



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

**MODULADORES GENÉTICOS DO RITMO CIRCADIANO EM HUMANOS:  
ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS EM GENES DAS VIAS AFERENTES DO  
NÚCLEO SUPRAQUIASMÁTICO (NSQ) COM PREFERÊNCIA DIURNA E  
HÁBITOS DE SONO**

Maceió  
2017

ALINE CRISTINE PEREIRA E SILVA

**MODULADORES GENÉTICOS DO RITMO CIRCADIANO EM HUMANOS:  
ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS EM GENES DAS VIAS AFERENTES DO  
NÚCLEO SUPRAQUIASMÁTICO (NSQ) COM PREFERÊNCIA DIURNA E  
HÁBITOS DE SONO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Orientador: Dr. Tiago Gomes de Andrade

Maceió  
2017

**Catálogo na fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**

Bibliotecária Responsável: Janaína Xisto de Barros Lima

S586m Silva, Aline Cristine Pereira e.  
Moduladores genéticos do ritmo circadiano em humanos : associação de polimorfismos em genes das via aferente do Núcleo Supraquiasmático (NSQ) com preferência diurna e hábitos de sono / Aline Cristine Pereira e Silva. – 2017.  
133 f.: il.

Orientador: Tiago Gomes de Andrade.

Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Maceió, 2017.

Inclui bibliografia.

Anexos: f. 123-133.

1. Ritmos circadianos. 2. Cronotipos. 3. Polimorfismo (Genética). 4. Sono.  
I. Título

CDU: 616.8-009.836:57



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

## Folha de Aprovação

Aline Cristine Pereira e Silva

Moduladores genéticos dos ritmos circadianos: associação de polimorfismos nas vias  
aférentes do NSQ com preferência diurna e hábitos de sono.

Tese submetida ao corpo docente do  
Programa de Pós-Graduação em  
Ciências da Saúde da Universidade  
Federal de Alagoas e aprovada em 26  
de junho de 2017.


### Banca Examinadora



Prof. Dr. Cláudio Torres de Miranda – (UFAL)



Prof.<sup>ª</sup> Dr.<sup>ª</sup> Adriana Ximenes da Silva - (UFAL)



Prof.<sup>ª</sup> Dr.<sup>ª</sup> Pollyanna Almeida Costa dos Santos – (UNCISAL)

*À Deus, pois o temor do Senhor  
é o início de toda sabedoria.*

*Aos Meus Pais:  
João Pereira e Maria Silva*

*E as minhas irmãs:  
Jaciara e Anapuan Silva*

*Dedico*

## AGRADECIMENTOS

Essa tese não é simplesmente o fruto do trabalho árduo de uma única pessoa, na verdade é o fruto do trabalho de várias pessoas. Primeiramente, agradeço aos meus amados pais que tanto se sacrificaram para que eu pudesse alcançar esse momento e, as minhas irmãs que sempre me ajudaram durante esses quatro anos.

Ao professor Dr. Tiago Gomes de Andrade pela orientação e confiança.

Ao programa de pós-graduação em Ciências da Saúde do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde pela oportunidade.

Ao Grupo Multidisciplinar de Desenvolvimento e Ritmos Biológicos (GMDRB) da Universidade de São Paulo – USP, onde eu pude aprofundar os estudos sobre a Cronobiologia.

Ao professor Dr. Jorge Arthur Peçanha de Miranda Coelho pelo ensino e contribuição nas análises estatísticas.

A professora Dra. Gisele Odda, pelo acolhimento nas vezes em que estive na USP e os cursos sobre Cronobiologia.

Aos professores Drs. Cláudio de Miranda, Adriana Ximenes e Pollyanna dos Santos, membros da banca final de defesa da tese, pela seriedade e generosidade com que se disponibilizaram em participar do importante momento de avaliação desta tese.

A todos os meus professores, desde o jardim de infância até a pós-graduação pelo incentivo e participação da minha formação científica.

Aos alunos de Iniciação Científica Edilson, Denise e Rubéns pela ajuda durante os experimentos.

À UFAL, Campus Maceió, Arapiraca e Sertão, ao IFAL Penedo e à UNEAL, Campus Arapiraca e Palmeira dos Índios, por autorizarem a realização das coletas dessa pesquisa.

A CAPES pelo apoio financeiro através da bolsa de doutorado, permitindo a condução e conclusão desse trabalho.

A todos os meus colegas de pós-graduação pelas longas conversas, discussões e troca de experiências.

Enfim, a todos aqueles que me ajudaram, diretamente e/ou indiretamente durante este curso de doutorado, para que esse trabalho fosse realizado, meus sinceros agradecimentos.

*If we understood Moore about the rhythms of the body and brains we might be able to decide more sensibly when to work, when to go to holidays, when to do things that require concentration, and even how to raise ourselves out of sloth and inactivity*

*W. P. Colquhoun, 1971*

## RESUMO

Os ritmos circadianos são regulados por um oscilador central denominado de Núcleos Supraquiasmáticos (NSQ). Os NSQs recebem informações externas através de três vias principais: trato retino-hipotalâmico, trato gênico-hipotalâmico e as projeções dos núcleos da rafe; além de outras vias, como a da melatonina. Diferentes transportadores e receptores, incluindo os 5-HTT MT2, 5-HT1A, NPY2 e NMDA, atuam em cascatas de sinalização dessas vias. A preferência diurna é a expressão comportamental da característica endógena dos ritmos circadianos. Diversos estudos de associação com preferência diurna têm focado apenas em polimorfismos em genes circadianos e pouca atenção tem sido dada a pesquisas envolvendo genes não circadianos. O objetivo desse trabalho foi realizar um estudo de investigação de moduladores genéticos do ritmo circadiano envolvendo polimorfismos em genes não circadianos. Estudantes universitários responderam aos questionários de Matutividade e Vespertinidade (MEQ) e de Cronotipo de Munique (MCTQ) para a determinação da preferência diurna, hábitos de sono e *jetlag* social. Para as análises de associação genética, foram selecionados os matutinos e vespertinos extremos, juntamente com um número igual de intermediários (56 em cada grupo). A genotipagem dos polimorfismos foi realizada através das técnicas de PCR e *Real Time* PCR. Uma associação foi encontrada entre os alelos do polimorfismo rs4753426 e preferência diurna, com o alelo C sendo mais frequente (62%) em matutinos que vespertinos (47%) (n= 112). Um efeito de interação 5-HTTLPR\*rs2020933\*rs6295 foi observado para a preferência diurna, com combinação genotípica S/S; A/A; C/G (M= 62,50 e DP= 15,47) apresentado uma média do MEQ maior (matutinos) que as combinações S/S; A/T; C/G (M= 22,0 e DP= 2,82) e S/S; A/A; G/G (M= 27,33 e DP= 5,92;  $F(2, 24)= 11,16, p < 0,001, \omega^2 = 0,42$ ) (n= 111). Além disso, um efeito de interação foi encontrado entre os alelos dos polimorfismos rs2234759, rs4753426 e rs6295 na preferência diurna, com a média dos valores do MEQ sendo maiores nas combinações alélicas C-A-C (M= 53,60 e DP= ±17,32) e C-G-C (M= 62,43 e DP= ±11,35) comparada com as combinações C-A-G (M= 45,66 e DP= ±18,65) e T-A-C (M= 44,66 e DP= ±14,68);  $t(152)= 2,70, p= 0,008, d= 0,66$  e  $t(53)= 3,68, p= 0,001, d= 0,97$ ) (n= 168). Em relação aos hábitos de sono, o efeito da interação 5-HTTLPR<sub>(genótipo)</sub>\*preferência diurna nos horários de ir dormir nos dias de trabalho, foi significativamente diferente em vespertinos com genótipo L/S (M= 00:40 e DP= 1:18 horas) comparados com os genótipos L/L (M= 2:13 e DP= 1:23 horas) e S/S (M= 2:20 e DP= 1:20;  $F_{(4,158)}= 3,90, p= 0,005, \omega^2= 0,02$ ) (n=167). Adicionalmente, na interação ‘preferência diurna\*rs2020933<sub>(alelo)</sub>’, as médias do ponto médio do sono nos dias de estudo foram diferenciadas entre os alelos A (M= 4:27 e DP= 1:18) e T (M= 5:55 e DP= 1:47;  $t(110)= -3,68, p < 0,001, d= 0,96$ ) (n=168) no grupo de vespertinos. Em relação ao polimorfismo rs2234759, uma diferença na duração do sono foi vista entre os alelos A (M= 6:30 e DP= 1:30) e G (M= 6:58 e DP= 1:24;  $t(334)= -2,27, p= 0,024, d= 0,25$ ) (n= 168). Nenhuma correlação foi encontrada com relação ao *jetlag* social. Esses resultados mostram que polimorfismos em genes não circadianos podem atuar na modulação da ritmicidade, através das vias de sincronização do NSQ, contribuindo assim para as diferenças nos fenótipos circadianos, principalmente pela interação dessas variantes genéticas nos componentes das vias aferentes do NSQ.

