI e CES-D, respectivamente. Foram excluídos do estudo os questionários dos sujeitos que apresentaram dados incompletos, que alguma vez já foi diagnosticado com distúrbio psiquiátrico e que tinham idade inferior a 16 e superior a 25 anos. Essa faixa etária foi escolhida para tornar a amostra mais homogênea, visto que o cronotipo, a ansiedade e a depressão sofrem influência da idade. Para a avaliação da relação do *Jet lag* social com traços de ansiedade e depressão, o questionário MCTQ foi aplicado no decorrer do trabalho. O estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da UFAL com o nº 004517/2011-80 (anexo1) e realizado no Laboratório de Biologia Molecular e Expressão Gênica da UFAL - Campus Arapiraca.

5.2 Determinação dos Cronotipos

Para classificação dos cronotipos matutinos, vespertinos ou intermediários, foi aplicado o questionário de Horne-Ostberg (HORNE et al., 1976). Este questionário tem sido amplamente validado por demonstrar sua correlação com τ (DUFFY et al., 1999). Além disso, perguntas relativas a sexo, idade e etnia foram introduzidas. O questionário de Horne-Ostberg é constituído de 19 perguntas, as quais são avaliadas segundo uma escala de pontuação que vai de 16 a 86. Os cinco cronotipos diferentes são classificados na escala segundo a pontuação: vespertino extremo (16-30), vespertino moderado (31-41), intermediário (42-58), matutino moderado (59-69) e matutino extremo (70-86). Baseado no escore do MEQ, os sujeitos desse estudo foram classificados em cinco cronotipos de acordo com o método de gradiente de 5 pontos (Caroiji, 1914): vespertinos extremos (23-37), vespertinos moderados (38-46), intermediários (47-59), matutinos moderados (60-66) e matutinos extremos (67-77). Para as análises estatísticas, os sujeitos foram agrupados em três cronotipos apenas: vespertinos (23-46), intermediários (47-59) e matutinos (60-77).

5.3 Determinação dos Traços de Depressão

Para a detecção dos traços depressivos foi aplicada a escala de rastreamento populacional de depressão do Centro de Estudos Epidemiológicos (CES-D) (RADLOF, 1977). A escala CES-D é composta de 20 itens relacionados ao humor, ao comportamento e a percepção. As respostas a cada uma das questões são dadas segundo a frequência com que cada sintoma esteve presente na semana precedente à aplicação do instrumento: "raramente ou nunca" corresponde à pontuação zero; "durante pouco" corresponde à pontuação 1; "durante um tempo moderado" corresponde à pontuação 2; e "durante a maior parte do tempo" corresponde à pontuação 3. A pontuação pode, portanto, variar entre 0 e 60. Pontuações abaixo de 16 são consideradas sem traços depressivos e, igual ou acima de 16, com traços depressivos. A validação desse ponto de corte foi verificada através de estudos de sensibilidade e especificidade na comparação de critérios diagnósticos estabelecidos (WELLS et al., 1987).

5.4 Determinação dos Traços de Ansiedade

O Inventário de Ansiedade de Beck (BAI) foi construído cuidadosamente para avaliar os sintomas de ansiedade. A escala consiste de 21 itens que refletem somaticamente, afetivamente e cognitivamente os sintomas característicos da ansiedade, mas não da depressão (BECK et al., 1988). Esta lista de verificação de ansiedade apresentou uma boa consistência interna ($\alpha=0,92$) e boa confiabilidade no teste - reteste com intervalo de uma semana $r(58) = 0,75$ (BECK et al., 1985). As respostas a cada uma das questões variam de 0(ausente), 1(suave), 2(moderado) e 3 (grave), em que cada sintoma esteve presente durante a semana anterior à aplicação do instrumento. Beck e Steer (1990) recomendam que pontuações de 0-9 devem ser consideradas como traços de ansiedade normal; 10-18 como leve-moderada; 19-29 como moderado-severa; e 30-63 como severa. A confiabilidade dos 21 itens do BAI foi avaliada em uma amostra de 160 indivíduos, apresentando boa consistência interna ($\alpha = 0,92$) em uma faixa de cada item com um total de variando de 0,30 a 0,71 (mediana = 0,60) (Beck et al., 1988). Creamer et al. (1995) avaliaram as propriedades do BAI em uma amostra não clínica de 316 estudantes de graduação, na qual, os escores de BAI apresentaram boa propriedade psicométrica, com altos valores de consistência interna. Assim, a escala BAI fornece aos pesquisadores e clínicos um conjunto de critérios seguro e válidos que podem ajudá-los na diferenciação entre ansiedade e depressão.

5.6 Determinação do *Jet lag* Social e da Fase Média do Sono

O *Munich Chronotype Questionnaire* (MCTQ) questionário foi avaliado para a determinação do *jet lag* social e da fase média do sono, que representa a medida quantitativa do cronotipo obtida por esse questionário. O MCTQ utiliza questões simples sobre o sono separando os dias livres dos dias de estudo/trabalho. O *Jet lag* social é a diferença entre o horário social e biológico, e seu cálculo é baseado na diferença entre o período médio do sono nos dias livres e nos dias de estudo/trabalho (MSF-MSW) (ROENNEBERG et al., 2003). A fase média do sono é calculada baseada no ponto médio do sono nos dias livres (MSF), corrigida para o débito de sono nos dias de trabalho (MSF_{sc}) (WITTMANN et al., 2006).

5.7 Coleta e Extração de DNA

Amostras de sangue de 120 indivíduos foram extraídas por punção venosa em um tubo de 5 mL contendo anticoagulante EDTA (Ácido Etileno-diaminotetracético). O DNA de 80 dessas amostras foi extraído utilizando protocolo padronizado de fenol:clorofórmio (apêndice 1). O DNA das outras 40 amostras foi extraído utilizando o Kit Flexigene (Qiagen, USA) seguindo as recomendações do fabricante (Apêndice 2). Já as amostras de swab bucal dos 60 sujeitos foram coletadas e a extração de DNA foi realizada utilizando NaCl (ABRÃO et al., 2005) (apêndice 3). A quantidade e integridade do DNA foram avaliadas em eletroforese em gel de agarose a 0.8%, corado com brometo de etídio (0.5µg/mL).

5.8 Detecção dos polimorfismos através das técnicas de PCR (VNTR) e PCR-RFLP

As regiões 5'UTR do gene *Per2*, 3'UTR do gene *Clock* e o VNTR de *Per3* contendo os polimorfismos foram amplificadas com iniciadores específicos em reações de PCR, produzindo amplicons de 114pb, 221pb e 635pb (5 repetições) e 581pb (4 repetições), respectivamente. Cada reação teve um volume final de 25µl, com água (MiliQ), tampão da enzima (Fermentas, USA), MgCl₂ (Fermentas, USA), dNTPs (Fermentas, USA), iniciadores - direto e reverso, *Taq* DNA polimerase (Fermentas, USA) e 1µL do DNA extraído, as concentrações para cada reação estão listadas na tabela 4. Os primers e os parâmetros de amplificação para cada polimorfismo estão descritos na tabela 5. Os produtos de amplificação foram visualizados em eletroforese em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídio (0.5µg/mL), sob voltagem de 70V.

Tabela 4 - Concentração dos reagentes para cada reação da PCR

Reagente	Concentração
Tampão	1X
MgCl ₂	1,5mM
dNTP	200µM
Prime F	5pmol
Prime R	5pmol
Taq DNA polimerase	0,5U

Fonte: Autora

Para a genotipagem do polimorfismo C111G de *Per2* foi utilizada a enzima de restrição HpyCH4V (BioLabs, UK), com sítio único no fragmento amplificado, que reconhece o alelo G (sequência "TGCA"). Na presença do alelo G ocorre a clivagem do amplicon, produzindo fragmentos de 61pb e 53pb. As reações de restrição consistiram em 6.8µl de Água MilliQ, 3µl de tampão da enzima (1x), 0.2µl de HpyCH4V (1U) e 20µL de cada amostra de PCR, em um volume final de 30µL. As reações foram incubadas a 37°C durante 16hs. A presença do polimorfismo foi confirmada com a visualização dos padrões de restrição em eletroforese em gel de poliacrilamida 8%, corado com brometo de etídio (0.5µg/mL), sob uma voltagem de 70.

Já para o polimorfismo T3111C de *Clock*, foi utilizada a enzima SduI (Fermentas, USA), com sítio único no fragmento amplificado, que reconhece o alelo C (sequência "CACGGG"). Na presença do alelo C ocorre a clivagem do amplicon, produzindo fragmentos de 125pb e 96pb. As reações de restrição consistiram em 6.9µl de Água MilliQ, 3µl de tampão da enzima (1x), 0.1 µl de SduI (1U) e 20µL de cada amostra de PCR, em um volume final de 30µL. As reações foram incubadas 37°C durante 16hs. O diagnóstico do polimorfismo foi confirmado com a visualização dos padrões de restrição em eletroforese em gel de agarose 3%, corado com brometo de etídio (0.5µg/mL).

Tabela 5 - Primers e condições utilizadas para a amplificação dos polimorfismos

Gene	Polimorfismo	Primer Direto	Primer Reverso	Temperatura de Desnaturação	Temperatura de Anelamento	Temperatura de Extensão
<i>Clock</i>	T3111C	5'TCCAGCAGTTTCATGA GATGC3'	5'GAGGTCATTTTCATAG CTGAGC3'	94°C 30''	55°C 30''	72°C 40''
<i>Per2</i>	C111G	5'GTGCGTGTGCTTGTTA ATGC 3'	5'TCCTTGGTGGGGTTAC TGG3'	94°C 30''	55°C 30''	72°C 40''
<i>Per3</i>	VNTR (4-5 repetições)	5'CAAAATTTTATGACAC TACCAGAATGGCTGAC3'	5'AACCTTGTACTTCCAC ATCAGTGCCTGG3'	94°C 30''	58°C 30''	72°C 40''

Fonte: Autora

5.8 Análises Estatísticas

Para a análise dos dados foi utilizado o pacote estatístico *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS) 20.0. Como os dados não apresentaram normalidade (aferida pelo teste de *Kolmogorov-Smirnov*, $p < 0,05$), foram utilizados testes não paramétricos. Para a análise de correlação entre as variáveis dos três questionários foi utilizado o teste de correlação de *Spearman* e para a diferença entre as medianas os testes de *Mann-Whitney* e *Kruskal-Wallis*, sendo as variáveis dependentes agrupadas por sexo. O equilíbrio de Hardy-Weinberg foi calculado através do programa SNPstat (<http://bioinfo.iconcologia.net>) (SOLE et al., 2006). Já para as análises entre proporções genótípicas e alélicas utilizou-se o teste qui-quadrado de *Pearson*. Em todos os testes foi adotado o nível de significância estatística de $p < 0,05$.

6 RESULTADOS

6.1 Análise dos Questionários

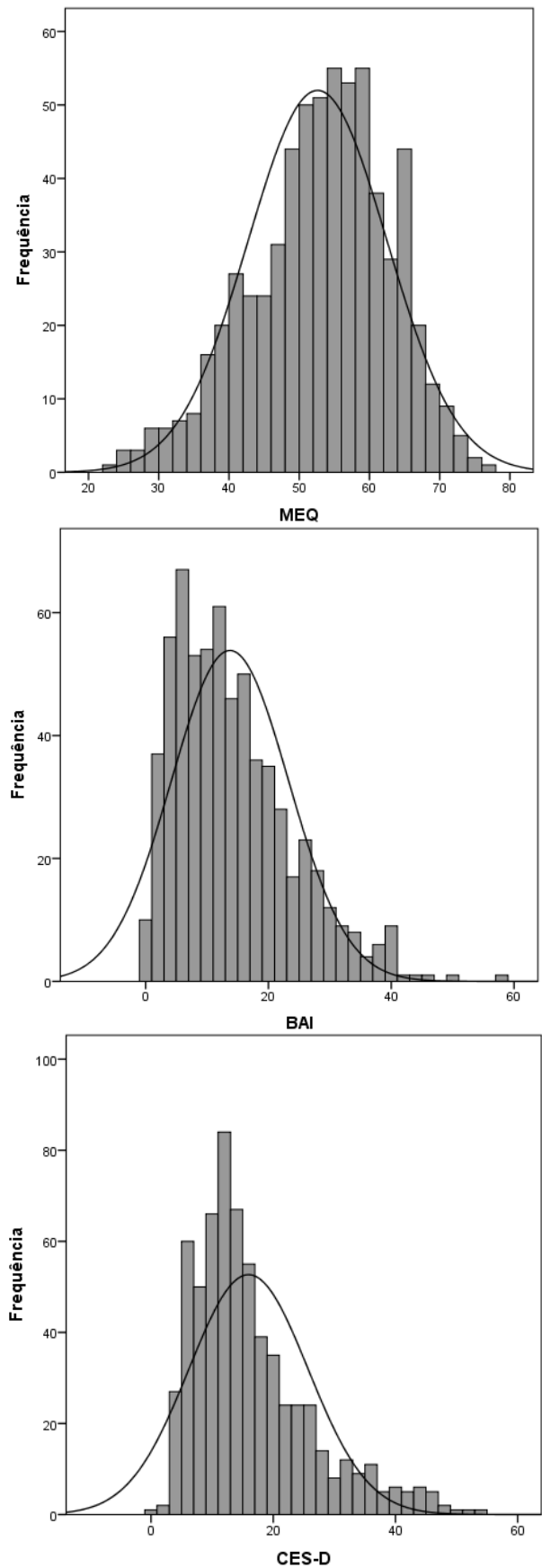
Uma amostra de 725 estudantes universitários (Alagoas, latitude 9°S), 455 mulheres e 270 homens, com idade entre 16 e 58 anos (media $\pm$ dp=20.78 $\pm$ 2.05), responderam aos questionários de cronotipo, ansiedade e depressão. Destes, 644 foram incluídos no estudo (236 homens e 408 mulheres; media de idade $\pm$ dp = 19.70 $\pm$ 2.05). Os outros 73 apresentaram idade acima de 25 anos ou dados incompletos. Os valores de MEQ variaram entre 23 e 77 (media = 52.61 $\pm$ 9.8; mediana = 54; moda = 58) e a distribuição dos cronotipos foram 163 (25.3%) vespertinos, 300 (46.6%) intermediários, e 181 (28.1%) matutinos. A tabela 6 representa o número de mulheres e homens em função do cronotipo. CES-D e BAI valores variaram entre 0-54 (media = 15.95 $\pm$ 9.7; mediana = 13; moda = 12) e 0-57 (media = 13.37 $\pm$ 9.5; mediana = 12; moda = 5), respectivamente. A distribuição das frequências de MEQ, CES-D e BAI não apresentaram uma distribuição normal como demonstrado pelo teste de *Kolmogorov-Smirnov* ($p < 0.001$) (figura 6).

Tabela 6 - Número de sujeitos em função do sexo para os cronotipos vespertinos, intermediários e matutinos.

Sexo	Cronotipo	Número	Frequência
Feminino	Vespertino	95	23,3
	Intermediário	194	47,5
	Matutino	119	29,2
	Total	408	100,0
Masculino	Vespertino	68	28,8
	Intermediário	106	44,9
	Matutino	62	26,3
	Total	236	100,0

Fonte: Autora

Figura 6 - Distribuição das frequências dos valores dos questionários MEQ, BAI e CES-D



Fonte: Autora

Como esperado, nenhuma correlação foi encontrada entre a idade e os valores de MEQ, CES-D e BAI (MEQ: $\rho = -0.671$, $p = 0.590$; CES-D: $\rho = -0.013$, $p = 0.789$; BAI: $\rho = 0.087$, $p = 0.080$) em nossa amostra. Houve uma diferença significativa entre as medianas dos questionários de cronotipo, ansiedade e depressão entre os sexos ($p < 0,05$) (Tabela 7), com mulheres apresentando valores maiores que os homens. No entanto, quando os dados dos três questionários foram analisados de forma categórica com relação ao sexo, não houve diferença significativa entre as frequências de homens e mulheres e os três cronotipos do MEQ ($\chi^2 = 2,47$, $p = 0.290$). Além disso, nenhuma diferença foi encontrada entre as categorias dos questionários de depressão e ansiedade em relação ao sexo masculino e feminino (BAI $\chi^2 = 5.73$, $p = 0.125$; $\chi^2 = 0.175$, $p = 0.675$) (Tabela 8).