**Palavras-chave:** cronotipos, sono, vias aferentes do NSQ, genes não circadianos, SNPs.



## ABSTRACT

Regulation of Circadian rhythms is under control of a pacemaker called Suprachiasmatic Nucleus (SCN), which are synchronized by environmental factors. The SCNs receive external information from three different mean pathways: retinal hypothalamic tract, geniculohypothalamic tract and raphe nucleus projections; other pathways, such as melatonergic system, are included. Different transporters and receptors, including 5-HTT MT2, 5-HT1A, NPY2 and NMDA, mediate these signal transduction pathways. Diurnal preference is a phenotypic expression of endogenous circadian rhythms. Most association studies involving diurnal preference have focused on polymorphism in circadian genes, and low attention was given to genetic alterations in non-circadian genes. The aim of this study was to investigate potential genetic modulators of the circadian rhythms, associating polymorphisms in non-circadian genes with diurnal preference. Undergraduate students answered the Morning-Evening Questionnaire (MEQ) and the Munich Chronotype Questionnaire for determination of diurnal preference, sleep habits and social jetlag. For genetic association analysis, the extreme morning and evening, with the same number of intermediate (56 for each group), were selected. The polymorphisms were genotyped using normal PCR and *Real Time* PCR. An association between the rs4753426 alleles and diurnal preference was found, with the C allele more frequent in morning (62%) than evening types (47%) (n= 112). An interaction effect for 5-HTTLPR\*rs2020933\*rs6295 was observed in diurnal preference, with the mean MEQ scores higher in genotype combination S/S; A/A; C/G ( $M= 62,50$  and  $DP= 15,47$ ) (morning) compared to other combinations S/S; A/T; C/G ( $M= 22,0$  and  $DP= 2,82$ ) and S/S; A/A; G/G ( $M= 27,33$  and  $DP= 5,92$ ;  $F(2, 24) = 11,16$ ,  $p < 0,001$ ,  $\omega^2 = 0,42$ ) (n= 111). In addition, an interaction effect among the alleles from rs2234759, rs4753426 and rs6295 polymorphisms was found, with the mean MEQ scores higher in allelic combinations C-A-C ( $M= 53,60$  and  $DP= \pm 17,32$ ) and C-G-C ( $M= 62,43$  and  $DP= \pm 11,35$ ) compared to combinations C-A-G ( $M= 45,66$  and  $DP= \pm 18,65$ ) e T-A-C ( $M= 44,66$  and  $DP= \pm 14,68$ );  $t(152)= 2,70$ ,  $p = 0,008$ ,  $d= 0,66$  e  $t(53)= 3,68$ ,  $p = 0,001$ ,  $d= 0,97$ ) (n= 168). In relationship to sleep habits, the interaction effect 5-HTTLPR<sub>(genotype)</sub>\*diurnal preference in bedtime on weekdays was significantly different in evening types with L/S genotypes ( $M= 00:40$  and  $DP= 1:18$  hours) compared to L/L genotypes ( $M = 2:13$  and  $DP = 1:23$  hours) and S/S ( $M = 2:20$  and  $DP = 1:20$ ;  $F_{(4,158)}= 3,90$ ,  $p = 0,005$ ,  $\omega^2 = 0,02$ ) (n =167). Additionally, in the interaction effect 'diurnal preference\*rs2020933<sub>(allele)</sub>', the midpoint of sleep on weekdays showed differences between the A allele ( $M= 4:27$  and  $DP= 1:18$ ) and T allele ( $M= 5:55$  e  $DP= 1:47$ ;  $t(110)= -3,68$ ,  $p < 0,001$ ,  $d= 0,96$ ) (n=168) in evening types. According to rs2234759 polymorphism, a difference was observed for A allele ( $M= 6:30$  e  $DP= 1:30$ ) and G allele ( $M= 6:58$  e  $DP = 1:24$ ;  $t(334)= -2,27$ ,  $p = 0,024$ ,  $d= 0,25$ ) (n= 168) regarding to sleep duration on weekdays. No genotypic/allelic correlation was found for social jetlag. Thus, these results demonstrated that genetic alterations in non-circadian genes can participate in circadian rhythm modulation, via NSQ afferent pathways. This can contribute to variability on circadian phenotypes, mainly by interaction among different polymorphisms in the signing molecules genes.

**Keywords:** chronotypes, sleep, SCN afferent pathway, no-circadian genes, SNPs

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Parâmetros para a definição de um ritmo hipotético .....	18
Figura 2 - Diferentes ritmos em humanos (barra branca) e outros mamíferos.....	19
Figura 3 - Modelo Simplificado dos ritmos circadianos .....	19
Figura 4 - Efeito de diferentes pulsos de luz e deslocamento de fase na ritmicidade circadiana .....	22
Figura 5 - Representação esquemática dos dois tipos de curva de resposta de fase.....	23
Figura 6 - Representação esquemática do mecanismo de mascaramento .....	24
Figura 7 - Alça de transcrição-tradução autorregulatória dos ritmos circadianos.....	26
Figura 8 - Representação esquemática dos núcleos supraquiasmáticos: sua localização e suas subdivisões .....	28
Figura 9 - Cascata de sinalização demonstrando como a luz regula ritmicamente os neurônios do NSQ.....	29
Figura 10 - Representação esquemática das principais vias aferentes do sistema circadiano em mamíferos .....	31
Figura 11 - Representação dos dois modelos envolvidos na regulação do sono: homeostático (S) e circadiano (C) .....	33
Figura 12 - Distribuição das frequências dos valores dos questionários.....	49
Figura 13 - Fotografia do gel de agarose 2,5% para a detecção do polimorfismo 5HTTLPR (43pb ins/Del) no gene SLC6A4.....	51
Figura 14 - Distribuição genotípica e curva de amplificação do polimorfismo rs2020933 do gene SLC6A4.....	51
Figura 15 - Distribuição genotípica e curva de amplificação do polimorfismo rs6295 do gene HTR1A.....	52
Figura 16 - Diferença entre os médias dos valores do MEQ para as combinações genotípicas dos três polimorfismos 5-HTTLPR, rs2020933 e rs6295 da via da 5-HT .....	59
Figura 17 - Média do horário de ir dormir dos três genótipos do polimorfismo 5-HTTLPR nos grupos vespertinos, intermediários e matutinos (n= 167).....	63
Figura 18 - Médias do horário de ir dormir nos dias de estudo entre os alelos do polimorfismo rs2020933 nos matutinos, intermediários e vespertinos. ....	65
Figura 19 - Médias do horário de acordar nos dias de estudo entre os alelos do polimorfismo rs2020933 nos grupos matutinos, intermediários e vespertinos. ....	65
Figura 20 - Médias do ponto médio do sono nos dias de estudo entre os alelos do polimorfismo rs2020933 nos matutinos, intermediários e vespertinos. ....	66
Figura 21 - Diferença no horário de ir dormir nos finais de semana entre os alelos do polimorfismo rs2020933 nos matutinos, intermediários e vespertinos .....	66
Figura 22 - Distribuição genotípica (A) e curva de amplificação (B) para o polimorfismo rs2234759 do gene NPY2 .....	68
Figura 23 - Diferença na duração do sono nos dias de estudo para os alelos do polimorfismo rs2234759 (n= 168).....	71
Figura 24 - Distinção genotípica (A) e curva de amplificação (B) do para o polimorfismo rs1805247.....	73
Figura 25 - Distinção genotípica (A) e curva de amplificação (B) do polimorfismo 4753426 no gene MTNR1B .....	77

Figura 26 - Distribuição genotípica do polimorfismo rs4753426 nos grupos de matutinos, intermediários e vespertinos .....	78
Figura 27 - Distribuição alélica do polimorfismo rs4753426 nos grupos de matutinos, intermediários e vespertinos .....	79
Figura 28 - Médias dos valores do MEQ nas diferentes combinações alélicas para os polimorfismos rs2234759, rs4753426 e rs6295 .....	84
Figura 29 - Diferença das médias dos valores do MEQ nas diferentes combinações genotípicas dos SNPs rs2234759 e rs6295. ....	86
Figura 30 - Diferença das médias dos valores do MEQ nas diferentes combinações alélicas dos SNPs rs4753426 e rs6295.....	88

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estatística descritiva para indicar uma distribuição normal.....	48
Tabela 2 - Distribuição das frequências genotípicas para os polimorfismos 5-HTTLPR (n=167), rs2020933 (n=168) e rs6295 (n=168) nos grupos matutinos, intermediários e vespertinos .....	52
Tabela 3 - Distribuição das frequências alélicas para os polimorfismos 5-HTTLPR (n = 167), rs2020933 (n = 168) e rs6295 (n = 168) nos grupos matutinos, intermediários e vespertinos.....	53
Tabela 4 - Comparação das médias dos hábitos de sono e jetlag social de acordo com os grupos genotípicos do polimorfismo 5HTTLPR (n = 167) .....	54
Tabela 5 - Comparação das médias dos hábitos de sono e jetlag social de acordo com os grupos alélicos do polimorfismo 5HTTLPR (n = 167).....	54
Tabela 6 - Comparação das médias dos hábitos de sono e jetlag social de acordo com os grupos alélicos do polimorfismo 5HTTLPR (n = 167).....	55
Tabela 7 - Comparação das médias dos hábitos de sono e jetlag social de acordo com os alelos do polimorfismo rs6295 (n = 168) .....	56
Tabela 8 - Comparação das médias dos hábitos de sono e jetlag social de acordo com os grupos genotípicos do polimorfismo rs2020933 (n = 168).....	57
Tabela 9 - Comparação das médias dos hábitos de sono e jetlag social de acordo com os grupos alélicos do polimorfismo rs2020933 (n =168).....	57
Tabela 10 - Análise de variância fatorial para a preferência diurna em função dos genótipos dos polimorfismos 5-HTTLPR, rs2020933 e rs6295 (n = 167).....	58
Tabela 11 - Análise de variância fatorial para a preferência diurna em função dos genótipos dos polimorfismos 5-HTTLPR, rs2020933 e rs6295 (n= 111).....	59
Tabela 12 - Análise de variância fatorial para a preferência diurna em função dos alelos dos polimorfismos 5-HTTLPR, rs2020933 e rs6295 (n = 167) .....	60
Tabela 13 - Análise de variância fatorial para a preferência diurna em função dos alelos dos polimorfismos 5-HTTLPR, rs2020933 e rs6295 (n = 111) .....	60
Tabela 14 - Frequência das diferentes combinações alélicas (“haplótipos”) para os polimorfismos 5-HTTLPR, rs2020933 e rs6295 nos grupos matutinos e vespertinos (n = 111).....	61
Tabela 15 - Resultado da ANOVA fatorial para os hábitos de sono e jetlag social em função da preferência diurna e genótipos do polimorfismo 5-HTTLPR (n= 167) .....	62
Tabela 16 - Resultado da ANOVA fatorial para os hábitos de sono e jetlag social em função da preferência diurna e alelos do polimorfismo 5-HTTLPR (n = 167) .....	62
Tabela 17 - Resultado da ANOVA fatorial para os hábitos de sono e jetlag social em função da preferência diurna e genótipos do polimorfismo rs2020933 (n = 168).....	63
Tabela 18 - Resultado da ANOVA fatorial para os hábitos de sono e jetlag social em função da preferência diurna e os alelos do polimorfismo rs2020933 (n = 168). .....	64
Tabela 19 - Resultado da ANOVA fatorial para os hábitos de sono e jetlag social em função da preferência diurna e genótipos do polimorfismo rs26592 (n=168).....	67
Tabela 20 - Resultado da ANOVA fatorial para os hábitos de sono e jetlag social em.....	67
Tabela 21 - Frequência genotípica e alélica do polimorfismo rs2234759 nos grupos de matutinos, intermediários e vespertinos (n = 168).....	69