A análise de correlação entre os valores dos três questionários demonstrou uma correlação negativa entre os questionários de cronotipo (MEQ) e depressão (CES-D) em ambos os sexos ($\rho = -0.18$, $p < 0.001$, em mulheres; $\rho = -0.16$, $p = 0.013$, em homens) (Figura 7A-B), mostrando que indivíduos vespertinos têm escores maiores de depressão que os matutinos. Uma correlação negativa foi encontrada entre os questionários de cronotipo e ansiedade no subgrupo do sexo masculino ($\rho = -0.15$, $p = 0.017$), mas não no sexo feminino ($\rho = 0.006$, $p > 0.05$) (Figura 7C-D). Além disso, houve uma correlação positiva entre depressão (CES-D) e ansiedade (BAI) em ambos os sexos (mulheres: $\rho = 0.671$, $p < 0.001$; homens: $\rho = 0.541$, $p < 0.001$) (Figura 7 E-F).

De acordo com esses resultados, a análise de *Kruskal-Wallis*, seguida pelo pós-teste de *Mann-Whitney*, apresentou uma diferença estatística entre as categorias dos grupos matutinos e vespertinos nos valores de CES-D (mulheres: $Z = -2.98$, $p = 0.003$; homens: $Z = -2.53$, $p = 0.011$) e nos valores de BAI em homens ($Z = -2.49$, $p = 0.013$), mas não em mulheres ($Z = -0.57$, $p = 0.598$). Além disso, houve uma diferença significativa entre os sujeitos que apresentaram traços de depressão e aqueles que não apresentaram traços de depressão, quando indivíduos matutinos e vespertinos foram analisados como dados categóricos ($\chi^2 = 7.70$, $p = 0.005$) (Figura 8).

Tabela 7 - Teste de *Mann-Whitney* para amostras independentes em relação ao sexo.

	Sexo	N	Media	Media dos Ranks	Z score	Sig.
MEQ	Feminino	408	53,31	333	-2.041	0.042
	Masculino	236	51,39	302		
BAI	Feminino	408	14,62	339	-3.101	0.002
	Masculino	236	12,2	292		
CES-D	Feminino	408	16,81	336	-2.592	0.009
	Masculino	236	14,46	297		

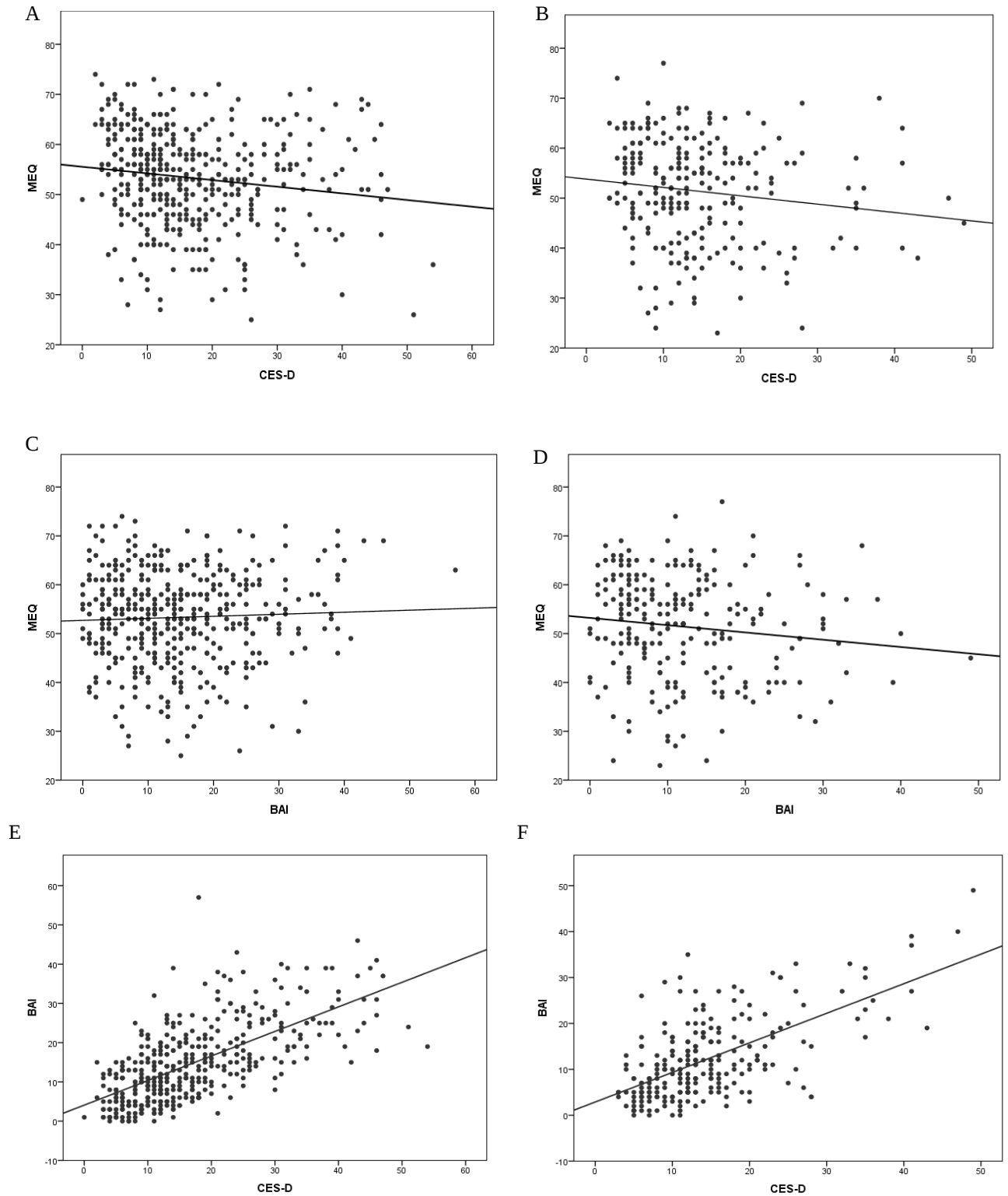
MEQ= Questionário de Matutividade e Vespertividade; BAI= Inventário de Ansiedade de Beck ; CES-D= Escala de Depressão do Centro de Estudos Epidemiológicos. Fonte: Autora

Tabela 8 - Teste χ^2 para comparação das categorias dos questionários de MEQ, BAI e CES-D em

		Sexo			χ^2	p
		Feminino	Masculino	Total		
MEQ	Intermediário	194	106	300	2,47	0,290
	Matutino	119	62	181		
	Vespertino	95	68	163		
BAI	Traços severos	24	22	46	5.73	0.125
	Traços leve-moderados	146	66	212		
	Traços normais	168	104	272		
	Traços moderado-severos	70	44	114		
CES-D	Com traços depressivos	166	100	266	0.17	0.675
	Sem traços depressivos	242	136	378		
Total		408	236	644		

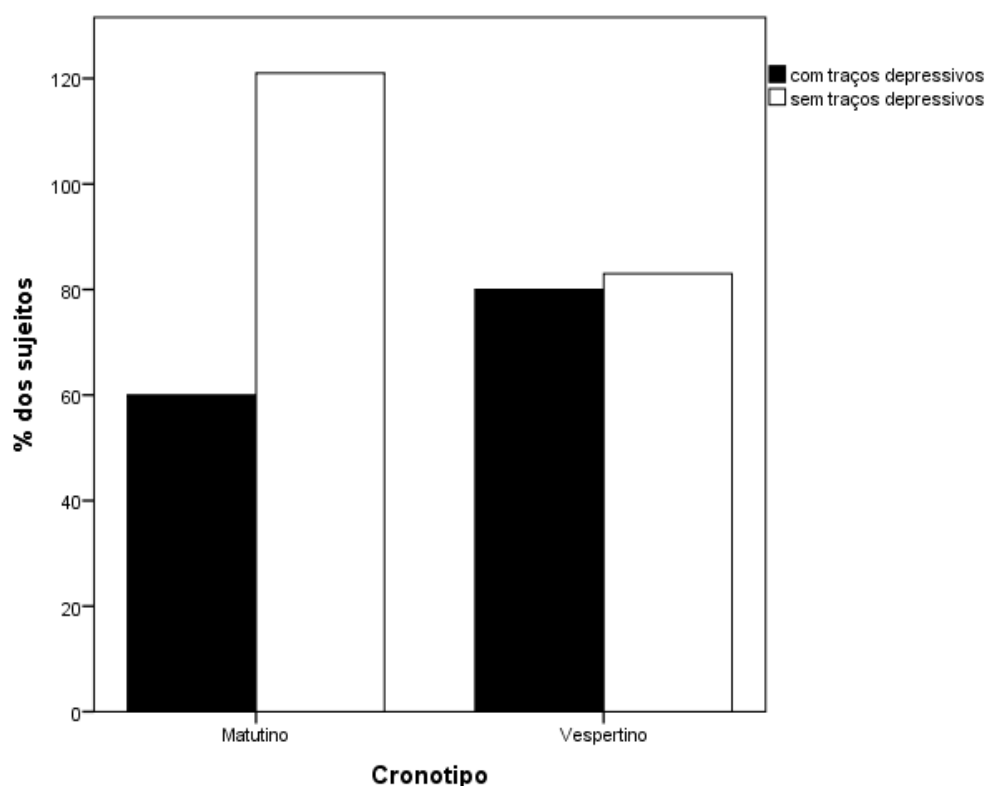
MEQ= Questionário de Matutividade e Vespertividade; BAI= Inventário de Ansiedade de Beck ; CES-D= Escala de Depressão do Centro de Estudos Epidemiológicos. Fonte: Autora

Figura 7 - Correlações entre os questionários de depressão (CES-D), cronotipo (MEQ) e ansiedade (BAI) nos sexos feminino e masculino



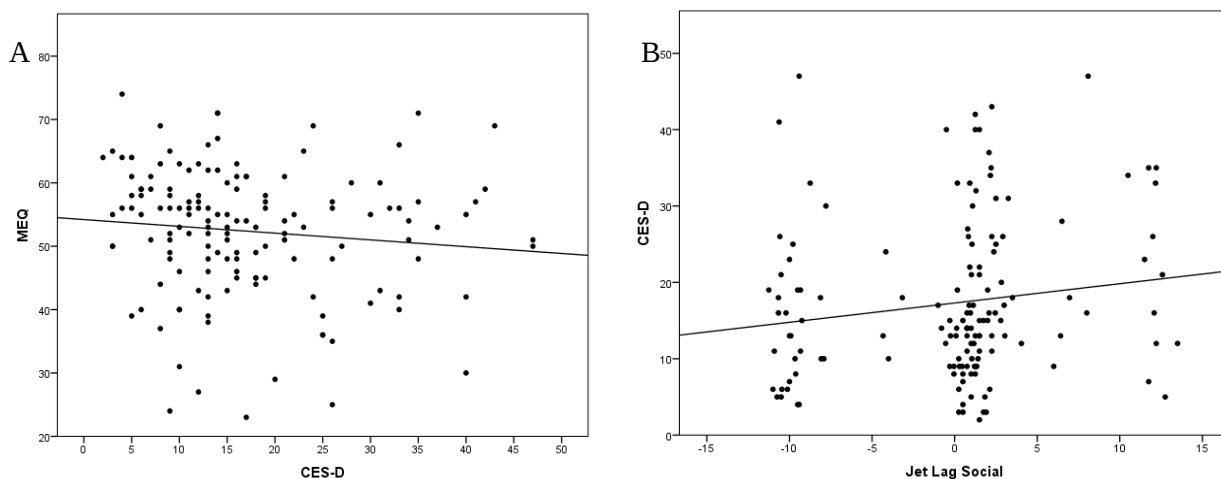
Correlação entre: depressão (CES-D) e cronotipo (MEQ), em mulheres (A) e homens (B); cronotipo (MEQ) e ansiedade (BAI), e depressão (CES-D) e ansiedade (BAI), em mulheres (E) e homens (F). Fonte: Autora

Figura 8 – Frequência dos sujeitos com traços depressivos e sem traços depressivos nos subgrupos vespertinos e matutinos



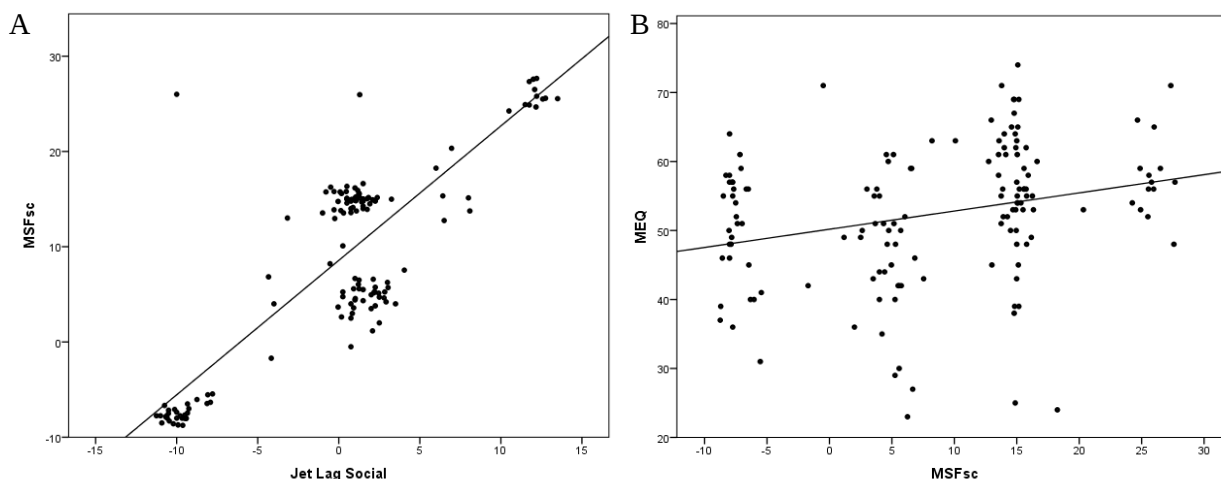
No grupo composto por 144 sujeitos, que completaram os dois questionários – MEQ e MCTQ, a associação negativa entre preferência circadiana e CES-D encontrada no grupo geral foi mantida ($\rho=0,167$, $p=0,045$) (Figura 9A). *Jet lag* social mostrou uma correlação positiva com CES-D ($\rho=0,21$, $p=0,009$) (Figura 9B) e com o cronotipo (MSF_{SC}) acessado pelo MCTQ ($\rho=0,64$, $p<0,001$) (Figura 10A), independente do sexo (CES-D: $Z= -1,82$, $p=0,068$; MSF_{SC} : $Z= -1,19$, $p=0,233$). MEQ apresentou uma correlação positiva com MSF_{SC} ($\rho= -0,28$, $p= 0,001$) (Figura 10B) Nenhuma correlação foi encontrada entre *jet lag* social e os escore de BAI ($\rho=0,08$, $p= 0,313$) (Figura 11A) ou *jet lag* social e MEQ ($\rho= -0,44$, $p= 0,605$) (Figura 11B). Quando esses dados foram analisados em relação aos três cronotipos, uma correlação positiva foi encontrada entre CES-D e *jet lag* social apenas no subgrupo matutino ($\rho= 0,42$, $p=0,008$) (Figura 12C). Nenhuma diferença entre as medianas do *jet lag* social entre os três cronotipos foi encontrada ($\chi^2=0,108$, $p=0,94$).