Tabela 22 - Comparação das médias dos hábitos de sono e jetlag social de acordo com os grupos genotípicos do polimorfismo rs2234759 (n =168).....	69
Tabela 23 - Comparação das médias dos hábitos de sono e jetlag social de acordo com os diferentes alélicos do polimorfismo rs2234759 (n = 168) .....	70
Tabela 24 - Resultado da ANOVA fatorial para os hábitos de sono e jetlag social em função da preferência diurna e genótipos do polimorfismo rs2234759 (n = 168).....	72
Tabela 25 - Resultado da ANOVA fatorial para os hábitos de sono e jetlag social em função da preferência diurna e alelos do polimorfismo rs2234759 (n = 168).....	72
Tabela 26 - Frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo rs1805247 nos grupos de matutinos, intermediários e vespertinos (n = 168).....	74
Tabela 27 - Comparação das médias dos hábitos de sono e jetlag social de acordo com os grupos genotípicos do polimorfismo rs1805247 (n = 168).....	74
Tabela 28 - Comparação das médias dos hábitos de sono e jetlag social de acordo com os grupos alélicos do polimorfismo rs1805247 (n = 336).....	75
Tabela 29 - Resultado da ANOVA fatorial para os hábitos de sono e jetlag social em função da preferência diurna e genótipos do polimorfismo rs1805247 (n = 168).....	76
Tabela 30 - Resultado da ANOVA fatorial para os hábitos de sono e jetlag social em função da preferência diurna e alelos do polimorfismo rs1805247 (n = 168).....	77
Tabela 31 - Comparação das médias dos hábitos de sono e jetlag social de acordo com os grupos genotípicos do polimorfismo 4753426 (n = 168).....	79
Tabela 32 - Comparação das médias dos hábitos de sono e jetlag social de acordo com os grupos alélicos do polimorfismo 4753426 (n = 336).....	80
Tabela 33 - Resultado da ANOVA fatorial para os hábitos de sono e jetlag social em função da preferência diurna e genótipos do polimorfismo (n = 168).....	81
Tabela 34 - Resultado da ANOVA fatorial para os hábitos de sono e jetlag social em função da preferência diurna e alelos do polimorfismo (n= 168).....	81
Tabela 35 - ANOVA fatorial para a preferência diurna em função dos genótipos dos polimorfismos rs1805247, rs2234759, rs4753426 e rs6295 (n=168).....	82
Tabela 36 - ANOVA fatorial para a preferência diurna em função dos alelos dos polimorfismos rs1805247, rs2234759, rs4753426 e rs6295 (n=168).....	82
Tabela 37 - ANOVA fatorial para a preferência diurna em função dos genótipos dos polimorfismos rs2234759, rs4753426 e rs6295 (n=168).....	83
Tabela 38 - ANOVA fatorial para a preferência diurna em função dos alelos dos polimorfismos rs2234759, rs4753426 e rs6295 (n=168).....	83
Tabela 39 - Frequência das diferentes combinações alélicas (“haplótipos”) para os polimorfismos rs2234759, rs4753426 e rs6295 nos grupos matutinos e vespertinos .....	85
Tabela 40 - ANOVA fatorial para a preferência diurna em função dos genótipos dos polimorfismos rs2234759 e rs6295 (n=112).....	85
Tabela 41 -ANOVA fatorial para a preferência diurna em função dos alelos dos polimorfismos rs2234759 e rs6295 (n=168).....	86
Tabela 42 - Frequência das diferentes combinações alélicas (“haplótipos”) para os polimorfismos rs2234759 e rs6295 nos grupos matutinos e vespertinos (n = 112).87	87
Tabela 43 - ANOVA fatorial para a preferência diurna em função dos genótipos dos polimorfismos rs4753426 e rs6295 (n=168).....	87
Tabela 44 - ANOVA fatorial para a preferência diurna em função dos alelos dos polimorfismos rs4753426 e rs6295 (n=168).....	87

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT - Serotonina

5-HT1A- Receptor da serotonina 1 A

5-HTT - Transportador da serotonina

CCG - Genes controlados pelo relógio

CE – Ciclo claro/escuro

CRF - Curva de resposta de fase

CSM - *Composite Scale of Morningness*

EEG - Eletroencefalograma

FIL - Folheto intergeniculado lateral

GABA - Ácido gama-aminobutírico

GLU - Glutamato

GRIN2B - Receptor ionotrópico do glutamato subunidade 2

GRP - Gastrina

GWAS - *Genome wide association studies*

JLS - Jetlag Social

MCTQ - Questionário de Cronotipo de Monique

MEQ - Questionário de Matutividade e Vespertividade

MLT - Melatonina

MT1- Receptor da melatonina 1

MT2 - Receptor da melatonina 2

NMDA - N-metil D-Aspartato

NPY2 - Neuropeptídeo Y receptor 2

NRD - Núcleos da rafe dorsal

NRM - Núcleos da rafe medial

MSF - Ponto médio do sono nos dias livres

NSQ - Núcleos supraquiasmáticos

PACAP - Neuropeptídeo adenilato-ciclase pituitária

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

PKC - Proteína quinase C

SFAS - Síndrome da fase atrasada do sono

SFAVS - Síndrome da fase avançada do sono

SNP - Polimorfismo de nucleotídeo simples

SP - Substância P

TGH- Trato geniculado-hipotalâmico

TRH - Trato retino-hipotalâmico

VIP- polipeptídeo intestinal vasoativo inserir outras abreviaturas

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	17
<b>2.1 Ritmos Biológicos</b> .....	17
<b>2.2 Sistema de Temporização Circadiano em Mamíferos</b> .....	19
2.2.1 Propriedades Fundamentais dos ritmos circadianos.....	20
2.2.2 Processo de Sincronização .....	20
<b>2.3 Mecanismos moleculares reguladores dos ritmos circadianos</b> .....	24
<b>2.4 Núcleos Supraquiasmáticos (NSQs) e suas principais vias aferentes</b> .....	27
2.4.1 Trato retino-hipotalâmico (TRH) .....	28
2.4.2 Trato geniculo-hipotalâmico (TGH) .....	30
2.4.3 Projeções dos núcleos da rafe.....	30
2.4.4 Melatonina (MLT).....	32
<b>2.5 Sono e ritmos circadianos</b> .....	33
<b>2.6 Preferência Diurna (cronotipo)</b> .....	35
2.6.1 Base genética da preferência diurna ou cronotipo .....	36
<b>2.7 Polimorfismos nos receptores MT2, 5-HTR1A, NPY2 e NMDA e no transportador 5-HTTLPR</b> .....	38
<b>3 HIPÓTESES</b> .....	40
<b>4 JUSTIFICATIVA</b> .....	41
<b>5 OBJETIVOS</b> .....	42
<b>5.1 Objetivo Principal</b> .....	42
<b>5.2 Objetivos Específicos</b> .....	42
<b>6 METODOLOGIA</b> .....	43
<b>6.1 Escolha dos sujeitos</b> .....	43
<b>6.2 Determinação da preferência diurna</b> .....	43
<b>6.3 Determinação dos hábitos do sono e <i>jetlag</i> social</b> .....	44
<b>6.4 Coleta e Extração de DNA</b> .....	45
<b>6.5 Detecção dos Polimorfismos Através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)</b> .....	45
<b>6.6 Análises Estatísticas</b> .....	46
<b>7 RESULTADOS</b> .....	48