Figura 9 – Correlação negativa entre MEQ e CES-D (A) e positiva entre CES-D e *Jet lag* social (B)



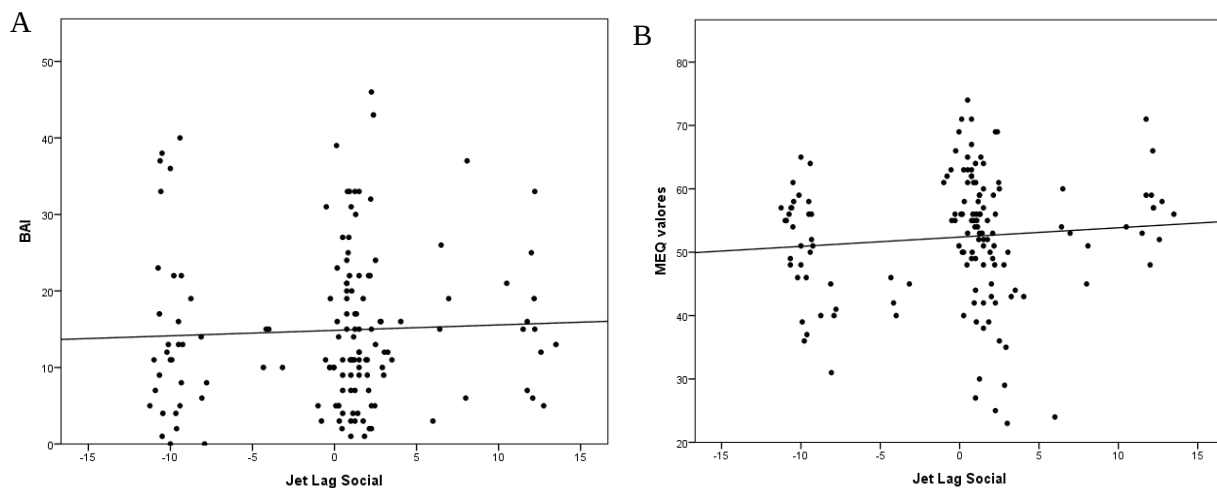
Fonte: Autora

Figura 10 – Correlação Positiva entre MSFsc e *Jet lag* Social (A) e MEQ e MSFsc (B)



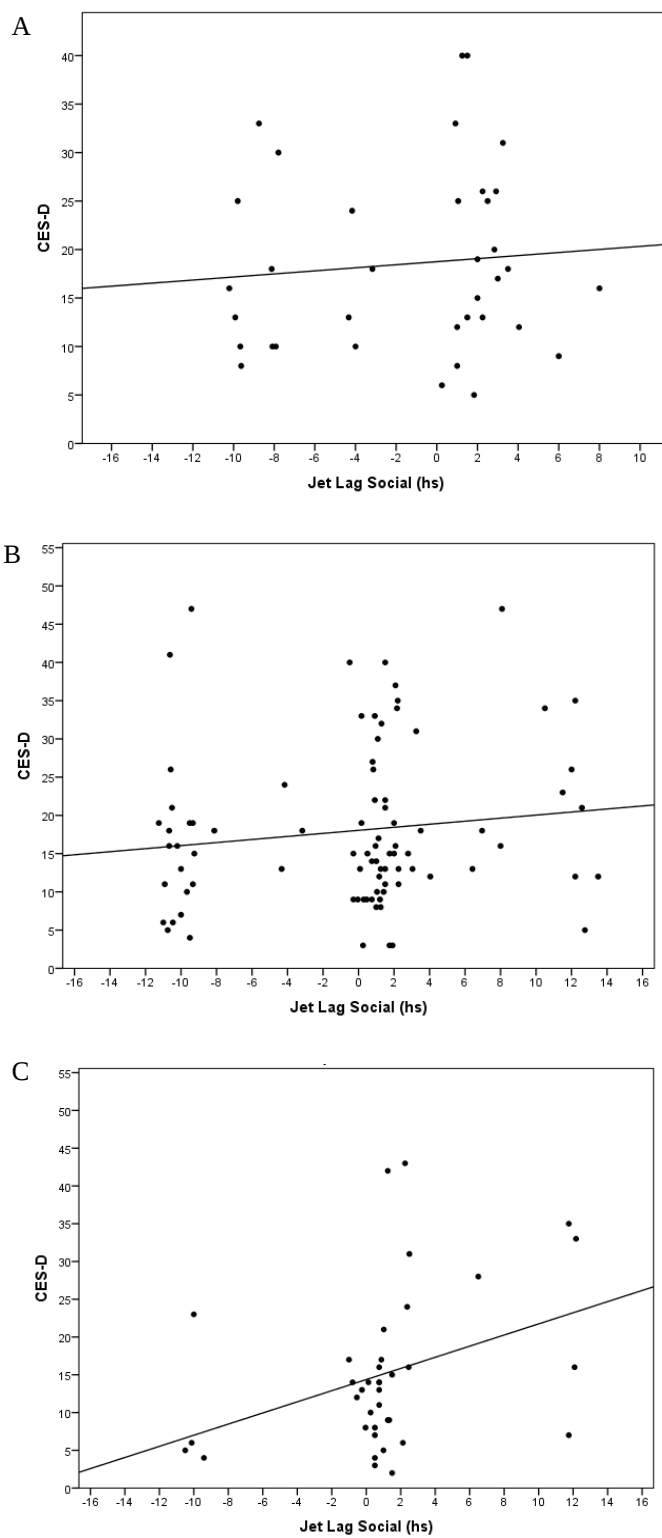
Fonte: Autora

Figura 11 – Correlação entre MEQ e *Jet lag* Social (A) e BAI e *Jet lag* Social (B)



Fonte: Autora

Figura 12 – Correlação entre os valores de CES-D e *Jet Lag* Social nos subgrupos vespertino (A), intermediário (B) e matutino (C).



Fonte: Autora

6.2 Análise de polimorfismos em genes circadianos.

Dos 644 sujeitos que responderam aos questionários, foi extraído o DNA de 180 amostras, as quais foram genotipadas para os polimorfismos C111G do gene *Per2*, T3111C do gene *Clock* e o VNTR do gene *Per3*.

6.2.1 Polimorfismo C111G do Gene *Per2*

A sequência contendo o polimorfismo foi amplificada com iniciadores específicos produzindo fragmentos de 114pb (Figura 13).

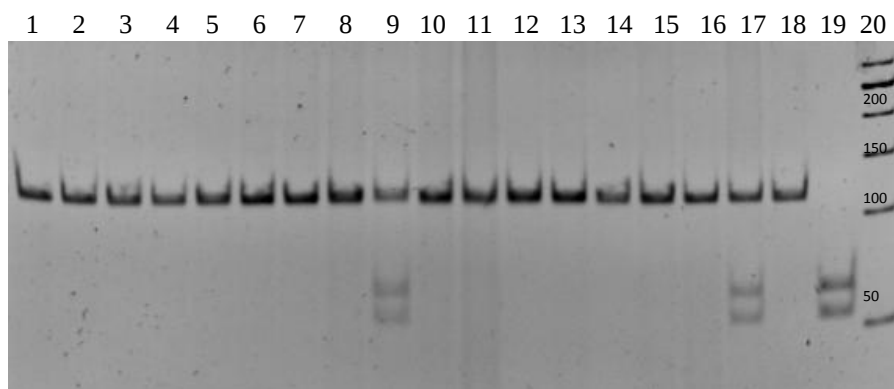
Figura 13- Fotografia do gel de agarose 2% para a visualização dos produtos da amplificação da PCR



1- Marcador de peso molecular 100pb; 2-19 amplificação das amostras e C- controle negativo. Fonte: Autor

Os produtos da amplificação foram submetidos à restrição para a detecção dos genótipos. A figura 14 mostra o produto da restrição. A amostra 20 representa o marcador de peso molecular 25pb, a amostras 13 e 19 são heterozigotas para o polimorfismo.

Figura 14 - Fotografia do gel de poliacrilamida 8% para a detecção do polimorfismo.

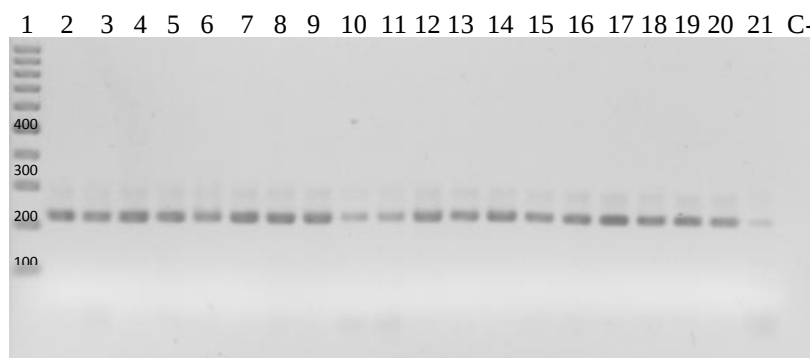


Amostras 1-8 e 10-16,18 homozigotos C/C; amostras 9 e 17 heterozigotas C/G; amostra 19 homozigota G/G; amostra 21 marcador de peso molecular 50pb. Fonte: Autora

6.2.2 Polimorfismo T3111C do Gene *Clock*

A sequência contendo o polimorfismo foi amplificada com iniciadores específicos produzindo fragmentos de 221pb (Figura 15).

Figura 15 - Fotografia do gel de agarose 2% para a visualização dos produtos da amplificação da PCR

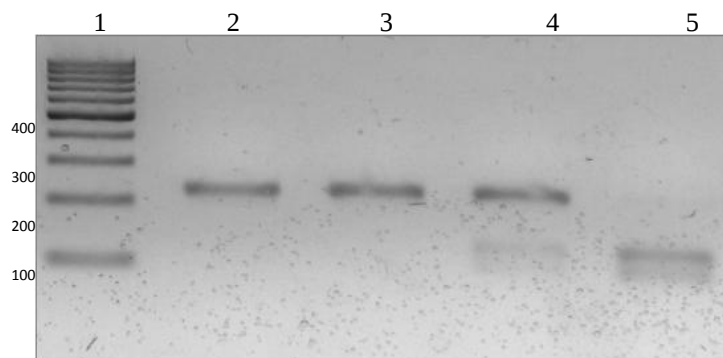


1-Marcador de peso molecular 100pb; 2-5 amplificação das amostras C- controle negativo. Fonte: Autora

Os produtos da amplificação foram submetidos à restrição (Sdu1) para a detecção dos genótipos. A figura 16 mostra o produto da restrição. A amostra 1 representa o marcador de

peso molecular 100pb, as amostras 2 e 3 são homozigotas para o alelo T; a amostra 4 é heterozigotas; a amostra 5 é homozigota para o alelo C.

Figura 16 - Fotografia do gel de agarose 3% para a detecção do polimorfismo

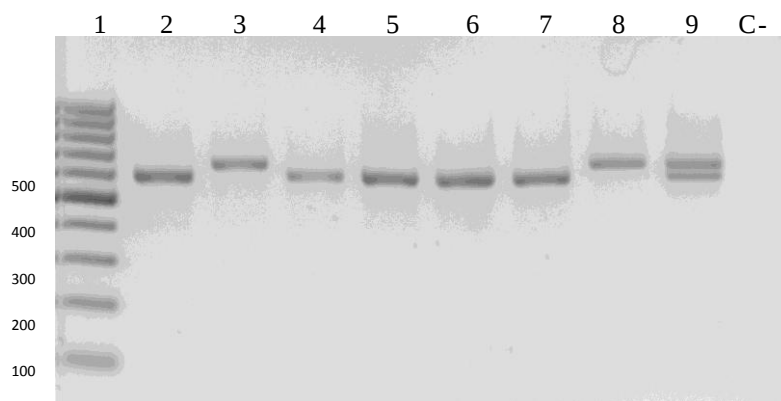


1-Marcador de peso molecular 100pb; amostras 2 e 3 homozigotas T/T; amostra 4 heterozigota T/C e amostra 5 heterozigota C/C.
Fonte: Autora.

6.2.3 Polimorfismo VNTR de *Per3*

A sequência contendo o polimorfismo foi amplificada com iniciadores específicos produzindo fragmentos de 635pb (5 repetições) e 581pb (4 repetições). Como esse polimorfismo trata - se de um VNTR de 5 e/ou 4 repetições de 54pb o mesmo pode ser genotipado apenas por PCR (Figura 17). A amostra 1 representa o marcador de peso molecular 100pb, as amostras 3 e 8 são homozigotas para o alelo 5; a amostra 9 é heterozigota; as amostras 2,4, 5, 6 são homozigotas para o alelo 4.

Figura 17- Fotografia de gel de agarose 2% para



1- Marcador de peso molecular 100pb; 4/5; 3 e 8 – homozigoto 5/5; 2, 4- 7- homozigoto 4/4 e 2- heterozigoto; C- controle negativo. Fonte: Autora

6.3 Estudos das frequências genotípicas e alélicas

A Tabela 9 mostra as frequências dos genótipos dos três polimorfismos nos diferentes grupos, matutino, vespertino e intermediário. Para o polimorfismo *Clock T3111C*, houve uma frequência maior de homozigotos T/T (57,2%), seguidos de heterozigotos (36,2%) e homozigotos C/C (6,6%). Para o polimorfismo *Per2 C111G*, a maior frequência foi de homozigotos C/C (89,5%), seguidos de heterozigoto C/G (10,0%) e homozigoto G/G (0,5%). Já para o polimorfismo *Per3 VNTR*, houve uma frequência maior de heterozigotos (49,5%), seguidos dos homozigotos 4/4 (38,5%) e homozigotos 5/5 (10,0%). Nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos matutino, intermediário e vespertino quanto às frequências dos genótipos dos três polimorfismos (*Clock* - $\chi^2 = 2,95$, $df = 4$, $p = 0,56$; *Per3* - $\chi^2 = 4,54$, $df = 4$, $p = 0,33$ *Per2* - $\chi^2 = 7,76$, $df = 4$, $p = 0,10$). A distribuição dos genótipos dos polimorfismos *Clock T3111C*, *Per2 C111G* e *Per3 VNTR* demonstraram estar em equilíbrio de *Hardy-Weinberg* ($p > 0,05$) (Tabela 10).

Tabela 9 - Frequência dos genótipos nos grupos matutino, vespertino e intermediário para os polimorfismos T3111C de *Clock* e C111G de *Per2* e VNTR de *Pe3* na população de Arapiraca.

Polimorfismo	Genótipo	Cronotipo, n (%)			
		Matutino (M)	Intermediário (I)	Vespertino (V)	Geral, n (%)
<i>Clock T3111C</i>	T/T	34(51,5)	42(56,8)	27(67,5)	103(57,2)
	T/C	28(42,4)	25(33,8)	12(30,0)	65(36,2)
	C/C	4(6,1)	7(9,4)	1(2,5)	12(6,6)
<i>Per2 C111G</i>	C/C	61(92,4)	66(89,2)	34(85,0)	161(89,5)
	C/G	5(7,6)	8(10,8)	5(12,5)	18(10,0)
	G/G	0(0,0)	0(0,0)	1(2,5)	1(0,5)
<i>Per3 VNTR</i>	4/4	25(38,0)	34(46,0)	12(30,0)	71(38,5)
	4/5	34(51,5)	34(46,0)	22(55,0)	90(49,5)
	5/5	6(10,5)	6(8,0)	6(15,0)	19(10,0)

M- matutino, I-intermediário, V-vespertino. Fonte: Autora

Tabela 10 – Distribuição das frequências alélicas e genóticas do T3111C de *Clock* , C111g de *Per 2* e VNTR de *Per3* para a avaliação do equilíbrio de *Hardy-Weinberg*

Equilíbrio de <i>Hardy-Weinberg</i> (Per2)						
Cronotipo	Genótipo			Alelos		p
	C/C	C/G	G/G	C	G	
Matutino	61	5	0	127	5	1
Intermediário	66	8	0	140	8	1
Vespertino	34	5	1	73	7	0.09
Equilíbrio de <i>Hardy-Weinberg</i> (Clock)						
Cronotipo	Genótipo			Alelos		p
	T/T	T/C	C/C	T	C	
Matutino	34	28	4	96	36	1
Intermediário	42	25	7	109	39	0.53
Vespertino	27	12	1	66	14	1
Equilíbrio de <i>Hardy-Weinberg</i> (Per3)						
Cronotipo	Genótipos			Alelos		p
	4/4	4/5	5/5	4	5	
Matutino	25	34	7	84	48	0.44
Intermediário	34	34	6	102	46	0.60
Vespertino	12	22	6	46	34	0.73

Fonte: Autora

Em relação à frequência dos alelos, o polimorfismo de *Clock T3111C* teve uma frequência maior do alelo T (72,1%) em relação ao alelo C (27,9%) e no polimorfismo de *Per2 C111G* houve uma maior frequência do alelo C (95,7%) e em relação ao G (4,3%) Já para o polimorfismo *Per3 VNTR*, houve uma frequência maior do alelo 4 (65,0%) com

relação ao alelo 5 (35,0%). As frequências dos alelos dos polimorfismos *Clock T3111C* e *Per2 C111G* e *Per3 VNTR* com relação aos cronotipos são apresentadas na tabela 11. Nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos matutino, intermediário e vespertino quanto às frequências dos alelos dos três polimorfismos (*Clock* - $\chi^2 = 2,76$, $df = 2$, $p = 0,25$; *Per2* - $\chi^2 = 0,47$, $df = 2$, $p = 0,78$; *Per3* - $\chi^2 = 4,24$, $df = 2$, $p = 0,12$).

Tabela 11 - Frequência dos alelos nos grupos matutino, vespertino e intermediário para os polimorfismos T3111C de *Clock*, C111G de *Per2* e VNTR de *Pe3* na população de Arapiraca.

Polimorfismo	Alelos	Cronotipo, n (%)			
		Matutino (M)	Intermediário (I)	Vespertino (V)	Geral, n(%)
<i>Clock T3111C</i>	T	96(72,7)	109(73,6)	66(82,5)	271(75,2)
	C	36(27,3)	39(26,4)	14(17,5)	89(24,7)
<i>Per2 C111G</i>	C	127(96,2)	140(94,5)	73(91,2)	340(94,4)
	G	5(3,8)	8(5,5)	7(8,8)	20(5,6)
<i>Per3 VNTR</i>	4	84(63,6)	102(68,5)	46(57,5)	232(64,4)
	5	48(36,4)	46(31,5)	34(43,5)	128(35,6)

M- matutino, I-intermediário, V-vespertino. Fonte: Autora

A análise de associação entre os genótipos dos três polimorfismos e os valores das medianas obtidos para os traços de ansiedade (BAI) e depressão (CES-D), não apresentou nenhuma diferença estatística (Tabela 12).

Tabela 12 - Comparação entre os valores de BAI, CES-D e MEQ e os genótipos dos polimorfismos *Clock T311C* e *Per2 C111G* .

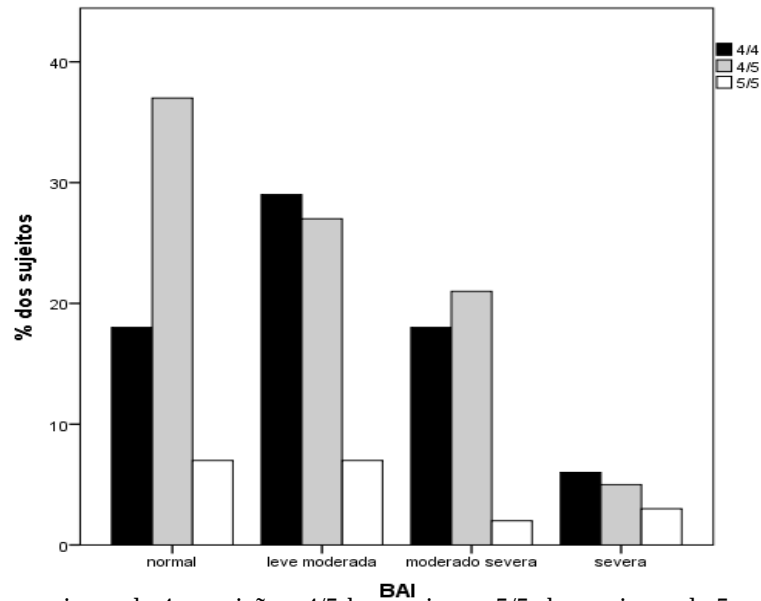
Gene	Questionário	Genótipo	N	Média	Média dos Ranks	χ^2	p
<i>Clock T311C</i>	BAI	T/T	103	13,82	88,77	1,50	0,47
		T/C	65	14,58	95,65		
		C/C	12	12,75	77,42		
	CES-D	T/T	103	15,85	88,20	0,66	0,71
		T/C	65	15,60	92,45		
		C/C	12	16,67	99,71		
	MEQ	T/T	103	52,76	85,41	2,32	0,31
		T/C	65	55,43	96,88		
		C/C	12	56,42	99,63		
<i>Per2 C111G</i>	BAI	C/C	161	13,70	88,61	3,94	0,13
		C/G	18	15,56	102,58		
		G/G	1	39,00	177,00		
	CES-D	C/C	161	15,77	90,04	2,71	0,25
		C/G	18	14,83	89,89		
		G/G	1	41,00	176,00		
	MEQ	C/C	161	54,22	91,73	1,94	0,37
		C/G	18	52,44	83,03		
		G/G	1	40,00	27,00		
<i>Per3 VNTR</i>	BAI	4/4	71	15,21	98,44	3,25	0,19
		4/5	90	12,84	83,67		
		5/5	19	15,16	93,21		
	CES-D	4/4	71	17,08	96,78	1,71	0,42
		4/5	90	14,84	86,32		
		5/5	19	15,68	86,84		
	MEQ	4/4	71	54,86	93,04	1,04	0,59
		4/5	90	53,91	90,86		
		5/5	19	50,89	79,32		

Kruskal-Wallis. Fonte: Autora

Em relação à análise categórica entre os genótipos dos polimorfismos *Per3 VNTR* e *Clock T311C* e os subgrupos dos questionários de depressão e ansiedade, não houve nenhuma diferença estatística significativa (*Per3 VNTR*: BAI: $\chi^2 = 10,69$, df = 6, p = 0,98; CES-D: $\chi^2 =$

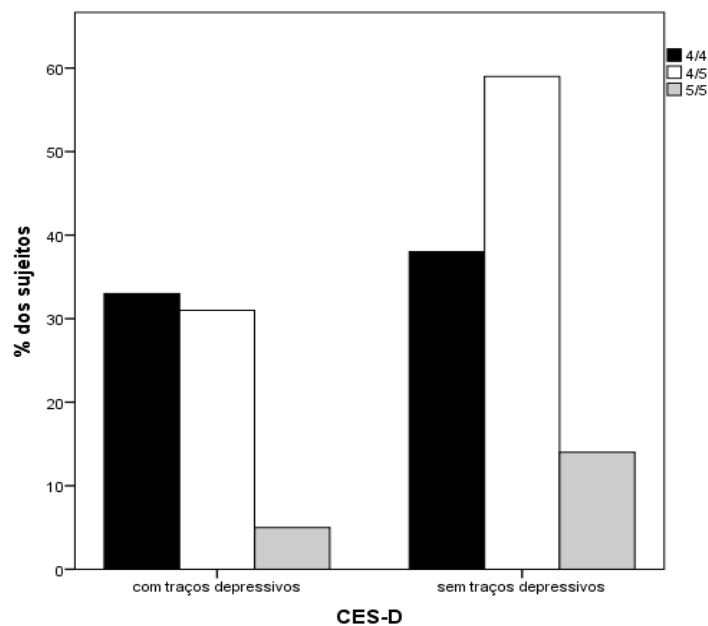
3,79, df = 2, p = 0,15; *Clock T311C*: BAI: $\chi^2 = 8,17$, df = 6, p = 0,22; CES-D: $\chi^2 = 1,47$, df = 2, p = 0,47) (Figuras 18-21). Não houve diferença significativa entre os genótipos do polimorfismo *Per2 C111G* e os subgrupos do questionário de ansiedade e depressão ($\chi^2 = 22,57$, df = 6, p >0,05; CES-D: $\chi^2 = 1,47$, df = 2, p = 0,47) (Figuras 22 e 23)

Figura 18 - Percentagem de sujeitos com cada um dos genótipos de repetição em cada uma das categorias do questionário de BAI



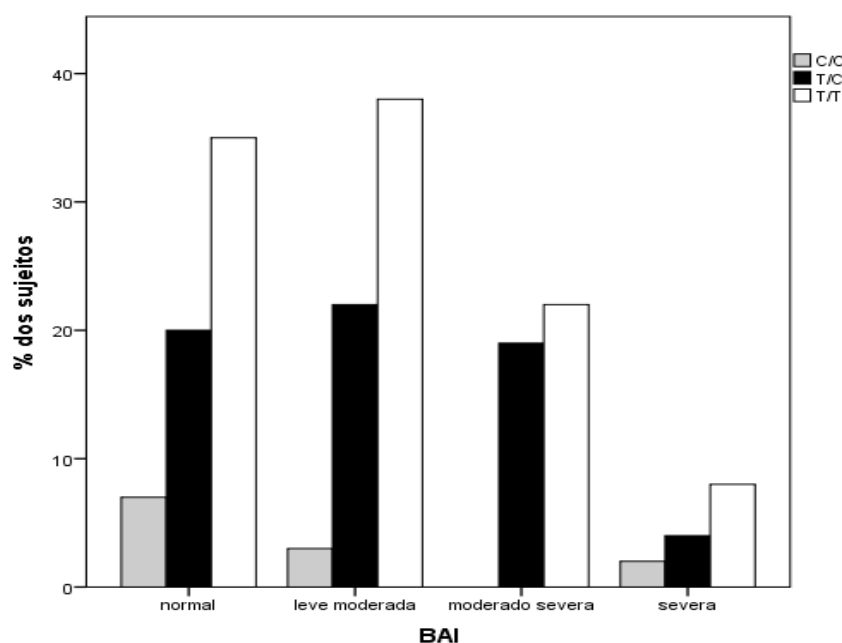
4/4- homozigoto de 4 repetições, 4/5 heterozigoto, 5/5- homozigoto de 5 repetições.
Fonte Autora.

Figura 19 - Percentagem de sujeitos com cada um dos genótipos de repetição em cada uma das duas categorias do questionário de CES-D.



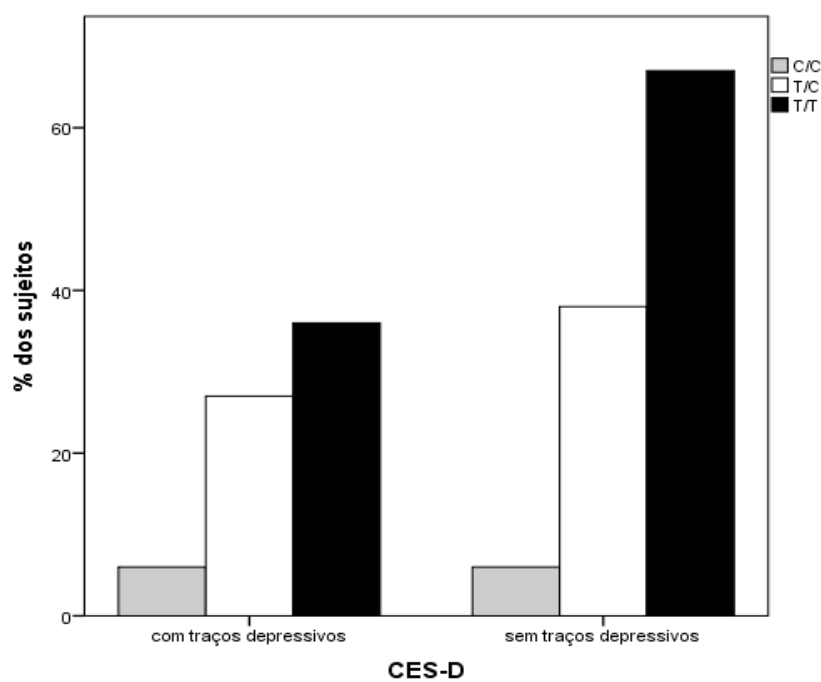
4/4- homozigoto de 4 repetições, 4/5 heterozigoto, 5/5- homozigoto de 5 repetições.
Fonte: Autora

Figura 20 - Percentagem de sujeitos com cada um dos três genótipos do polimorfismo *Clock T311C* em cada uma das categorias do questionário de BAI



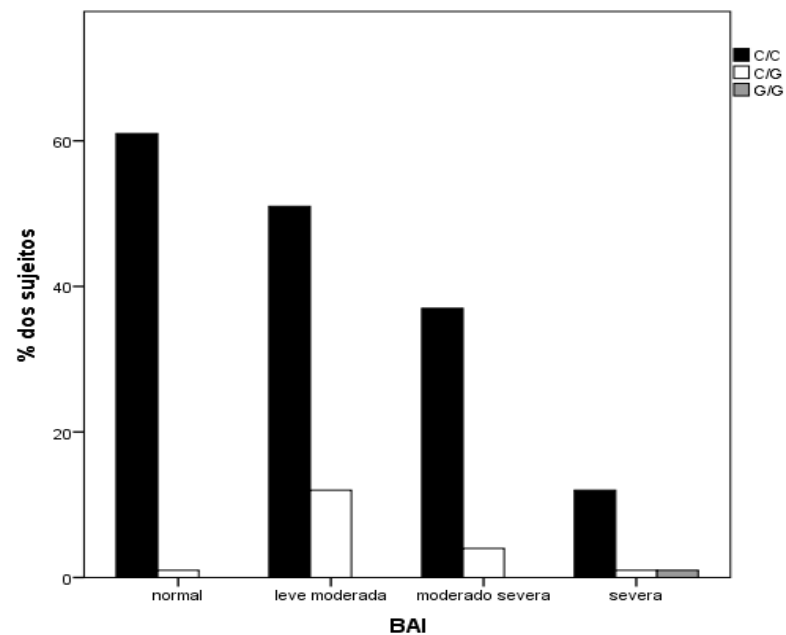
C/C- homozigoto para o alelo C, T/C heterozigoto, T/T- homozigoto para o alelo T.
Fonte Autora.

Figura 21 - Percentagem de sujeitos com cada um dos genótipos do polimorfismo *Clock T311C* em cada uma das categorias do questionário de BAI



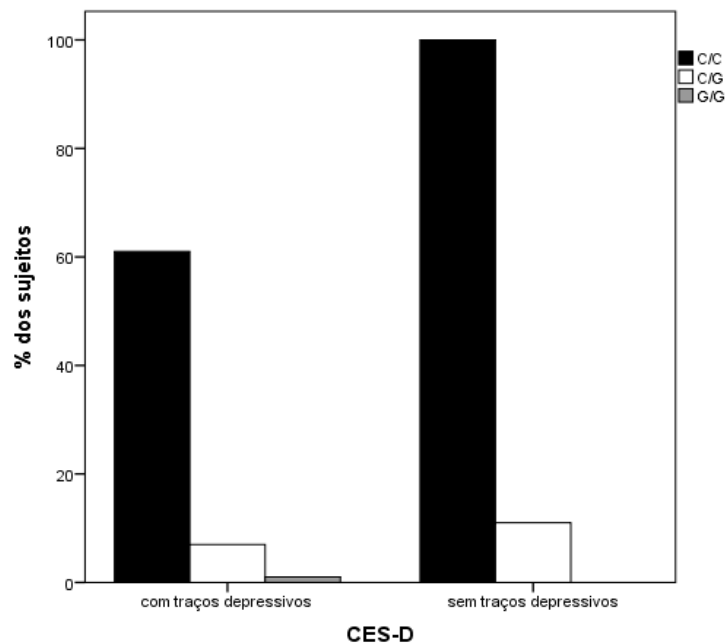
C/C- homozigoto para o alelo C, T/C heterozigoto, T/T- homozigoto para o alelo T.
Fonte Autora.

Figura 22 - Percentagem de sujeitos com cada um dos genótipos do polimorfismo *Per2 C111G* em cada uma das categorias do questionário de BAI



C/C- homozigoto para o alelo C, C/G heterozigoto, G/G- homozigoto para o alelo G.
 Fonte Autora.

Figura 23 - Percentagem de sujeitos com cada um dos genótipos do polimorfismo *Per2 C111G* em cada uma das categorias do questionário de BAI



C/C- homozigoto para o alelo C, C/G heterozigoto, G/G- homozigoto para o alelo G.
 Fonte Autora.