<b>7.1 Análise dos Questionários</b> .....	48
<b>7.2 Análise de associação entre as frequências genótípicas e alélicas com preferência diurna, hábitos do sono e <i>jetlag</i> social.</b> .....	50
7.2.1 Polimorfismos do transportador (ins/del 5-HTTLPR) e rs2020933e do receptor (rs6295) da 5-HT.....	50
7.2.2 Interação entre os polimorfismos do transportador e receptor de 5-HT com preferência diurna.....	58
7.2.3 Interação entre os polimorfismos do transportador e receptor de 5-HT com hábitos de sono e <i>jetlag</i> social .....	61
<b>7.3 Polimorfismo rs2234759 do receptor do neuropeptídeo NPY2 com hábitos de sono e <i>jetlag</i> social</b> .....	68
7.3.1 Interação entre o polimorfismo rs2234759e os hábitos de sono e social <i>jetlag</i> .....	71
7.4.2 Polimorfismo rs1805247 no gene da subunidade GRIN2B do receptor NMDA .....	73
7.4.1 Interação entre o polimorfismo rs1805247 com hábitos de sono e <i>jetlag</i> social .....	76
<b>7.5 Polimorfismo rs4753426 no gene do receptor 2 da melatonina - MT2</b> .....	77
<b>7.6 Interação entre os polimorfismos dos receptores rs1805247 do gene <i>GRIN2B</i>, rs2234759 do gene <i>NPYR2</i>, rs4753426 do gene <i>MTNR1B</i> e rs6295, do gene <i>HTR1A</i> com preferência diurna</b> .....	82
<b>8 DISCUSSÃO</b> .....	89
<b>8.1 Polimorfismos no transportador e receptor da 5-HT</b> .....	90
<b>8.2 Polimorfismo no rs2234759 do receptor NPY2</b> .....	93
<b>8.3 Polimorfismo rs1805247 no gene da subunidade GRIN2B do receptor NMDA</b> .....	95
<b>8.4 Polimorfismo rs4753426 do receptor MT2</b> .....	96
<b>8.5 Interação entre os polimorfismos rs2234759 no gene do <i>NPYR2</i>, rs4753426 do gene <i>MTNR2</i> e rs6295 do gene <i>HTR1A</i> com preferência diurna</b> .....	97
<b>8.6 Interação dos polimorfismos rs2020933 no gene <i>SLC6A4</i>; 43pb ins/del no gene <i>SLC6A4</i>, rs2234759 no gene <i>NPYR2</i>; rs1805247 no gene <i>GRIN2B</i>; rs4753426 no gene <i>MTNR1B</i> e rs6295 no gene <i>HTR1A</i> com <i>jetlag</i> social</b> .....	99
<b>9 LIMITAÇÕES</b> .....	101
<b>10 CONCLUSÕES</b> .....	102
<b>11 PRINCIPAIS ACHADOS</b> .....	103
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	104
<b>ANEXOS</b> .....	123

## 1- INTRODUÇÃO

Os ritmos biológicos estão presentes desde bactérias até humanos. Fazem parte desses, os ritmos circadianos que apresentam uma duração de aproximadamente 24 horas. O sistema de temporização circadiano é responsável pela geração e manutenção dos ritmos fisiológicos e comportamentais e a sua sincronização aos ciclos ambientais, como o claro/escuro (DUNLAP; LOROS; DeCOURSEY, 2004). A harmonização entre o sistema interno e seus *Zeitgeibers* permite uma capacidade antecipatória aos organismos. Dessa forma, os seres vivos podem organizar recursos e se prepararem para eventos e atividades que sejam necessários à manutenção de sua sobrevivência (MARQUES; MENNA-BARRETO, 2003).

Em mamíferos, o oscilador central (núcleos supraquiasmáticos - NSQ), principal responsável pela sincronização dos múltiplos osciladores endógenos aos ciclos ambientais, recebe informações do ambiente através de três vias principais: (1) trato retino-hipotalâmico, (2) trato genículo-hipotalâmico e (3) as projeções dos núcleos da rafe (GILLETTE; ABBOTT; ARNOLD, 2012). Outras, tais como a via da melatonina, também estão envolvidas (STARKEY et al., 1995). Os receptores MT2, 5-HT1A, NPY2 e NMDA, dentre outros, participam das cascatas de sinalização responsáveis pela regulação da ritmicidade circadiana (GILLETTE; MITCHELL, 2002).

A ritmicidade circadiana pode ser expressa fenotipicamente através da preferência diurna ou cronotipo. Existem três tipos de cronotipos: os matutinos, que preferem acordar e dormir cedo e são mais ativos durante o período da manhã; os vespertinos, que preferem acordar e dormir nos horários mais avançados; e os intermediários, que ocupam uma posição que está entre o tipo matutino e tipo vespertino, sendo considerados como os mais flexíveis em relação aos outros dois cronotipos (MARQUES; MENNA-BARRETO, 2003).

Alterações em genes circadianos foram associadas à preferência diurna em diferentes populações (ALLEBRANDT; ROENNEBERG, 2008). Entretanto, pouca atenção tem sido dada ao estudo de genes não circadianos. Variações em genes não circadianos envolvidos nas principais vias aferentes de neurotransmissão da informação ambiental podem contribuir para a modulação do oscilador central dos ritmos e, conseqüentemente, dos fenótipos circadianos.

Baseado nessa hipótese, o objetivo desse trabalho foi realizar uma investigação de polimorfismos genéticos em receptores expressos no NSQ, envolvidos nas vias de sinalização responsáveis pela regulação dos ritmos circadianos em uma amostra da população (estudante universitários) de Alagoas, localizada na região Nordeste do Brasil (latitude 9° S).

## 2- REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Ritmos Biológicos

O principal fundamento da teoria da evolução é a seleção de variantes (conhecidas atualmente como alterações genéticas) que contribuem para a adaptação de uma determinada espécie ao ambiente (DARWIN, 1859). O ambiente por sua vez, é dotado de mudanças recorrentes causada pela rotação da terra ao redor do sol e de seu próprio eixo e, pela rotação da lua ao redor da terra. Essas mudanças constituem um desafio para a sobrevivência de qualquer organismo.

Os ritmos são evidentes na maioria dos seres vivos: plantas apresentam épocas diferentes de floração, ciclos de atividade e repouso nos animais, batimentos cardíacos etc. Assim, se o ambiente oscila, para se adaptar a ele um organismo precisa oscilar também. Dessa forma, a adaptação temporal consiste na harmonização entre a ritmicidade biológica e as alterações ambientais (MARQUES; MENNA-BARRETO, 2003).

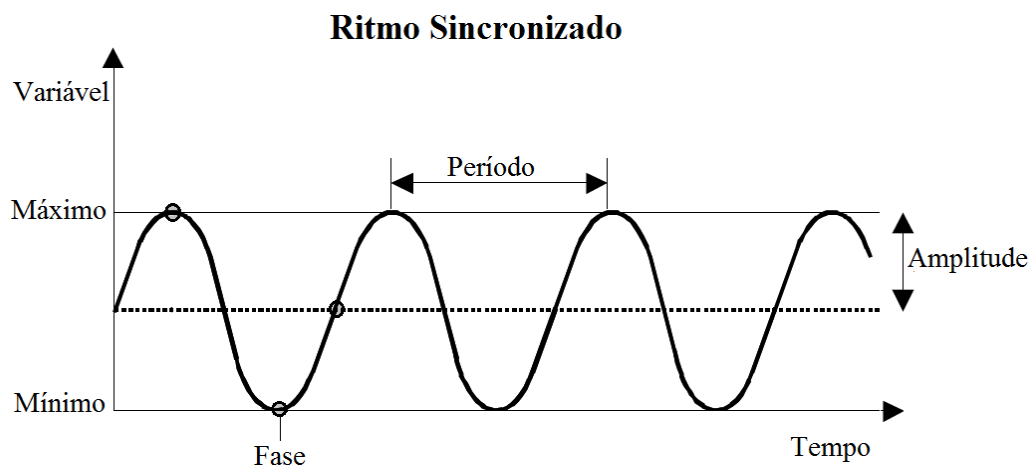
O primeiro relato científico de um ritmo biológico data de 325 a.C., quando Andróstenes de Thasos descreveu com riqueza de detalhes o movimento diário periódico das folhas da planta Tamarindo (RIETVELT, 1996). Movimentos foliares rítmicos da planta sensitiva *Mimosa* também foram descritos por Jean Jacques De Mairan, em 1729, quando esta foi mantida isolada do ciclo claro-escuro, sugerindo pela primeira vez o caráter endógeno dessa ritmicidade biológica (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).

Pesquisas envolvendo seres humanos só foram realizadas em 1938, por Nathaniel Kleitman e seu aluno Bruce Recharadson, 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 do ritmo em humanos. Sujeitos submetidos a escuro constante em cavernas artificiais, 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  $\tau$  (tau) (ASCHOFF, 1979, 1992; WEVER, 1979). Os ritmos biológicos sob condições constantes, ou seja, sem interferência ambiental, são denominados de ritmos em livre curso (MARQUES; MENNA-BARRETO, 2003).

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 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, sendo representada pela letra grega  $\phi$  (fi) (figura 1). Os ritmos biológicos são usualmente classificados de acordo com Halberg (1959) em: (1) infradianos, que apresentam períodos com mais de 24 horas; (2) ultradianos, que apresentam períodos com menos de 24 horas, e (3) circadianos, que possuem períodos com aproximadamente 24 horas (figura 2).