6.4 Estudos das interações entre polimorfismos

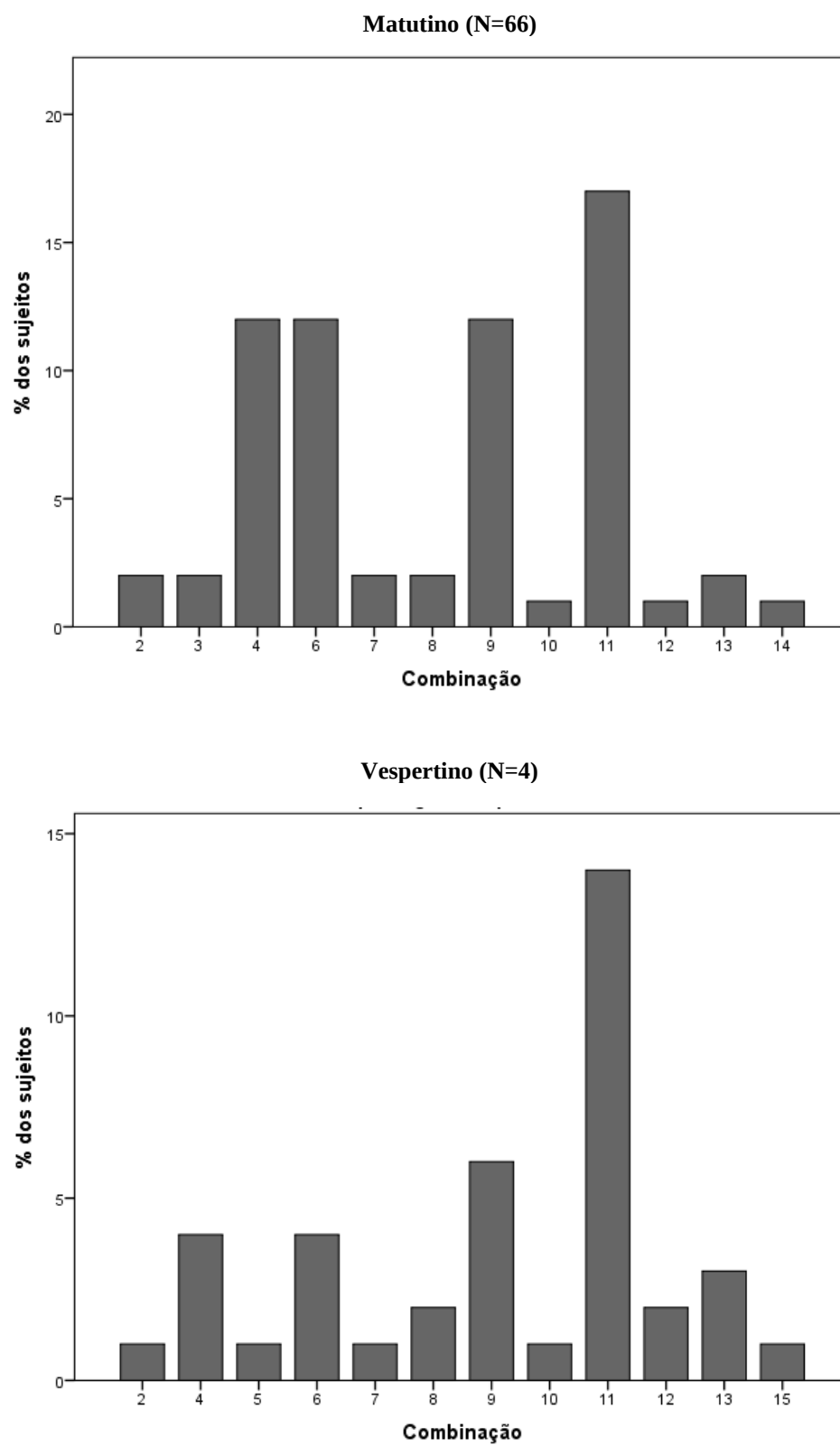
Das 27 combinações matematicamente possíveis entre os genótipos dos três polimorfismos, foram encontradas apenas 15 (Tabela 13). Combinações envolvendo frequências alélicas menores são menos prováveis de serem encontradas. Nenhuma diferença significativa foi encontrada entre as combinações dos três polimorfismos entre os subgrupos matutinos e vespertinos ($p>0.05$) (Figura 25). Além disso, não houve diferença significativa entre as combinações genótípicas dos três polimorfismos e os indivíduos com traços depressivos e sem traços depressivos ($p>0.05$) e, os indivíduos com traços de ansiedade normal-leve moderado e moderado severo-severo ($p>0.05$).

Tabela 13 - Combinação genotípica dos polimorfismos nos genes *Clock*, *Per2* e *Per3*

NCG	Clock	Per3	Per2	N	%
1	C/C	4/4	C/C	4	2,2
2	C/C	4/5	C/C	5	2,8
3	C/C	5/5	C/C	3	1,7
4	T/C	4/4	C/C	27	15,0
5	T/C	4/4	C/G	3	1,7
6	T/C	4/5	C/C	27	15,0
7	T/C	4/5	C/G	3	1,7
8	T/C	5/5	C/C	5	2,8
9	T/T	4/4	C/C	31	17,2
10	T/T	4/4	C/G	6	3,3
11	T/T	4/5	C/C	50	27,8
12	T/T	4/5	C/G	5	2,8
13	T/T	5/5	C/C	9	5,0
14	T/T	5/5	C/G	1	0,6
15	T/T	5/5	G/G	1	0,6
N				180	100

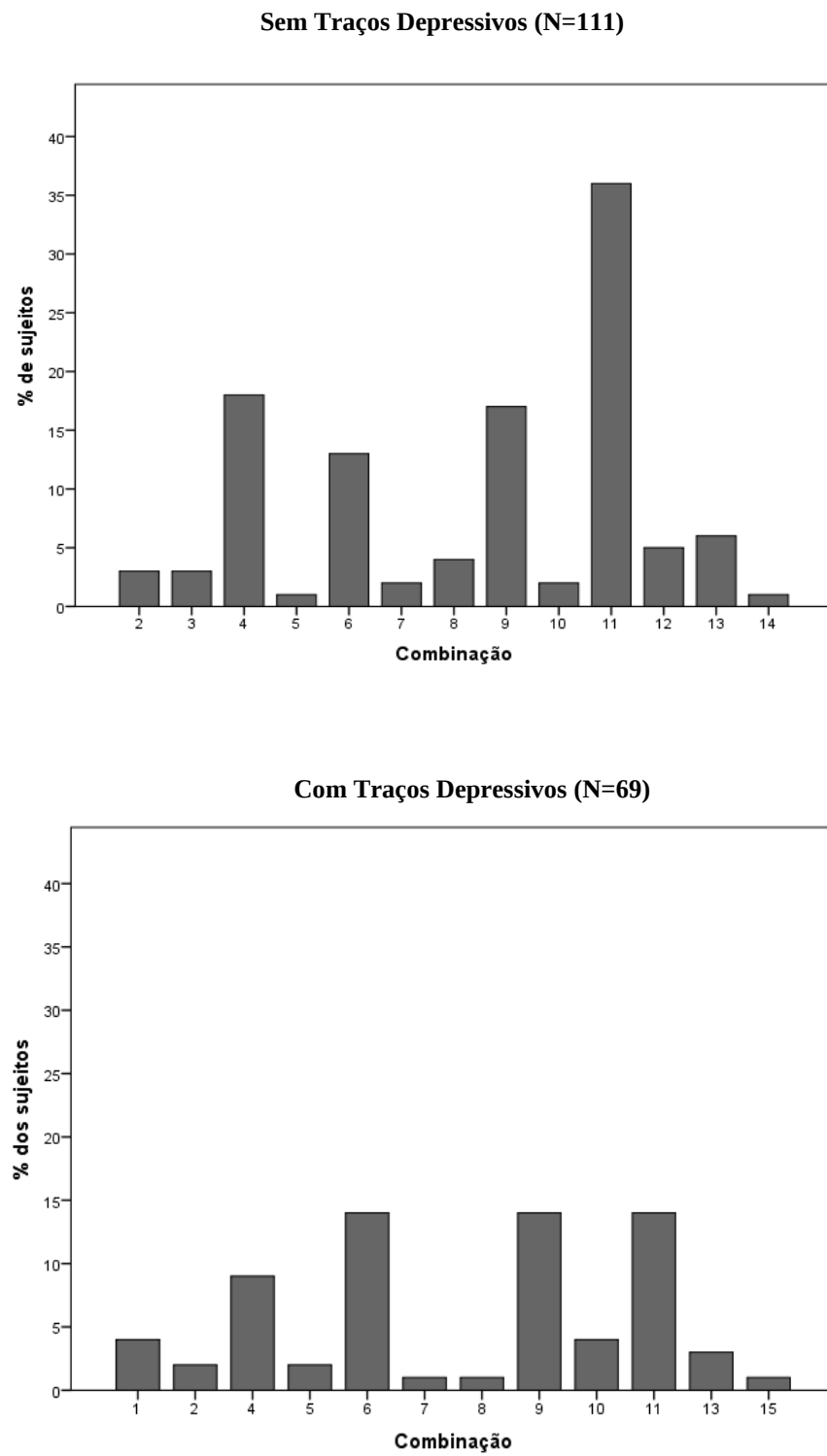
NCG: Número de combinações genótípicas. Fonte: Autora

Figura 24. Distribuição das frequências das combinações dos três polimorfismos nos subgrupos matutinos e vespertinos



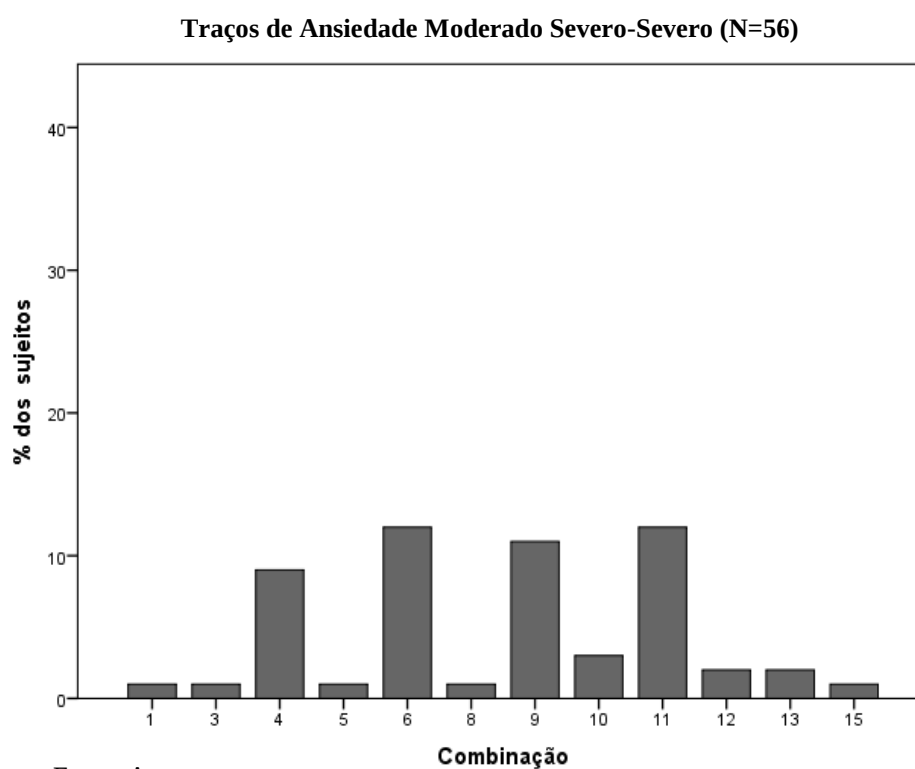
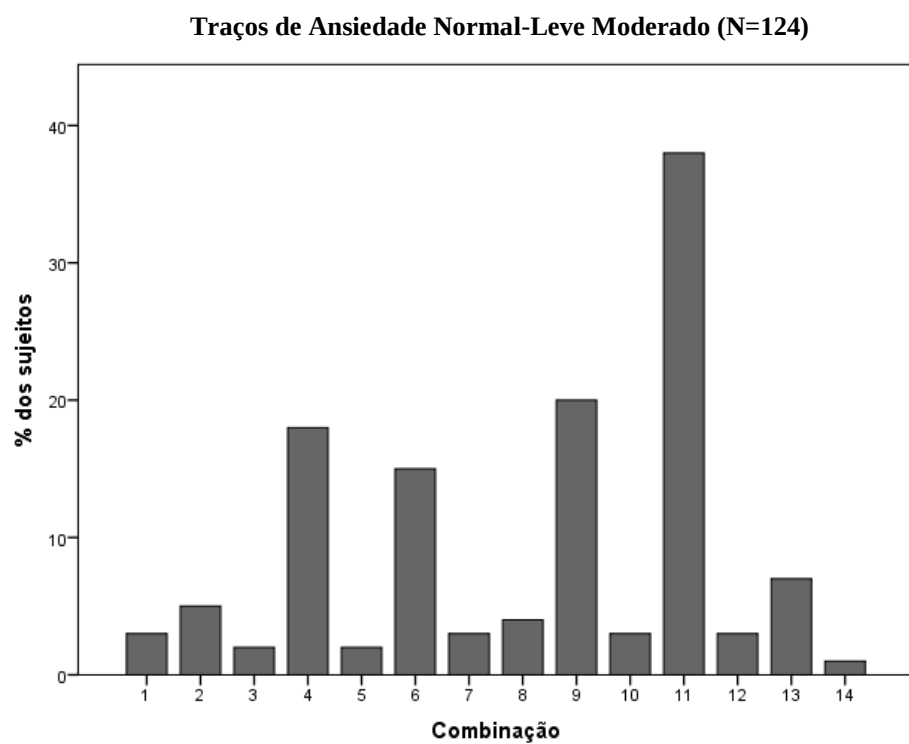
Fonte: Autora

Figura 25. Distribuição das frequências das combinações dos genótipos dos três polimorfismos nos subgrupos sem traços de depressão e com traços de depressão



Fonte: Autora

Figura 26. Distribuição das frequências das combinações dos genótipos dos três polimorfismos nos subgrupos sem traços de ansiedade normal-leve moderado e traços de ansiedade moderado severo-severo



Fonte: Autora

7 DISCUSSÃO

Alterações nos ritmos biológicos estão relacionadas com transtornos do humor e ansiedade. Sintomas de depressão e ansiedade apresentam alterações circadianas, com sintomas mais severos ocorrendo durante a manhã, na depressão, e no período da tarde e início da noite, na ansiedade (WIRZ-JUSTICE, 2008; WULFF et al., 2010; CAMERON et al., 1986). Além disso, estudos sugerem que a vespertinidade é um fator de risco para esses distúrbios (CHELMINSKI et al., 1999; KITAMURA et al., 2010; PABST et al., 2009).

Em nosso estudo, uma diferença significativa foi encontrada entre as medianas dos valores do MEQ, do CES-D e do BAI com relação aos sexos masculino e feminino, mostrando que indivíduos do sexo feminino tendem a serem mais matutinos e apresentarem mais traços de depressão e ansiedade que os indivíduos do sexo masculino, corroborando com os dados encontrados na literatura (TAKEUCHI et al., 2002; GIANNOTTI et al., 2002; ALTEMUS, 2006; NATALE; DANESI, 2002; RANDLER, 2007).

Um estudo envolvendo 2135 estudantes universitários com idade entre 18 e 30 anos mostrou que a média dos escores do MEQ foi significativamente maior em mulheres em relação aos homens (NATALE; DANESI, 2002). Hidalgo et al., (2009) demonstrou que indivíduos do sexo feminino apresentaram mais sinais depressivos que os do sexo masculino em uma amostra de sujeitos saudáveis. Diaz-Morales et al., (2008), por sua vez, encontraram uma diferença significativa nos traços de ansiedade entre os gêneros masculino e feminino, com mulheres apresentando uma média maior que os homens, em uma amostra de adultos residentes na zona rural.

Diferenças na tipologia circadiana entre os sexos podem estar relacionados a padrões de sincronização ambientais diferentes para homens e mulheres (ADAN; NATALE, 2002). Estudos sugerem que a fase avançada dos ritmos circadiano em indivíduos matutinos refletem uma maior sensibilidade ao *Zeitgeber* ambiental (NATALE; CICOGNA, 1996). Além disso, diferenças entre homens e mulheres podem estar relacionadas à influência socio-cultural (PARK et al., 1997). Contudo, diferença entre sexos nos transtornos de ansiedade e depressão podem estar relacionados a influências hormonais e ambientais (ALTEMUS,

2006). Entretanto, quando os subgrupos dos três questionários foram analisados em relação ao sexo, não houve diferença estatística em nenhum dos grupos.