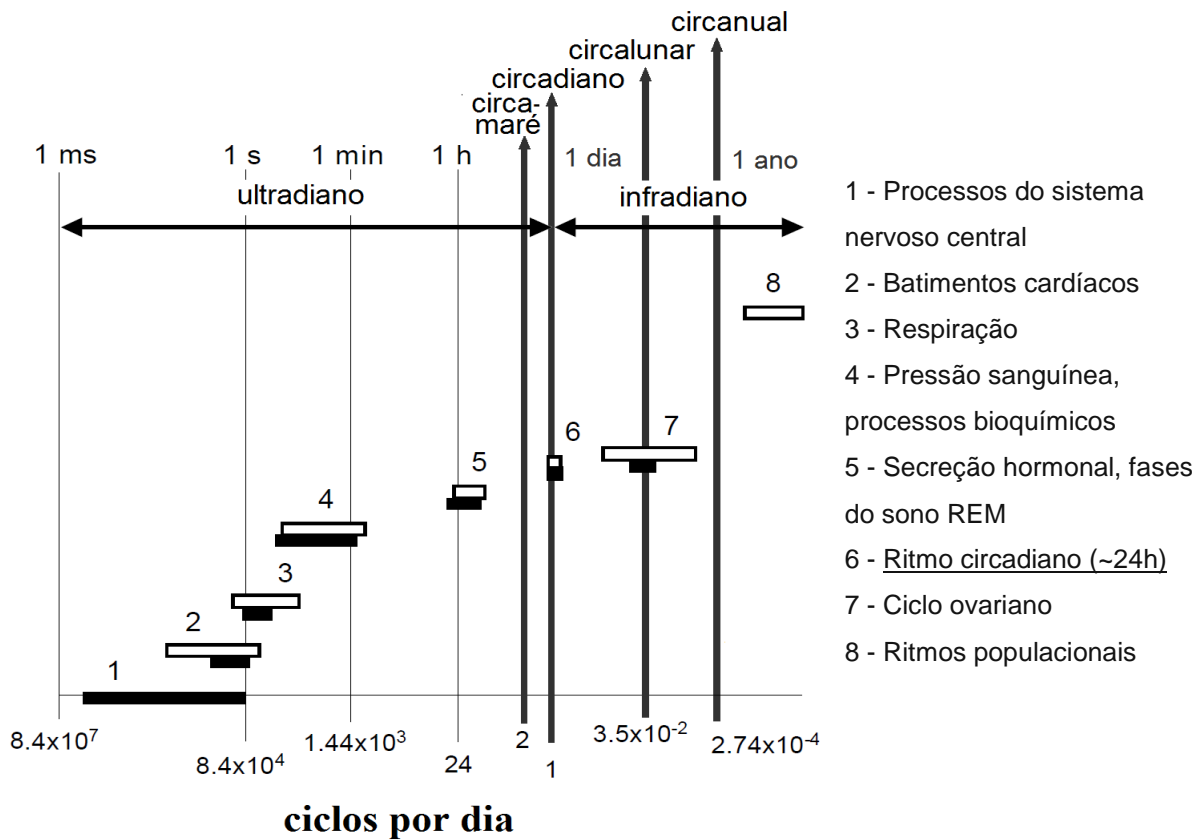
Contudo, por não haver um correlato funcional nessa classificação, Araújo e Marques (2003) propuseram que os ritmos biológicos sejam classificados em duas categorias: ritmos associados a ciclos ambientais, envolvidos funcionalmente com a antecipação de mudanças geofísicas, e ritmos sem correlatos ambientais, envolvidos com a antecipação de alterações internas. Os ritmos relacionados com alterações ambientais são os mais estudados devido ao conhecimento de suas frequências, sendo o ritmo circadiano o mais bem descrito e conhecido deles.

**Figura 1 - Parâmetros para a definição de um ritmo hipotético**



Fonte: Autora

**Figura 2 - Diferentes ritmos em humanos (barra branca) e outros mamíferos**



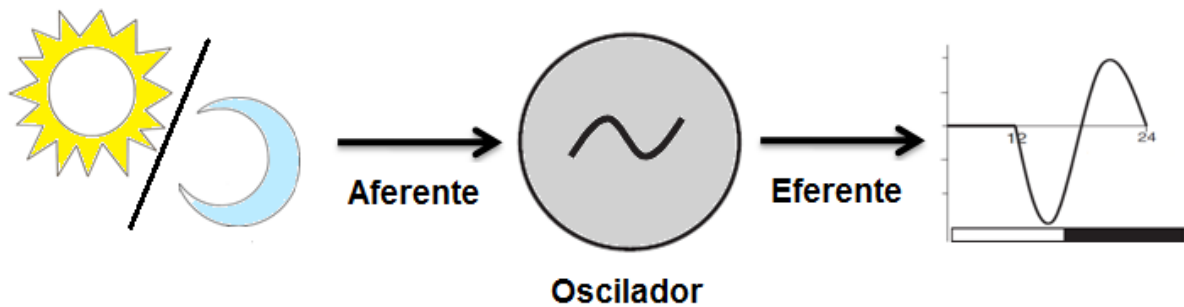
Fonte: Adaptado de ASCHOFF, 1981 e KÜHNLE, 2006)

## 2.2 Sistema de Temporização Circadiano em Mamíferos

Os ritmos circadianos são responsáveis pelo controle de uma variedade de processos biológicos nos diferentes seres vivos (BELL-PEDERSEN et al., 2005; LOWREY; TAKAHASHI, 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, 2003).

Esses ritmos fazem parte de um sistema composto por três componentes: (1) as vias aferentes, responsáveis pela transmissão dos sinais vindos do ambiente; (2) um oscilador endógeno, responsável pela geração endógena da ritmicidade circadiana; e (3) as vias eferentes, responsável pela transmissão das informações vindas do oscilador para a regulação da expressão dos processos fisiológicos e comportamentais (SEHGAL, 2004) (figura 3).

**Figura 3 - Modelo Simplificado dos ritmos circadianos**



As vias aferentes enviam a informação vinda do ambiente para o oscilador, que é responsável pela geração da ritmicidade circadiana. As informações temporais dessa ritmicidade são transmitidas para o organismo através das vias eferentes. Fonte: Autora

### 2.2.1 Propriedades Fundamentais dos ritmos circadianos

Os ritmos circadianos se diferenciam dos demais ritmos biológicos por apresentarem três propriedades fundamentais: (1) endogenicidade, com  $\tau$  sempre diferente de 24 horas quando o ritmo se encontra em livre curso, (2) capacidade de sincronização a um ciclo ambiental ( $T$ ), de forma que uma relação de fase seja estabelecida entre o período endógeno e o ciclo ambiental ( $\tau=T$ ) e (3) apresentam uma compensação de seu período a variações de temperatura (PITTENDRIPH, 1954). Os ritmos circadianos podem ser sincronizados por diferentes fatores ambientais, sendo o ciclo claro-escuro (CE) o principal deles (SEHGAL, 2004). Em 1960, Jurgen Ashoff utilizou o termo alemão *Zeitgeber* (doador de tempo) para definir um sinal ambiental capaz de sincronizar esses ritmos.

### 2.2.2 Processo de Sincronização

A sincronização é um processo dependente do período endógeno e da duração/força do *Zeitgeber* (ROENNEBERG et al, 2004). Ocorre basicamente através de dois mecanismos: o arrastamento e o mascaramento (DAAN; ASCHOFF, 2001)

#### a) Arrastamento

No mecanismo de arrastamento, o *Zeitgeber* causa um deslocamento de fase e, conseqüentemente, um ajuste no período e na fase do ritmo biológico. Dois modelos básicos de arrastamento têm sido descritos: o modelo contínuo ou paramétrico e o discreto ou não paramétrico (ASCHOFF, 1999; DAAN; ASCHOFF, 2001, JOHNSON et al., 1999; FLOESSNER; HUT, 2017). O modelo paramétrico é baseado no fato de que o ritmo

circadiano pode ser sincronizado pelo ciclo CE completo, o qual exerce um efeito contínuo sobre o período (ASCHOFF, 1999; DAAN; ASCHOFF, 2001).

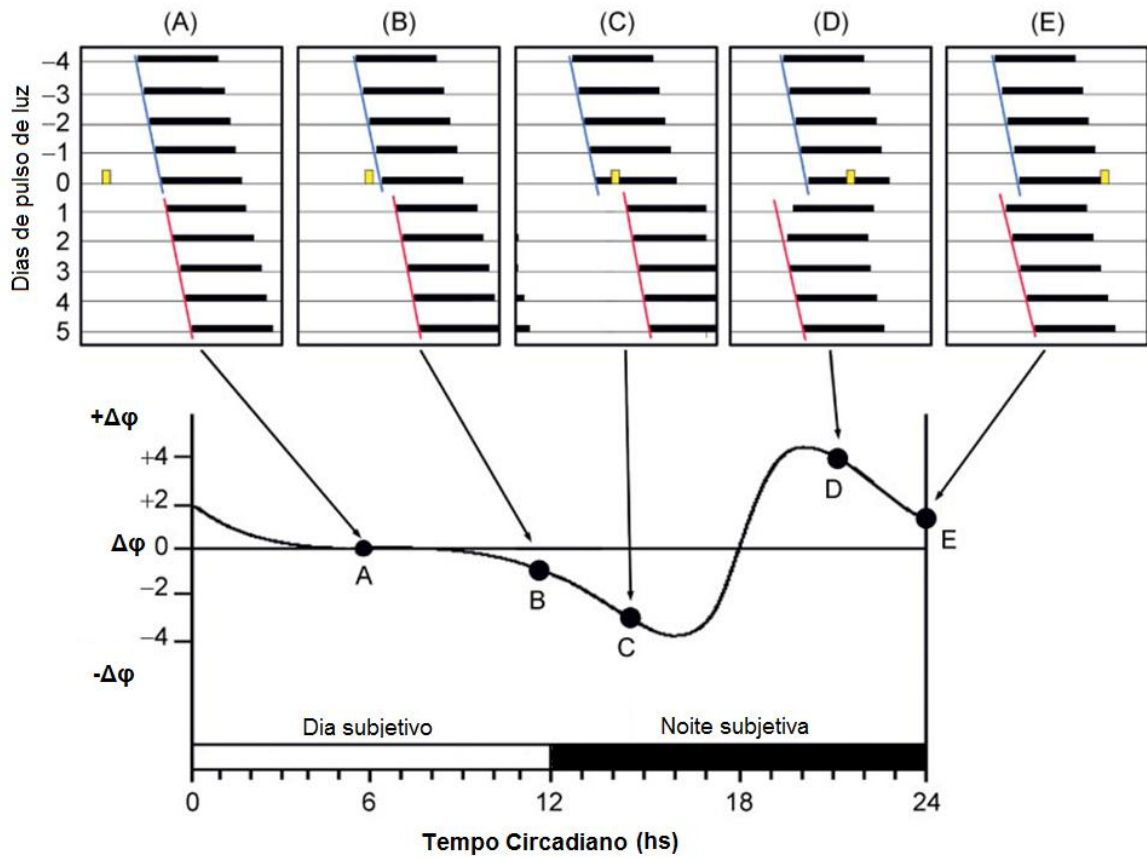
Enquanto que, o modelo não paramétrico é baseado no fato de que, dependendo da fase no qual o estímulo é aplicado, pulsos discretos de luz podem ser suficientes para o deslocamento significativo da fase e o estabelecimento de uma relação ou ângulo de fase  $\psi$  (psi) (PITTENDRIGH, 1960; DAAN, 2000). Experimentos com roedores mostraram que o horário do pulso, e não a intensidade da luz, é importante para a obtenção de uma relação de fase estável com o ciclo ambiental (DeCOURSEY, 1972). Para esse modelo, apenas o período em livre curso e a curva de resposta dependente de fase são importantes. Na natureza, a interação entre os dois modelos pode ser observada dependendo da espécie e das condições ambientais as quais estão expostos (DAAN, 2000).

#### a.1) Curva de resposta dependente de fase (CRF)

A perturbação do ritmo circadiano causada pela exposição a um estímulo (por exemplo pulso de luz) depende da fase em que este é aplicado (FLOESSNER; HUT, 2017). Essa perturbação (adiantamento ou atraso) é caracterizada como deslocamento de fase ( $\Delta\phi$ ) e pode ser observada através da curva de resposta dependente de fase (CRF). A CRF é a representação gráfica da dinâmica comportamental do ritmo em livre curso submetido a um estímulo em diferentes horas do dia (figura 4). Na construção de uma CRF os conceitos de “dia subjetivo” e “noite subjetiva” são utilizados como correspondentes das fases de atividade e repouso de um organismo (MARQUES; MENNA-BARRETO, 2003). Diferentes experimentos têm descrito CRFs para uma variedade de estímulos e em múltiplos organismos (JOHNSON, 1999).

O adiantamento ( $+\Delta\phi$ ) ou atraso ( $-\Delta\phi$ ) de fase em resposta ao pulso de luz é maximizado no intervalo de tempo no qual o organismo não está exposto a esse estímulo em condições constantes (figura 4) (JOHNSON et al., 1999). Dois tipos de CRF podem ser descritos: o Tipo 1, no qual a deslocamento de fase é relativamente pequeno (geralmente menor que 6 horas) e tem uma transição contínua entre os avanços e atrasos; e o Tipo 0, no qual o sistema de temporização possui uma alta sensibilidade ao pulso, que resulta em um grande deslocamento fase (Figura 5) (JOHNSON, 1999).

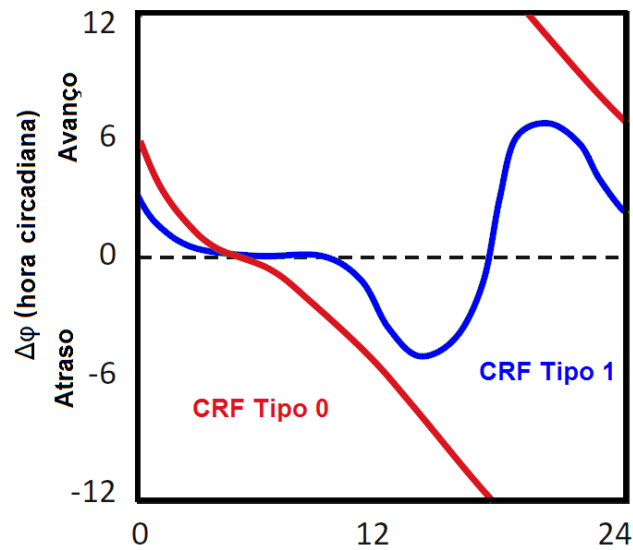
**Figura 4 - Efeito de diferentes pulsos de luz e deslocamento de fase na ritmicidade circadiana**



Representação esquemática do deslocamento de fase resultante da exposição dos animais em livre curso a breves pulsos de luz (A-E). Cada painel representa o actograma de um animal mantido em escuro constante e exposto a 1 hora de exposição a luz (caixa amarela). O deslocamento de fase é a diferença, no dia do pulso de luz, entre o início de atividade de cada linha antes (linha azul) e depois (linha vermelha) do estímulo. A resposta ao pulso de luz ocorre apenas durante a noite biológica do animal. Isso permite que o  $\tau$  do animal seja arrastado ao ciclo ambiental. Fonte: Adaptada de WEAVER; EMERY, 2013



**Figura 5 - Representação esquemática dos dois tipos de curva de resposta de fase**



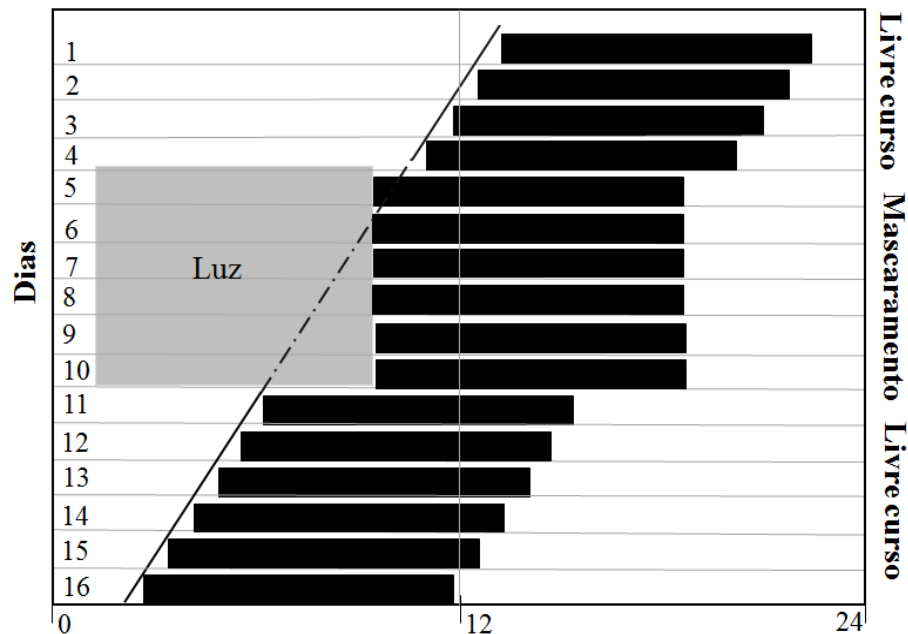
Classificação das curvas de resposta de fase (CRF). Tipo 1 ou fraca, resulta em pequenos deslocamentos de fase. Tipo 0 ou forte, resulta em grandes deslocamentos de fase. Fonte: Adaptado de FLOESSNER; HUT, 2017

#### b) Mascaramento

Fatores ambientais podem ter uma ação direta sobre o ritmo expresso, modificando-o, sem que haja o envolvimento do gerador da ritmicidade, ou seja, do oscilador central. A este fenômeno denominou-se de “mascaramento” (ASCHOFF, 1960), pois explicitava tratar-se de condições experimentais que poderiam ocultar o verdadeiro *Zeitgeber*. O mascaramento possibilita uma resposta direta a um estímulo ambiental, proporcionando ao organismo, uma flexibilidade que não lhe é permitida através do mecanismo rígido do arrastamento (MARQUES e MENNA-BARRETO, 2003). Assim, o mascaramento atua como agente da plasticidade rítmica tendo um importante papel na adaptação temporal (PAGE, 1989).

Existem dois tipos de mascaramento: o positivo, quando o agente mascarador ambiental resulta no aumento da expressão rítmica, e o negativo, quando esse agente resulta na diminuição da expressão rítmica. Diferentemente do deslocamento de fase, não se observa a manutenção do novo ângulo de fase nos períodos consecutivos. Assim, o agente mascarador age instantaneamente atrasando/adiantando a fase de um único período, sendo a mesma restabelecida no período seguinte (figura 6).

**Figura 6 - Representação esquemática do mecanismo de mascaramento**



O mecanismo de mascaramento resulta em uma mudança imediata da fase na presença de um sinal mascarador (por exemplo, a luz). Durante o mascaramento, o ritmo em livre curso continua ocorrendo, mesmo que a atividade do animal demonstre estar sincronizada ao sinal mascarador. Quando esse sinal é removido, o ritmo em livre curso continua ocorrendo exatamente na fase em que deveria ocorrer se ele tivesse sido mantido (linha escura). Fonte: Autora

### 2.3 Mecanismos moleculares reguladores dos ritmos circadianos

O mecanismo molecular da regulação circadiana consiste em alças de transcrição-tradução autorregulatórias que geram uma ritmicidade de aproximadamente 24 horas nos padrões de expressão dos seus genes (LOWREY; TAKAHASHI; 2011; PARTCH; GREEN; TAKAHASHI, 2014; MENDOZA-VIVERO et al., 2016 ).