A análise da distribuição da preferência circadiana em nossa amostra mostrou que existem mais tipos intermediários (46.6%), seguidos por matutinos (28.1%) e vespertinos (25.3%). Em relação aos indivíduos matutinos e vespertinos, esses resultados apresentam uma diferença significativa (χ^2 , $p < 0,001$) com relação as frequências encontrados por Alam et al., (2008) em um estudo realizado no sul do país. Eles encontraram mais vespertinos (32%) que matutinos (14%) em uma amostra de 648 sujeitos. Essa diferença nas frequências entre matutinos e vespertinos pode ser resultado da influência de fatores como latitude/longitude e zona climática (RANDLER, 2008; SMITH et al., 2002; PEREIRA et al, 2005; BORISENKOV, 2010).

O estado de Alagoas está localizado a 9°S e possui um clima tropical, enquanto que o estado do Rio Grande do Sul está localizado a 32°S e possui um clima temperado. Smith et al. (2002) sugere que pessoas que vivem em regiões tropicais tendem a ser mais matutinas que aquelas que vivem em regiões temperadas. Em um estudo envolvendo adolescentes de 16 escolas germânicas localizadas em diferentes regiões ao redor do mundo, Randler (2008) encontrou uma influência significativa das zonas climáticas na preferência circadiana, com adolescentes de escolas localizadas nos trópicos sendo mais matutinas que aqueles dos subtrópicos. Em uma pesquisa envolvendo cinco cidades brasileiras, demonstrou-se que indivíduos residentes nas cidades localizadas na região norte do país apresentaram uma média maior dos valores do MEQ que aqueles residentes nas cidades localizadas na região sudeste (BENEDITO-SILVA et al.,1998).

Em relação aos valores dos questionários de MEQ, BAI e CES-D, foi encontrada uma correlação negativa entre os valores dos questionários de cronotipo e depressão em ambos os sexos, demonstrando que indivíduos vespertinos tendem a apresentar mais traços depressivos que os indivíduos matutinos, corroborando com os resultados encontrados em diferentes estudos (CHELMINSK et al., 1999; PABST et al., 2009; KITAMURA et al., 2010). Embora estudos relatem uma correlação negativa entre cronotipo e traços de ansiedade no sexo feminino (DÍAZ-MORALES e SÁNCHEZ-LÓPEZ, 2008; PABST et al., 2009), nosso estudo apresentou uma correlação negativa apenas no subgrupo do sexo masculino, indicando que indivíduos vespertinos do sexo masculino tendem a terem mais traços de ansiedade que os matutinos. Resultado semelhante foi encontrado por Matthews (1988), no qual a associação

entre MEQ e ansiedade foi encontrada apenas em homens. Uma possível explicação para isso está no fato de que como indivíduos do sexo feminino são mais matutinos que os do sexo masculino, as mulheres tendem a se ajustar melhor ao ciclo social de sono/vigília (acordar e dormir “cedo”). Assim, mulheres com traços de ansiedade poderiam ser mais aptas a responder as pistas ambientais e manter um ciclo normal de vigília/sono que os homens (MATTEWS, 1988).

A influência dos ritmos sociais nos traços de depressão e ansiedade também foi analisada no subgrupo da nossa amostra que respondeu ambos os questionários de cronotipo MEQ e MCTQ. Foi encontrada uma correlação positiva entre os escores de CES-D e *jet lag* social e mantida a correlação negativa entre MEQ e CES-D. Diferentemente, nenhuma correlação foi encontrada entre BAI e *jet lag*. Uma correlação positiva foi encontrada entre o cronotipo (MSFsc) acessado pelo MCTQ e *jet lag* social. Tais resultados demonstram que sintomas depressivos estão associados com *jet lag* social independentemente de cronotipo, acessado por MEQ.

O questionário de MEQ é o mais utilizado no mundo todo para a avaliação da preferência circadiana. Suas questões se baseiam no bem estar de cada indivíduo com relação aos horários de dormir e realizar atividades (HORNE e OSTBERG, 1976). Já o MCTQ, se baseia no ponto médio da fase do sono nos dias livres ajustado para o acúmulo de sono nos dias de trabalho (MSFsc) (ROENNEBERG, 2003). Além disso, o *jet lag* social é calculado pela diferença entre o tempo médio do sono nos dias livre e dias de trabalho/estudo (WITTMANN et al., 2006b). Assim, a relação entre vespertinidade (acessada pelo MCTQ) e *jet lag* social pode ser o resultado da natureza do cálculo, visto que existem variáveis em comum na avaliação do MCTQ para a determinação do cronotipo e do *jet lag* social.

Os horários de estudo e trabalho impostos pela sociedade interferem na preferência individual do sono. Sujeitos com preferência matutina tendem a acordar e dormir cedo, além de serem mais ativos na primeira parte do dia, enquanto que sujeitos vespertinos tendem a dormir e acordar tarde e preferem realizar suas atividades na segunda parte do dia. Assim, para os vespertinos, trabalhar e estudar cedo pode levar a um aumento no débito de sono durante a semana, o qual é compensado nos finais de semana (WITTMANN et al., 2006b).

Por outro lado, os horários sociais podem afetar também os cronotipos matutinos. Selvi et al. (2007) relatou que a privação de sono no humor depressivo é influenciada pela

tipologia circadiana, com matutinos apresentando um humor depressivo pior que os vespertinos. Em nosso estudo, foi encontrada uma correlação entre os valores de CES-D e *jet lag* social apenas no subgrupo matutino (acessado por MEQ), quando os 144 sujeitos foram agrupados com relação ao cronotipo, demonstrando que sintomas depressivos estão associados com *jet lag* social apenas em matutinos. Entretanto, esse resultado pode estar relacionado apenas ao número pequeno de indivíduos vespertinos em nossos dados.

A associação de polimorfismos em genes do relógio com preferência circadiana tem sido descrita em diferentes populações (KATZENBERG et al., 1998; ARCHER et al., 2003; JOHANSSOM et al., 2003; MISHIMA et al., 2005; CARPEN et al., 2006). Alterações nesses genes também estão relacionadas a distúrbios denominados de síndrome da fase atrasada do sono (SFAS) e síndrome da fase avançada do sono (SFAVS) (ARCHER et al., 2003; EBISAWA et al., 2001; JONES et al., 1999; PEREIRA et al., 2005). Além disso, muitos polimorfismos nesses genes estão associados com os diferentes distúrbios de humor (UTGE et al., 2010; LEVEBRATT et al., 2010; SIPILA et al., 2010). O polimorfismo T3111C do gene *Clock* foi associado a maiores taxas de recorrência de episódios na de Depressão Bipolar (BENEDETII et al., 2003) e o polimorfismo VNTR do gene *Per 3* foi associado a influência da idade de início no transtorno bipolar (BENEDETII et al., 2008).

Em nosso estudo, não houve diferença significativa entre as medianas do questionário de cronotipo e os genótipos dos polimorfismos *Clock T3111C*, *Per2 C111G* e *Per3 VNTR*. Nenhuma associação foi encontrada entre os genótipos e alelos dos três polimorfismos com preferência circadiana. Resultados semelhantes foram encontrados em diferentes estudos de associação envolvendo genes circadianos (PEDRAZZOLI et al., 2000; ROBILLIARD et al., 2002; PEDRAZZOLI et al., 2007; CHANG et al., 2011; CHOUB et al., 2010; OSLAND et al., 2011). Entretanto, pode-se observar que para o polimorfismo T3111C do gene *Clock*, as frequências alélicas e genotípicas são semelhantes às encontradas no sudeste do país (PEDRAZZOLI et al., 2007). Embora as frequências sejam semelhantes, dois homozigotos C/C foram encontrados no subgrupo intermediário em Alagoas, enquanto que nenhum genótipo C/C foi encontrado no subgrupo intermediário do sudeste.

Com relação ao polimorfismo C111G do gene *Per 2*, as frequências dos alelos na população de alagoas são semelhantes às frequências alélicas encontradas por Carpen et al. (2005) em uma amostra da população britânica, e por Choub et al. (2010) em uma amostra da população italiana. Em ambas as populações, a frequência do alelo G mostrou-se relativamente baixa, indicando a raridade desse alelo. Além disso, Choub e colaboradores

também não encontram nenhuma associação entre o alelo 111G e matutividade, previamente encontrada por Carpen et al. (2005). Uma possível explicação para a não associação dos polimorfismos *Clock T3111C* e *Per2 C111G* com preferência diurna seria o tamanho amostral utilizado em nosso estudo.

Já, em relação ao polimorfismo VNTR de *Per3*, a frequências alélicas são semelhantes àquelas encontrada por Archer et al. (2003) e por Pereira et al. (2005), em uma amostra do sudeste do país. Embora as frequências gerais sejam semelhantes, nossa amostra apresentou uma frequência maior do alelo de 5 repetições no subgrupo vespertino. Acher et al. (2003) e Pereira et al. (2005) encontraram uma frequência de 0,24 e 0,23 para o alelo de 5 repetições no subgrupo de vespertinos respectivamente, enquanto em nosso estudo foi encontrada a frequência de 0,45 para esse alelo no mesmo subgrupo. Possíveis explicações para esses achados estão relacionadas à diferença de latitude entre essas regiões e ao tamanho amostral.

Flutuações diárias na intensidade de luz e temperatura e mudanças sazonais variam consideravelmente em diferentes latitudes (NADKARNI et al., 2005; CIARLEGLIO et al., 2008). Como os fenótipos circadianos resultam da interação entre o meio (ciclo claro/escuro) e o organismo, em diferentes latitudes o mesmo genótipo pode resultar em fenótipos diferentes. Estudos em *Drosophila* tem demonstrado que diferentes padrões de comportamento circadiano dependentes de temperatura estão relacionados a variantes polimórficas no gene *per* encontradas na natureza (ROGERS et al., 2004). Archer et al. (2003) encontrou uma frequência maior do alelo de 4 repetições em um grupo de pacientes com SFAVS do que na população geral. Diferentemente, Pereira et al (2005) encontrou uma frequência maior do alelo de 5 repetições em um grupo de pacientes com a mesma síndrome, sugerindo assim, que a latitude pode ter um papel importante na modulação da expressão genotípica do polimorfismo *Per3 VNTR* (PEREIRA et al., 2005).

Em relação aos polimorfismos *Clock T3111C*, *Per2 C111G* e *Per3 VNTR* e os valores obtidos para os traços de ansiedade (BAI) e depressão (CES-D), nenhuma diferença significativa foi encontrada entre as medianas desses questionários e os genótipos dos três polimorfismos. Além disso, não foi encontrada diferença estatística entre as análises categóricas envolvendo os genótipos dos três polimorfismos e os subgrupos dos questionários de ansiedade (BAI) e depressão (CES-D). Embora, nenhuma diferença tenha sido encontrada, observa-se que no subgrupo que apresenta traços de ansiedade mais severos e no subgrupo com traços de depressão há uma frequência maior do genótipo 4/4, indicando que esse genótipo pode representar um provável fator de risco para ansiedade e depressão, visto que o

alelo 4 foi associado com vespertinidade em diferentes populações (ACHER et al., 2003; PEREIRA et al., 2005).

Embora estudos realizados em diferentes populações ao redor do mundo tenham demonstrado que polimorfismos em genes circadianos estão associados com tipologia circadiana, ainda existem discrepâncias entre os resultados e, apenas um estudo tem analisado o efeito combinado de mais de dois genes. Pedrozzoli et al. (2010) encontraram combinações diferentes dos genótipos de quatro genes do relógio biológico (*Per2*, *Per2*, *Clock* e *Bmal1*) em sujeitos matutinos e vespertinos. Em nosso estudo, nenhuma diferença significativa foi encontrada entre as combinações dos genótipos dos três polimorfismos (*Clock T3111C*, *Per2 C111G* e *Per3 VNTR*) e preferência diurna. Uma provável explicação para esse achado seria o tamanho amostral. Em seu estudo, Pedrozzoli et al. (2010) utilizaram apenas indivíduos com cronotipos extremos, enquanto que o nosso estudo foi composto por matutinos e vespertinos moderados/extremos. Além disso, não houve diferença entre a interação desses polimorfismos e os fenótipos de traços de ansiedade e traços de depressão.

Os resultados encontrados nesse trabalho sugerem que indivíduos vespertinos apresentam maiores traços de ansiedade e depressão que os matutinos, corroborando com dados da literatura, e que, traços de depressão estão associados com *jet lag* social, independente do cronotipo acessado por MEQ. Em relação aos polimorfismos *T3111C*, *Per2 C111G* e *Per3 VNTR* nenhuma associação foi encontrada com preferência circadiana. No entanto, como variações em genes do relógio têm sido associadas ao metabolismo, sono e a distúrbios do humor e de ansiedade, e sendo os ritmos circadianos fundamentais para a manutenção das funções celulares, o entendimento desses mecanismos é de suma importância, visto que polimorfismos em genes do relógio podem alterar os ritmos circadianos, e consequentemente, padrões fisiológicos e comportamentais. Além disso, o entendimento desses mecanismos pode ter uma implicação importante para estratégias terapêuticas e no tratamento de distúrbios do sono e transtornos do humor e ansiedade.

8 CONCLUSÕES

8.1 Indivíduos vespertinos apresentaram mais traços de depressão (em ambos os sexos) e de ansiedade (em homens) que os matutinos, corroborando com os dados da literatura;

8.2 Uma correlação positiva foi encontrada entre traços de depressão e *Jet lag* social, independentemente de cronotipo acessado por MEQ;

8.3 Nenhuma associação foi encontrada entre os polimorfismos *Clock T3111C*, *Per2 C111G* e *Per3 VNTR* e preferência circadiana;

8.4 As frequências alélicas dos três polimorfismos encontradas na população estudada foram 0,721 para o alelo 3111T e 0,279 para o 3111C do gene *Clock* ; 0,957 para o alelo 111C e 0,43 para o alelo 111G do *Per2*; e 0,65 para o alelo de 4 repetições e 0,35 para o alelo de 5 repetições para o gene *Per3* .

8.5 Nenhuma associação foi encontrada entre os polimorfismos *Clock T3111C*, *Per2 C111G* e *Per3 VNTR* e os valores obtidos para cronotipo e traços de ansiedade (BAI) e depressão (CES-D),

8.6 Nenhuma associação foi encontrada entre os genótipos combinados dos três polimorfismo e preferência circadiana ou as alterações do humor (ansiedade e depressão).

8.7 Indivíduos do subgrupo que apresentaram traços de ansiedade mais severos e traços de depressão mostraram uma frequência maior do genótipo 4/4 que aqueles sem esses sinais, indicando um provável fator de risco desse genótipo para ansiedade e depressão.

LIMITAÇÕES

As limitações desse trabalho estão relacionadas ao tamanho amostral utilizado para as análises genéticas e de *Jet lag* social. Além disso, para as análises genéticas não foram considerados apenas os 7% dos sujeitos pertencentes aos extremos da escala do MEQ, que torna as amostras dos subgrupos mais bem delimitadas e discrepantes do ponto de vista de caracterização genotípica.