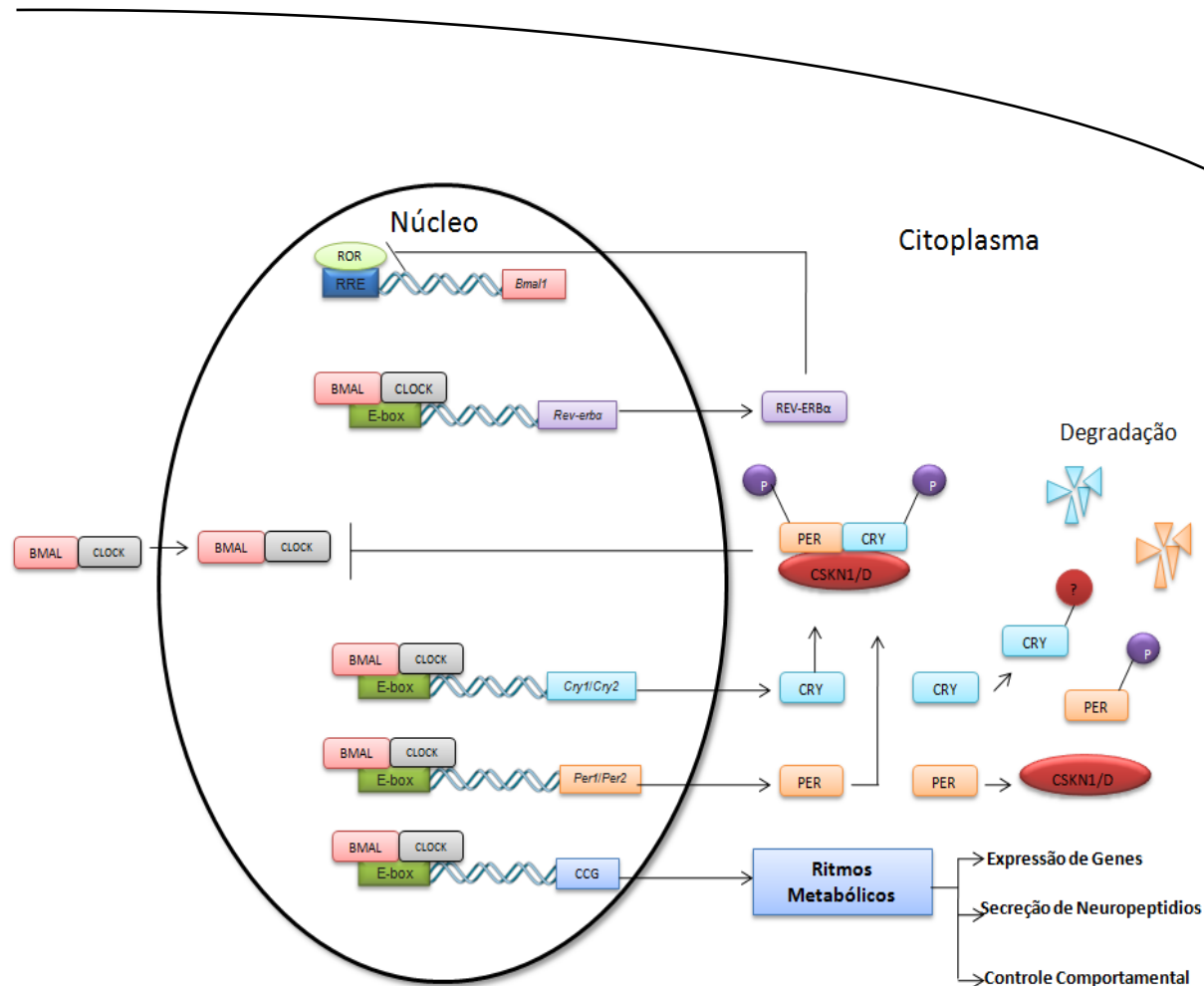
Em mamíferos, o sistema de temporização é composto primariamente por uma alça de retroalimentação negativa, onde os fatores de transcrição CLOCK e BMAL1 interagem entre si, através do domínio PAS (PER-ARNT-SIM) destas proteínas, formando heterodímeros. A formação do heterodímero CLOCK-BMAL1 ativa a transcrição dos genes *Per* (*Period 1 e 2*) e *Cry* (*Cryptochrome 1 e 2*) através de sua ligação com a região regulatória *E-box* 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 essa região *E-box*(5'-CACGTG-3') (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; LOWREY; TAKAHASHI; 2011; PARTCH et al., 2014) e dessa forma, sua própria transcrição (Figura 7).

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 CKI $\epsilon$  (*Casein kinase  $\epsilon$* ) é responsável pela fosforilação e, consequentemente, a degradação das proteínas PERs (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 uma 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). Adicionalmente, outros genes também foram gradualmente descritos como componentes do mecanismo de regulação circadiano, tais como *Timeless*, *Dec1*, *Dec2*, *Bmal2*, *RevErb $\beta$* , *Ror $\beta$* , *Rory* e *E4bp4* (UKAI; UEDA, 2010; PARTCH et al., 2014; MENDOZA-VIVERO et al., 2016).

Figura 7 - 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 e ativam 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 autorregulatória é composta por *Rev-Erba* que é um alvo direto do complexo ativador de transcrição CLOCK-BMAL1. REV-ERB $\alpha$  inibe a transcrição de *Bmal1* e compete com o fator de transcrição ROR (*retinoic acid-related orpha receptor*) para se ligar a região RREs no promotor do gene *Bmal1*. Fonte: Autora, baseado em Takahashi et al., 2008.

## 2.4 Núcleos Supraquiasmáticos (NSQs) e suas principais vias aferentes

Durante os anos de 1957 até meados de 1960, Curt Richter (1894-1988) conduziu uma série de experimentos com o objetivo de identificar, anatomicamente, o oscilador circadiano. Seus resultados indicaram o hipotálamo como sendo a localização do oscilador circadiano (RICHTER, 1965). Após a lesão de diferentes áreas hipotalâmicas, identificou-se uma região que quando lesionada resultava na abolição do ritmo da atividade locomotora. Essa região, localizada abaixo do quiasma óptico, recebeu o nome de Núcleos Supraquiasmáticos (NSQ) (WELSH; TAKAHASHI; KAY, 2010) (figura 8).

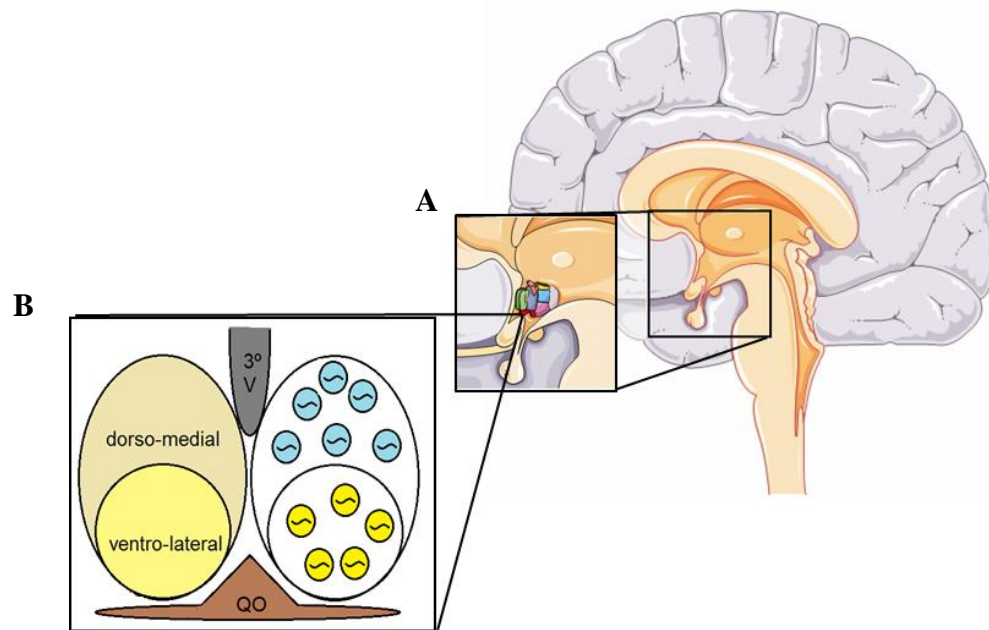
Estudos seguintes demonstraram que após a lesão do NSQ, a ritmicidade poderia ser restaurada transplantando-se os NSQ de um animal para o outro, passando esse a expressar o ritmo de seu doador (SILVER et al., 1996). Juntos, tais estudos levaram a conclusão de que o NSQ é o oscilador circadiano central capaz de estabelecer uma relação de fase com os osciladores periféricos localizados em outras áreas cerebrais e nos tecidos periféricos (MOHAWK; GREEN; TAKAHASHI, 2012; BUIJS et al., 2016).

O NSQ é composto por dois núcleos com aproximadamente 10.000 neurônios cada um, os quais recebem a informação luminosa captada pelas células da retina através do trato retino-hipotalâmico (COLWELL et al., 2015). O efeito da luz sobre os ritmos circadianos é mediado por uma população de células ganglionares fotossensíveis da retina (RGCs), as quais expressam o fotopigmento melanopsina (LEGATES; FERNANDEZ; HATTAR, 2014). Anatomicamente, o NSQ é organizado em duas sub-regiões: uma dorso-medial e outra ventro-lateral (figura 8) (ANTLE; SILVER, 2005; TAKAHASHI et al., 2008). Tal divisão é definida fenotipicamente pelos tipos diferentes de células que as compõem (MORIN, 2007).

A região mais interna (ventro-lateral) recebe informações da luz através do trato retinohipotalâmico e expressa *c-fos*, *Per1* e *Per2* em resposta ao deslocamento de fase causado luz, enquanto que a região mais externa (dorso-medial) recebe sinais vindos da região ventro-lateral através de diversos neurotransmissores, incluindo o polipeptídeo intestinal vasoativo (VIP), polipeptídeo liberador de gastrina (GRP), substância P (SP) e ácido gama-amino-butírico (GABA) (ANTLE; SILVER, 2005).

A porção ventro-lateral do NSQ recebe informações externas através de três vias principais: (1) do trato retino-hipotalâmico (TRH), (2) do trato gênico-hipotalâmico e (3) das projeções dos núcleos da rafe (REGHUNANDANAN; REGHUNANDANAN, 2006; GILLETTE et al., 2012; SOLLARS; PICKARD, 2015; ROSENWASSER; TUREK, 2015).

**Figura 8 - Representação esquemática dos núcleos supraquiasmáticos: sua localização e suas subdivisões**



Os núcleos supraquiasmáticos estão localizados no hipotálamo anterior acima do quiasma óptico (A) e são sub-divididos em duas regiões a dorso-medial e a ventro-lateral (B). 3ºV- terceiro ventrículo; QO- quiasma óptico. Fonte: Autora, adaptada de: <http://www.moodle.mouro.com/EVA/picture.php?/3526>.

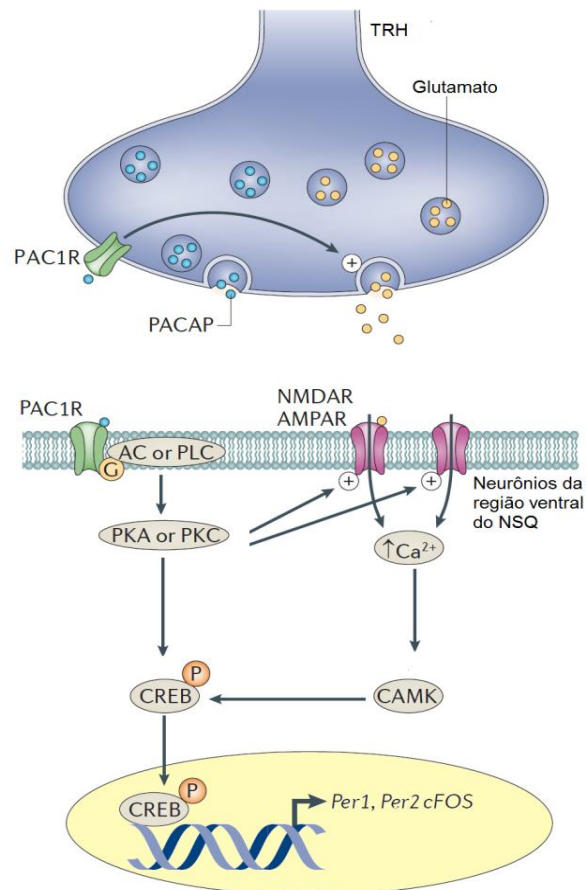
#### 2.4.1 Trato retino-hipotalâmico (TRH)

Os sinais fóticos vindos das células ganglionares sensitivas da retina são transmitidos até o NSQ através das fibras do TRH (SILVER; RAINBOW, 2013). As terminações nervosas do TRH secretam glutamato, que é considerado o principal neurotransmissor envolvido na conversão da informação fótica; e sob certas condições, o neuropeptídeo adenilato-ciclase pituitária (PACAP).

A ativação dos receptores do glutamato (AMPA e/ou NMDA) aumenta a taxa de disparos neuronais e o influxo de  $Ca^{2+}$  nos neurônios do NSQ. Esse aumento de cálcio ativa uma cascata de sinalização que converge na alteração de fatores de transcrição, incluindo a proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMP cíclico (CRE) – CREB. Após a fosforilação, a proteína CREB é translocada para o núcleo podendo se ligar ao seu sítio na região promotora dos genes *c-Fos*, *period 1 (Per1)* e *2 (Per2)*, e regular a transcrição desses genes ao longo das horas do dia. Dentro do NSQ, a regulação fótica de *c-Fos* e *Per1* é rápida, enquanto que a regulação de *Per2* é mais lenta (GOLOMBEG; ROSENSTEIN, 2010; COLWELL, 2011) (figura 9). As mudanças na expressão gênica quando sobreposta ao ciclo

de transcrição-tradução circadiano correspondem funcionalmente ao adiantamento e atraso de fase do oscilador circadiano (GILLETTE, 1996; KORNHAUSER et al., 1996; SHIGEYOSHI et al., 1997)

**Figura 9 – Cascata de sinalização demonstrando como a luz regula ritmicamente os neurônios do NSQ**



A informação fótica é transmitida para o NSQ através do TRH, resultando assim na liberação do glutamato e ativação dos seus receptores. Essa cascata de sinalização permite o influxo de cálcio e a fosforilação de CREB, responsável pela ativação de genes circadianos. Fonte: COLWELL, 2011.

A microinjeção de glutamato no NSQ simula o deslocamento de fase causado pela luz no ritmo circadiano da atividade neuronal *in vitro*, (SHIRAKAWA; MOORE, 1994; FRANKEN et al., 1999; HURST et al., 2001) e da atividade locomotora *in vivo* (MEIJER, 1988), produzindo adiantamento ou atraso dependendo da fase em que o mesmo é aplicado. Esse efeito do glutamato no NSQ parece ser mediado através da ativação dos receptores NMDA (NMDAR) (SHIBATA et al., 1994; MINTZ; ALBERTS, 1997; MINTZ et al., 1999; COLWELL, 2011; BENDOVIĆ et al., 2012).

#### 2.4.2 Trato geniculo-hipotalâmico (TGH)

O folheto intergeniculado lateral (FIL) é o segundo aferente do sistema circadiano (Figura 9). Ele recebe impulsos vindos diretamente da retina e transmite essa informação fóptica para o NSQ através do trato geniculo-hipotalâmico (TGH) (MORIN et al., 1992, 2013). Os neurônios do FIL são sensíveis a mudança na intensidade luminosa em geral, fazendo do TGH uma via de sinalização indireta e alternativa para o arrastamento do período circadiano pelos estímulos fópticos. Além disso, o FIL também pode atuar no papel da regulação do sistema circadiano através dos estímulos não fópticos tais como a atividade locomotora (ROSENWASSER; TUREK, 2015) (Figura 10).

A conexão entre o FIL e o NSQ ocorre principalmente através da liberação do neuropeptídeo Y (NPY), o qual atua diretamente nos neurônios do NSQ modulando a regulação fóptica e não fóptica desse oscilador circadiano (MUSCAT; MORIN, 2006). Lesões no FIL reduzem o deslocamento de fase induzido pela luz em hamsters (HARRINGTON; RUSAK, 1986; PICKARD et al., 1987). A microinjeção de NPY no NSQ *in vitro* (HARRINGTON; SCHAK, 2000; ANTLE; MISTLBERGER, 2000; YANNIELLI E HARRINGTON, 2001) e *in vivo* (HUHMAN; ALBERS, 1994; GOLOMBEK, et al., 1996; GLASS et al., 2010) resulta no deslocamento de fase dos disparos neuronais e do ritmo de atividade, respectivamente. Esse avanço de fase durante o dia subjetivo sugere que o NPY está relacionado com a modulação da ritmicidade (ALBERS; FERRIS, 1984). Adicionalmente, o NPY parece atuar através do receptor Y2 (NPYR2) (GOLOMBEK et al., 1996; HUHMAN et al., 1996).

#### 2.4.3 Projeções dos núcleos da rafe

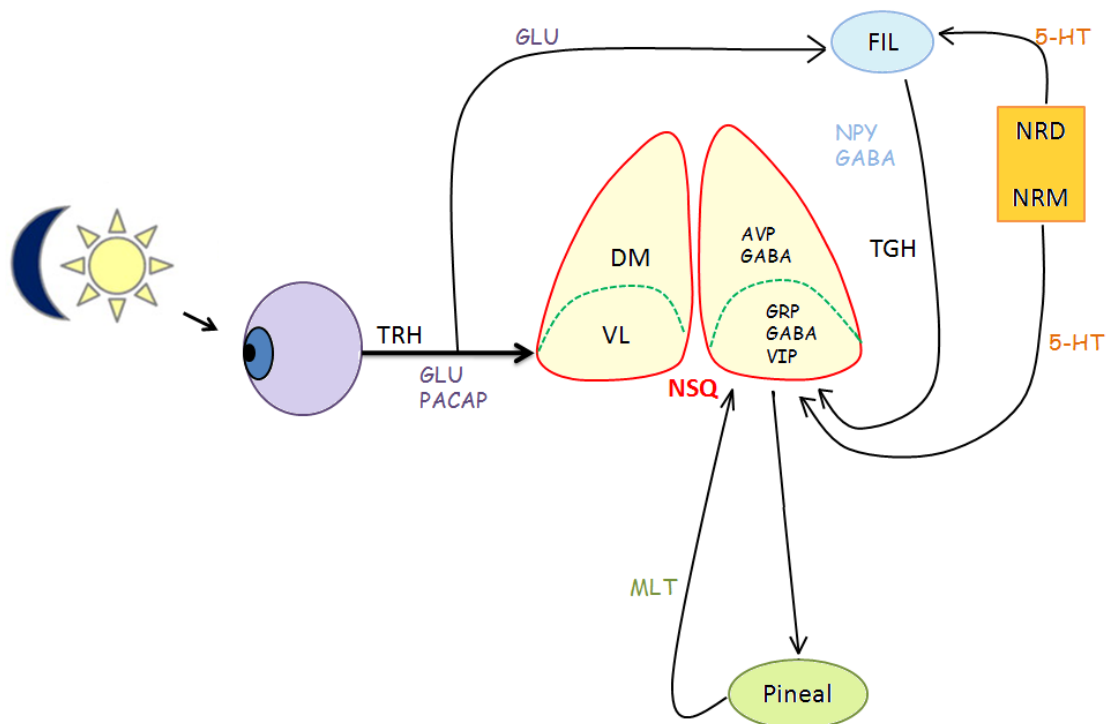
O terceiro maior aferente do sistema circadiano é composto pelas projeções serotoninérgicas originadas principalmente dos núcleos da rafe medial – NRM (BERNSTEIN; MORIN, 1998). A ativação dos NRM resulta no aumento da liberação de serotonina (5-HT) no NSQ (GLASS et al., 2000) (Figura 10). A secreção da 5-HT apresenta um padrão circadiano, com seu máximo ocorrendo no CT 14 no NSQ de ratos (BARASSIN et al., 2002). Além disso, projeções serotoninérgicas ascendentes originadas da rafe dorsal também inervam o FIL, promovendo assim, uma segunda rota para a regulação serotoninérgica do NSQ (MEYER-BERNSTEIN; MORIN, 1996). Essas projeções serotoninérgicas para o NSQ e FIL podem atuar



na modulação dos efeitos fóticos, tão bem quanto na mediação dos efeitos não fóticos no oscilador central (ROSENWASSER; TUREK, 2015).

Lesões nas inervações serotoninérgicas do NSQ foram relacionadas com o deslocamento de fase da atividade locomotora (SMALE et al., 1990; CUTRERA et al., 1994; MEYER-BERNSTEIN; MORIN, 1998). Estimulações elétricas nos núcleos da rafe medial