REFERÊNCIAS

- ABRAO, M. G. et al. Standardization of DNA extraction with NaCl from oral mucosa cells: application in PROP1 gene study. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, v. 49, n. 6, p. 978-82, Dec 2005.
- ADAN, A. et al. Circadian typology: a comprehensive review. **Chronobiol Int**, v. 29, n. 9, p. 1153-75, Nov 2012.
- ADAN, A.; NATALE, V. Gender differences in morningness-eveningness preference. **Chronobiol Int**, v. 19, n. 4, p. 709-20, Jul 2002.
- ALAM, M. F. et al. Characterization and distribution of chronotypes in southern Brazil: gender and season of birth differences. **Jornal Brasileiro de Psiquiatria**, v. 57, n. 2, p. 83-90, 2008.
- ALBRECHT, U.; EICHELE, G. The mammalian circadian clock. **Curr Opin Genet Dev**, v. 13, n. 3, p. 271-7, Jun 2003.
- ALLEBRANDT, K. V.; ROENNEBERG, T. The search for circadian clock components in humans: new perspectives for association studies. **Braz J Med Biol Res**, v. 41, n. 8, p. 716-21, Aug 2008.
- ALLEBRANDT, K. V.; SOUZA, R. L.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E. A. Variability of the paraoxonase gene (PON1) in Euro- and Afro-Brazilians. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 180, n. 3, p. 151-6, May 1 2002.
- ALTEMUS, M. Sex differences in depression and anxiety disorders: potential biological determinants. **Hormones and Behavior**, v. 50, n. 4, p. 534-8, Nov 2006.
- ANTLE, M. C.; SILVER, R. Orchestrating time: arrangements of the brain circadian clock. **Trends Neurosci**, v. 28, n. 3, p. 145-51, Mar 2005.
- ARCHER, S. N et al. A length polymorphism in the circadian clock gene Per3 is linked to delayed sleep phase syndrome and extreme diurnal preference. **Sleep**, v.26, n.4, Jun 15, p.413-5. 2003.
- ARTIOLI, P. et al. How do genes exert their role? Period 3 gene variants and possible influences on mood disorder phenotypes. **Eur Neuropsychopharmacology**, v. 17, n. 9, p. 587-594, 2007.
- ASCHOFF, J. Circadian rhythms: influences of internal and external factors on the period measured in constant conditions. **Z Tierpsychol**, v. 49, n. 3, p. 225-49, Mar 1979.
- ASCHOFF, J. Estimates on the duration of sleep and wakefulness made in isolation. **Chronobiol Int**, v. 9, n. 1, p. 1-10, 1992.
- BARCLAY, N. L. et al. Diurnal preference and sleep quality: same genes? A study of young adult twins. **Chronobiol Int**, v. 27, n. 2, p. 278-96, Jan 2010.

BECK, A. T et al. A. An inventory for measuring clinical anxiety: psychometric properties. **Journal of Consulting and Clinical Psychology**, v. 56, n. 6, p. 893-7, Dec 1988.

BECK, A. T.; STEER, R. A. **Beck Anxiety Inventory Manual**. San Antonio: The Psychological Corporation Harcourt, 1990

BELÍCIO, A. S. et al. Métodos cronobiológicos aplicados à neurociência clínica e experimental. In: Landeira-Fernandez, J.; Fukusima, S. S (Eds). **Métodos em Neurociência**. São Paulo: Manole, p. 115-127, 2012.

BELL-PEDERSEN, D. et al. Circadian rhythms from multiple oscillators: lessons from diverse organisms. **Nat Rev Genet**, v. 6, n. 7, p. 544-56, Jul 2005.

BENEDETTI, F. et al. Actimetric evidence that CLOCK 3111 T/C SNP influences sleep and activity patterns in patients affected by bipolar depression. **Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet**, v. 144B, n. 5, p. 631-5, Jul 5 2007.

BENEDETTI, F. et al. Clock genes beyond the clock: CLOCK genotype biases neural correlates of moral valence decision in depressed patients. **Genes Brain Behav**, v. 7, n. 1, p. 20-5, Feb 2008.

BENEDETTI, F. et al. Influence of CLOCK gene polymorphism on circadian mood fluctuation and illness recurrence in bipolar depression. **Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet**, v.123B, n.1, Nov 15, p.23-6. 2003.

BENEDITO-SILVA A. A. et al. Latitude and Social Habits as Determinants of the Distribution of Morning and Evening Types in Brazil. **Biological Rhythm Research-Special issue**, v. 29, n. 5, p. 591–597,1998.

BOIVIN, D. B. Influence of sleep-wake and circadian rhythm disturbances in psychiatric disorders. **J Psychiatry Neurosci**, v. 25, n. 5, p. 446-58, Nov 2000.

BORISENKOV, M. F. Chronotype of human in the north. **Fiziol Cheloveka**, v. 36, n. 3, p. 117-22, May-Jun 2010.

BORISENKOV, M. F.; KOSOVA, A. L.; KASYANOVA, O. N. Impact of perinatal photoperiod on the chronotype of 11- to 18-year-olds in northern European Russia. **Chronobiology International**, v. 29, n. 3, p. 305-10, Apr 2012.
Brace Jovanovich, Inc, 1990.

BÜNNLNG, E. Common features of photoperiodism in plants and animals. **Photochemistry and Photobiology**, v. 9, n. 4, p. 219–228, 1965.

CAJORI, F. A New Marking System and Means of Measuring Mathematical Abilities. **Science**, v. 39, n. 1015, p. 874-81, Jun 12 1914.

CAMERON, O. G. t al. Circadian symptom fluctuations in people with anxiety disorders. **J Affect Disord**, v. 11, n. 3, p. 213-8, Nov-Dec 1986.

CARPEN, J. D. et al. A single-nucleotide polymorphism in the 5'-untranslated region of the hPER2 gene is associated with diurnal preference. **J Sleep Res**, v. 14, n. 3, p. 293-7, Sep 2005.

CARPEN, J. D. et al. A silent polymorphism in the PER1 gene associates with extreme diurnal preference in humans. **J Hum Genet**, v. 51, n. 12, p. 1122-5, 2006.

CHANG, A. M. et al. Human diurnal preference and circadian rhythmicity are not associated with the CLOCK 3111C/T gene polymorphism. **J Biol Rhythms**, Jun, v.26, n.3, p. 276-9, jun 2011.

CHATTERJEE, S.; PAL, J. K. Role of 5'- and 3'-untranslated regions of mRNAs in human diseases. **Biol Cell**, v. 101, n. 5, p. 251-62, May 2009.

CHELMINSKI, I. et al. An analysis of the "eveningness-morningness" dimension in "depressive" college students. **J Affect Disord**, v. 52, n. 1-3, p. 19-29, Jan-Mar 1999.

CHOUB, A. et al. Clock T3111C and Per2 C111G SNPs do not influence circadian rhythmicity in healthy Italian population. **Neurol Sci**, v. 32, n. 1, p. 89-93, Feb 2011.

CIARLEGLIO, C. M. et al. Genetic differences in human circadian clock genes among worldwide populations. **J Biol Rhythms**, v. 23, n. 4, p. 330-40, Aug 2008.

CREAMER, M.; FORAN, J.; BELL, R. The Beck Anxiety Inventory in a non-clinical sample. **Behav Res Ther**, v. 33, n. 4, p. 477-85, May 1995.

DÍAZ-MORALES, J. F., SÁNCHEZ-LÓPEZ, M P Morningness-eveningness and anxiety among adults: A matter of sex/gender? **Personality and Individual Differences**, v. 44, n. 6, p. 1391-1401, 2008.

DRENNAN, M. D. et al. Morningness:eveningness is heritable. Society for Neuroscience Abstracts, 18, 196, 1992.

DRENNAN, M. D. et al. The effects of depression and age on the Horne-Ostberg morningness-eveningness score. **Journal of Affective Disorders**, v. 23, n. 2, p. 93-8, Oct 1991.

DUFFY, J. F. et al. Relationship of endogenous circadian melatonin and temperature rhythms to self-reported preference for morning or evening activity in young and older people. **J Investig Med**, v. 47, n. 3, p. 141-50, Mar 1999.

EBISAWA, T. Circadian rhythms in the CNS and peripheral clock disorders: human sleep disorders and clock genes. **J Pharmacol Sci**, v. 103, n. 2, p. 150-4, Feb 2007.

EBISAWA, T. et al. Association of structural polymorphisms in the human period3 gene with delayed sleep phase syndrome. **EMBO Rep**, v. 2, n. 4, p. 342-6, Apr 2001.

ELLIS, J. et al. Association between specific diurnal preference questionnaire items and PER3 VNTR genotype. **Chronobiol Int**, v. 26, n. 3, p. 464-73, Apr 2009.

GASPAR-BARBA, E. et al. Depressive symptomatology is influenced by chronotypes. **J Affect Disord**, v. 119, n. 1-3, p. 100-6, Dec 2009.

GIANNOTTI, F. et al. Circadian preference, sleep and daytime behaviour in adolescence. **Journal of Sleep Research**, v. 11, n. 3, p. 191-9, Sep 2002.

GORWOOD, P. Restoring circadian rhythms: a new way to successfully manage depression. **J Psychopharmacol**, v. 24, n. 2 Suppl, p. 15-9, Aug 2010.

HIDALGO, M. P. et al. Relationship between depressive mood and chronotype in healthy subjects. **Psychiatry and Clinical Neurosciences**, v. 63, n. 3, p. 283–290, 2009.

HIRATA, F. C. et al. Depression in medical school: the influence of morningness-eveningness. **Chronobiol Int**, v. 24, n. 5, p. 939-46, 2007.

HORNE, J. A.; OSTBERG, O. A self-assessment questionnaire to determine morningness-eveningness in human circadian rhythms. **Int J Chronobiol**, v. 4, n. 2, p. 97-110, 1976.

HOUB, A. et al. Clock T3111C and Per2 C111G SNPs do not influence circadian rhythmicity in healthy Italian population. **Neurol Sci**, v. 32, n. 1, p. 89-93, Feb 2011.

HUR, Y. M.; BOUCHARD, T. J. JR.; ECKERT, E. Genetic and environmental influences on self-reported diet: a reared-apart twin study. **Physiol Behav**, v. 64, n. 5, p. 629-36, Jul 1998.

JOHANSSON, C. et al. Circadian clock-related polymorphisms in seasonal affective disorder and their relevance to diurnal preference. **Neuropsychopharmacology**, v.28, n.4, Apr, p.734-9. 2003.

JONES, C. R et al. Familial advanced sleep-phase syndrome: A short-period circadian rhythm variant in humans. **Nat Med**, v. 5, n. 9, p. 1062-5, Sep 1999.

KAMEI, Y. et al. Clinical characteristics of circadian rhythm sleep disorders. **Psychiatry Clin Neurosci**, v. 52, n. 2, p. 234-5, Apr 1998.

KATZENBERG, D. et al. A CLOCK polymorphism associated with human diurnal preference. **Sleep**, v. 21, n. 6, p. 569-76, Sep 15 1998.

KERKHOF, G. A.; VAN DONGEN, H. P. Morning-type and evening-type individuals differ in the phase position of their endogenous circadian oscillator. **Neurosci Lett**, v. 218, n. 3, p. 153-6, Nov 8 1996.

KERKHOF, G. A.; VAN DONGEN, H. P. Morning-type and evening-type individuals differ in the phase position of their endogenous circadian oscillator. **Neurosci Lett**, v. 218, n. 3, p. 153-6, Nov 8 1996.

KERKHOF, G. A.; VAN DONGEN, H. P. Morning-type and evening-type individuals differ in the phase position of their endogenous circadian oscillator. **Neurosci Lett**, v. 218, n. 3, p. 153-6, Nov 8 1996.

- KITAMURA, S. et al. Evening preference is related to the incidence of depressive states independent of sleep-wake conditions. **Chronobiology International**, v. 27, n. 9-10, p. 1797-1812 2010.
- KO, C. H.; TAKAHASHI, J. S. Molecular components of the mammalian circadian clock. **Hum Mol Genet**, v. 15 Spec No 2, p. R271-7, Oct 15 2006.
- LAM, R. W. et al. The Can-SAD study: a randomized controlled trial of the effectiveness of light therapy and fluoxetine in patients with winter seasonal affective disorder. **Am J Psychiatry**, v. 163, n. 5, p. 805-12, May 2006.
- LAVEBRATT, C. et al. PER2 variation is associated with depression vulnerability. **Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet**, v. 153B, n. 2, p. 570-81, Mar 5 2010.
- LEACH, L. S. et al. Gender differences in depression and anxiety across the adult lifespan: the role of psychosocial mediators. **Social Psychiatry and Psychiatric Epidemiology**, v. 43, n. 12, p. 983-98, Dec 2008.
- LEE, H.-J. et al. PER2 Variation is Associated with Diurnal Preference in a Korean Young Population. **Behav Genet**, v. 41, p. 141–145, 2011.
- LEVANDOVSKI, R. et al. Depression scores associate with chronotype and social jetlag in a rural population. **Chronobiology International**, v. 28, n. 9, p. 771-8, Nov 2011.
- LOWREY, P. L.; TAKAHASHI, J. S. Mammalian circadian biology: elucidating genome-wide levels of temporal organization. **Annu Rev Genomics Hum Genet**, v. 5, p. 407-41, 2004.
- MANSOUR, H. A. et al. Association study of eight circadian genes with bipolar I disorder, schizoaffective disorder and schizophrenia. **Genes Brain Behav**, v. 5, n. 2, p. 150-7, Mar 2006.
- MANSOUR, H. A. et al. Association study of eight circadian genes with bipolar I disorder, schizoaffective disorder and schizophrenia. **Genes Brain Behav**, v. 5, n. 2, p. 150-7, Mar 2006.
- MARQUES, N.; MENNA-BARRETO, L.S. (Eds), *Cronobiologia: Princípios e aplicações*, 2003.
- MATSUO, M. et al. A novel SNP in hPer2 associates with diurnal preference in a healthy population. **Sleep and Biological Rhythms**, v. 5, p. 141–145, 2007.
- MATTHEWS, G. Morningness–eveningness as a dimension of personality: Trait, state, and psychophysiological correlates. **European Journal of Personality**, v. 2, n. 4, p. 277–293, 1988.
- MECACCI, L.; ROCCHETTI, G. Morning and evening types: stress-related personality aspects. **Personality and Individual Differences**, v. 25, n. 3, p. 537–542, 1998.
- MIGNONE, F. et al. Untranslated regions of mRNAs. **Genome Biol**, v. 3, n. 3, p. REVIEWS0004, 2002.

MINORS, D. S.; WATERHOUSE, J. M. Endogenous and exogenous components of circadian rhythms when living on a 21-hour day. **Int J Chronobiol**, v. 8, n. 1, p. 31-48, 1981.

MISHIMA, K. et al. The 3111T/C polymorphism of hClock is associated with evening preference and delayed sleep timing in a Japanese population sample. **Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet**, v. 133B, n. 1, p. 101-4, Feb 5 2005.

MONGRAIN, V.; PAQUET, J.; DUMONT, M. Contribution of the photoperiod at birth to the association between season of birth and diurnal preference. **Neurosci Lett**, v. 406, n. 1-2, p. 113-6, Oct 2 2006.

MOORE-EDE, M. C. Physiology of the circadian timing system: predictive versus reactive homeostasis. **Am J Physiol**, v. 250, n. 5 Pt 2, p. R737-52, May 1986.

NADKARNI, N. A. et al. Evolution of a length polymorphism in the human PER3 gene, a component of the circadian system. **J Biol Rhythms**, v. 20, n. 6, p. 490-9, Dec 2005.

NATALE, V.; ADAN, A. Season of birth modulates morningness-eveningness preference in humans. **Neuroscience Letters**, v. 274, n. 2, p. 139-41, Oct 22 1999.

NATALE, V.; ADAN, A.; FABBRI, M. Season of birth, gender, and social-cultural effects on sleep timing preferences in humans. **Sleep**, v. 32, n. 3, p. 423-6, Mar 2009.

NATALE, V.; CICOGNA, P. Circadian regulation of subjective alertness in morning and evening "types.". **Personality and Individual Differences**, v. 20, p. 491-296, 1996.

NATALE, V.; DANESI, E. Gender and Circadian Typology. **Biological Rhythm Research**, v. 33, n. 3, p. 261-269, 2002.

NATALE, V.; DI MILIA, L. Season of birth and morningness: comparison between the northern and southern hemispheres. **Chronobiology International**, v. 28, n. 8, p. 727-30, Oct 2011.

NIEVERGELT, C. M. et al. Suggestive evidence for association of the circadian genes PERIOD3 and ARNTL with bipolar disorder. **Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet**, v. 141B, n. 3, p. 234-41, Apr 5 2006.

OSKENVUO, M. et al. Heritability of diurnal type: a nationwide study of 8753 adult twin pairs. **J Sleep Res**, v. 16, n. 2, p. 156-62, Jun 2007

OSLAND, T.M et al. Association study of a variable-number tandem repeat polymorphism in the clock gene PERIOD3 and chronotype in Norwegian university students. **Chronobiol Int**. Nov, v.28, n.9, p. 764-70, jul 2011

OYBAL, K. et al. Mania-like behavior induced by disruption of CLOCK. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 104, n. 15, p. 6406-11, Apr 10 2007.

PABST, S. R. et al. Depression and anxiety in adolescent females: the impact of sleep preference and body mass index. **J Adolesc Health**, v. 44, n. 6, p. 554-60, Jun 2009.

PARK, Y. M. et al. Scores on morningness-eveningness and sleep habits of Korean students, Japanese students, and Japanese workers. **Perceptual and Motor Skills**, v. 85, n. 1, p. 143-54, Aug 1997.

PARTONEN, T. et al. Three circadian clock genes Per2, Arntl, and Npas2 contribute to winter depression. **Ann Med**, v. 39, n. 3, p. 229-38, 2007.

PEDRAZZOLI, M. et al. A polymorphism in the human timeless gene is not associated with diurnal preferences in normal adults. **Sleep Res Online**, v. 3, n. 2, p. 73-6, 2000.

PEDRAZZOLI, M. et al. Clock polymorphisms and circadian rhythms phenotypes in a sample of the Brazilian population. **Chronobiol Int**, v. 24, n. 1, p. 1-8, 2007.

PEDRAZZOLI, M. et al. Interactions of polymorphisms in different clock genes associated with circadian phenotypes in humans. **Genet Mol Biol**, v. 33, n. 4, p. 627-32, Oct 2010.

PEREIRA, D. S. et al. Association of the length polymorphism in the human Per3 gene with the delayed sleep-phase syndrome: does latitude have an influence upon it? **Sleep**, v.28, n.1, Jan 1, p.29-32. 2005

PLAISIER, I. et al. Work and family roles and the association with depressive and anxiety disorders: differences between men and women. **Journal of Affective Disorders**, v. 105, n. 1-3, p. 63-72, Jan 2008.

PREITNER, N. et al. The orphan nuclear receptor REV-ERB α controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. **Cell**, v. 110, n. 2, p. 251-60, Jul 26 2002.

RADLOFF, L. S. The CES-D Scale A Self-Report Depression Scale for Research in the General Population. **Applied Psychological Measurement** v. 1, n. 3, p. 385-401, 1977.

RALPH, M. R.; FOSTER, R. G.; DAVIS, F. C.; MENAKER, M. Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. **Science**, v. 247, n. 4945, p. 975-8, Feb 23 1990.

RANDLER, C. Gender differences in morningness–eveningness assessed by self-report questionnaires: A meta-analysis. **Personality and Individual Differences**, v. 43, n. 7, p. 1667–1675, 2007.

RANDLER, C. Morningness-eveningness comparison in adolescents from different countries around the world. **Chronobiology International**, v. 25, n. 6, p. 1017-28, Nov 2008.

RIETVELD, W. J. General introduction to chronobiology. **Braz J Med Biol Res**, v. 29, n. 1, p. 63-70, Jan 1996.

ROBILLIARD, D. L. et al. The 3111 Clock gene polymorphism is not associated with sleep and circadian rhythmicity in phenotypically characterized human subjects. **J Sleep Res**, v. 11, n. 4, p. 305-12, Dec 2002.

ROENNEBERG, T., WIRZ-JUSTICE, A, MERROW, M. Life between clocks: daily temporal patterns of human chronotypes. **Journal of Biological Rhythms**, v. 18, n. 1, p. 80-90, 2003.

ROENNEBERG, T. et al. A marker for the end of adolescence. **Current Biology**, v. 14, n. 24, p. R1038-9, Dec 29 2004.

ROGERS, A. S. et al. Molecular analysis of circadian clocks in *Drosophila simulans*. **Genetica**, v. 120, n. 1-3, p. 213-22, Mar 2004.

SANCHEZ-LOPEZ, M. P. et al. Sociodemographic, psychological and health-related factors associated with poor mental health in Spanish women and men in midlife. **Women Health**, v. 48, n. 4, p. 445-65, 2008.

SATO, T. K. et al. A functional genomics strategy reveals Rora as a component of the mammalian circadian clock. **Neuron**, v. 43, n. 4, p. 527-37, Aug 2004

SEHGAL, A. (Ed). Molecular Biology of Circadian Rythms. **Wiley-Liss.**:283,2004.

SELVI, Y. et al. Mood changes after sleep deprivation in morningness-eveningness chronotypes in healthy individuals. **Journal of Sleep Research**, v. 16, n. 3, p. 241-4, Sep 2007.

SERRETTI, A. et al. Genetic dissection of psychopathological symptoms: insomnia in mood disorders and CLOCK gene polymorphism. **Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet**, v. 121B, n. 1, p. 35-8, Aug 15 2003.

SERRETTI, A. et al. Insomnia improvement during antidepressant treatment and CLOCK gene polymorphism. **Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet**, v. 137B, n. 1, p. 36-9, Aug 5 2005.

SHIGEYOSHI, Y. et al. Light-induced resetting of a mammalian circadian clock is associated with rapid induction of the mPer1 transcript. **Cell**, v. 91, n. 7, p. 1043-53, Dec 26 1997.

SIPILA, T. et al. An association analysis of circadian genes in anxiety disorders. **Biol Psychiatry**, v. 67, n. 12, p. 1163-70, Jun 15 2010.

SMITH, C. S. et al. Investigation of morning–evening orientation in six countries using the preferences scale. **Personality and Individual Differences**, v. 32, n. 6, p. 949–968, 2002.

SOLE, X. et al. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. **Bioinformatics**, v. 22, n. 15, p. 1928-9, Aug 1 2006

SPOORMAKER, V. I., BOUT, J. V. D. Depression and anxiety complaints: relations with sleep disturbances. **Eur Psychiatry**, v. 20, n. 3, p. 243-5, May 2005.

TAILLARD, J.; PHILIP, P.; BIOULAC, B. Morningness/eveningness and the need for sleep. **Journal of Sleep Research**, v. 8, n. 4, p. 291-5, Dec 1999.

- TAKAHASHI, J. S. et al. The genetics of mammalian circadian order and disorder: implications for physiology and disease. **Nat Rev Genet**, v. 9, n. 10, p. 764-75, Oct 2008.
- TAKEUCHI, H. et al. Morningness-eveningness preference and mood in Japanese junior high school students. **Psychiatry Clin Neurosci**, v. 56, n. 3, p. 227-8, Jun 2002.
- TOH, K. L. et al. An hPer2 phosphorylation site mutation in familial advanced sleep phase syndrome. **Science**, v. 291, n. 5506, p. 1040-3, Feb 9 2001.
- TUREK, F. W. From circadian rhythms to clock genes in depression. **Int Clin Psychopharmacol**, v. 22 Suppl 2, p. S1-8, Oct 2007.
- UKAI, H.; UEDA, H. R. Systems biology of mammalian circadian clocks. **Annu Rev Physiol**, v. 72, p. 579-603, Mar 17 2010.
- UREK, F. W. From circadian rhythms to clock genes in depression. **Int Clin Psychopharmacol**, v. 22 Suppl 2, p. S1-8, Oct 2007.
- UTGE, S. J. et al. Systematic analysis of circadian genes in a population-based sample reveals association of TIMELESS with depression and sleep disturbance. **PLoS One**, v. 5, n. 2, p. e9259, 2010.
- VINK, J. M. et al. Genetic analysis of morningness and eveningness. **Chronobiol Int**, v. 18, n. 5, p. 809-22, Sep 2001.
- WELLS, V. E.; KLERMAN, G. L.; DEYKIN, E. Y. The prevalence of depressive symptoms in college students. **Soc Psychiatry**, v. 22, n. 1, p. 20-8, 1987.
- WELSH, D. K.; TAKAHASHI, J. S.; KAY, S. A. Suprachiasmatic nucleus: cell autonomy and network properties. **Annu Rev Physiol**, v.72, Mar 17, p.551-77. 2009.
- WEVER, R. A. Influence of physical workload on freerunning circadian rhythms of man. **Pflugers Arch**, v. 381, n. 2, p. 119-26, Aug 1979.
- WICHES, M. C. et al. Susceptibility to depression expressed as alterations in cortisol day curve: a cross-twin, cross-trait study. **Psychosom Med**, v. 70, n. 3, p. 314-8, Apr 2008.
- WIRZ-JUSTICE, A. Diurnal variation of depressive symptoms. **Dialogues Clin Neurosci**, v. 10, n. 3, p. 337-43, 2008.
- WITTMANN, M. et al. Social jetlag: misalignment of biological and social time. **Chronobiol Int**, v. 23, n. 1-2, p. 497-509, 2006.
- WOOD, J. et al. Replicable differences in preferred circadian phase between bipolar disorder patients and control individuals. **Psychiatry Research**, v. 166, n. 2-3, p. 201-209, 2009.
- WULFF, K. et al. Sleep and circadian rhythm disruption in psychiatric and neurodegenerative disease. **Nat Rev Neurosci**, v. 11, n. 8, p. 589-99, Aug 2010.

XU, Y. et al. Modeling of a human circadian mutation yields insights into clock regulation by PER2. **Cell**, v. 128, n. 1, p. 59-70, Jan 12 2007.

ZAVADA, A. et al. Comparison of the Munich Chronotype Questionnaire with the Horne-Ostberg's Morningness-Eveningness Score. **Chronobiology International**, v. 22, n. 2, p. 267-78, 2005.

APÊNDICE 1 - Protocolo para a extração de DNA de sangue periférico utilizando Fenol : Clorofórmio.

Procedimento

- 1- Coletar o sangue em tubo com EDTA de aproximadamente 5ml;
- 2- Transferir 0.5ml para tubo *eppendorf* de 1,5ml;
- 3- Centrifugar à 3.000 rpm por 5 minutos;
- 4- Descartar o plasma (Com pipeta) – Buffer Coat;
- 5- Ressuspender o *pellet* com 1ml de solução de lise de hemácias;
- 6- Inverter vigorosamente e incubar por 5 minutos à temperatura ambiente;
- 7- Centrifugar à 3.000 rpm por 5 minutos;
- 8- Descartar o sobrenadante (Hemácias lisadas) e ressuspender o *pellet* em 500µl de solução de lise de leucócitos;
- 9- Incubar por 15 minutos a 37°C;
- 10- Adicionar Proteinase K (20mg/ml) para concentração final de 100µg/ml – Adicionar: 2.5µl;
- 11- Incubar a 50°C por 30 minutos;
- 12- Adicionar igual volume de Fenol (500µl) e Homogeneizar;
- 13- Centrifugar a 12.000 rpm por 10 minutos;
- 14- Transferir fase aquosa (Com DNA) para novo tubo com pipeta;
- 15- Adicionar 0.2V de acetato de amônio 10M;
- 16- Adicionar e misturar 2 vezes de etanol absoluto;
- 17- Centrifugar a 14.000 rpm por 5 minutos;
- 18- Descartar Álcool;
- 19- Lavar o *pellet* com 1 ml etanol 70%, descartar o Álcool e secar;
- 20- Ressuspender com 100µl de Água de Injeção.
- 21- Armazenar em freezer -20° C

APÊNDICE 2 - Protocolo de extração de DNA de sangue periférico utilizando kit Flexigene Qiagen

Procedimento

1. Pipetar 750µL de tampão FG1 (tampão de lise) em um tubo de 1,5 mL;
2. Adicionar 300µL de sangue total e misturar invertendo o tubo 5 vezes;
3. Centrifugar a 10.000 rpm por 2 minutos;
4. Descartar o sobrenadante;
5. Inverter cuidadosamente o tubo (para não perder o pellet) sobre um pedaço de papel absorvente limpo por 2 minutos;
6. Adicionar 150µL de tampão FG2 (tampão desnaturante) e 1,5µ de protease em cada amostra. Fechar o tubo e dar um vortex imediatamente até completar a homogeneização;
 - a) Quando tiver trabalhando com muitas amostras, levar ao vortex cada tubo imediatamente após a adição do tampão.
 - b) Normalmente de 3-4 pulso de 5 segundos são suficientes. Entretanto, traços do pellet com consistência gelatinosa podem permanecer, neste caso, adicione 30µL de tampão FG2 (sem protease), e dê um vortex novamente.
7. Dê um spin no tubo brevemente (3-5 segundos) e incube por 65°C por 5 minutos;
8. Adicione 150µL de isopropanol (100%) e misture vigorosamente por inversão até que o precipitado de DNA torna-se visível;
 - a) Para amostras de volume pequeno, em que o DNA não pode ser visto, inverta o tubo ao menos vinte vezes.
9. Centrifugar a 10.000 rpm por 5 minutos;
10. Descartar o sobrenadante;
11. Inverter cuidadosamente o tubo (para não perder o pellet) sobre um pedaço de papel absorvente limpo por 2 minutos;
12. Adicione 150µL de etanol 70% e dê um vortex por 5 segundos;
13. Centrifugue a 10.000 rpm por 5 minutos;
14. Descartar o sobrenadante;
15. Inverter cuidadosamente o tubo (para não perder o pellet) sobre um pedaço de papel absorvente limpo por 10 minutos;

16. Adicione 200 μ L de tampão FG3 (Tris-Cl 10mM, pH 8,5) e dê um vortex por 5 segundos em baixa velocidade (somente com o dedo);
17. Dissolva o DNA incubado por 10 minutos a 65°C;
18. Se o DNA não estiver completamente dissolvido, prolongue o tempo de incubação;
19. Se o volume de tampão FG3 for reduzido, o tempo de incubação deve ser prolongado.

APÊNDICE 3 - Protocolo de extração de DNA de células bucais utilizando NaCl

Procedimento

1. Raspar a face interna das bochechas com swabs estéreis, fazendo movimentos circulares (aproximadamente 30 vezes);
2. Cortar a porção externa das hastes e colocá-las em microtupos de 2mL;
3. Aos tubos contendo o swab adicionar 600µL de TES (Tris HCl 10mM pH 8.0; EDTA 1mM; SDS 0,6%) e 7µL de proteinase K;
4. Incubar por 2 horas a 42°C;
5. Após incubação retirar o swab;
6. Adicionar 84µL de NaCl saturado (6 M) e agitar manualmente com vigor;
7. Centrifugar a 14.000 rpm por 1 minuto;
8. Transferir o sobrenadante para um novo tubo e adicionar duas vezes o volume de etanol absoluto (aproximadamente 800µL);
9. Agitar e centrifugar os tubos por 1 minuto a 14.000 rpm;
10. Descartar o etanol absoluto e adicionar 1 mL de etanol 70%;
11. Inverter o tubo diversas vezes para lavar o pellet;
12. Centrifugar os tubos por 1 minuto a 14.000 rpm e desprezar o sobrenadante;
13. Deixar os tubos abertos por 30 minutos para a evaporação do etanol residual;
14. Dissolver o DNA em 60µL de TE 10: 0,1 (Tris HCl 10mM; EDTA 0,1mM);
15. A concentração de DNA obtida é em torno de 80ng/µL.

ANEXO 1 - Aprovação Do Comitê De Ética Em Pesquisa



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Maceió – AL, 27/07/2011

Senhor (a) Pesquisador (a), **Thiago Gomes de Andrade**
Aline Cristine Pereira e Silva

O Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), em 27/07/2011 e com base no parecer emitido pelo (a) relator (a) do processo nº **004517/2011-80** sob o título, **Estudo de associação de polimorfismo em Gene do relógio biológico com preferência circadiana e transtorno afetivo bipolar** vem por meio deste instrumento comunicar a aprovação do processo supra citado, com base no item VIII.13, b, da Resolução nº 196/96.

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS 196/96, item V.4).

É papel do(a) pesquisador(a) assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e sua justificativa. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o(a) pesquisador(a) ou patrocinador(a) deve enviá-los à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem incluídas ao protocolo inicial (Res. 251/97, item IV. 2.e).

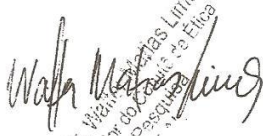
Relatórios parciais e finais devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos no Cronograma do Protocolo e na Res. CNS, 196/96.

Na eventualidade de esclarecimentos adicionais, este Comitê coloca-se a disposição dos interessados para o acompanhamento da pesquisa em seus dilemas éticos e exigências contidas nas Resoluções supra - referidas.

Esta aprovação não é válida para subprojetos oriundos do protocolo de pesquisa acima referido.

(*) Áreas temáticas especiais

Válido até: Julho de 2012


Prof. Dr. Aline Cristine Pereira e Silva
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa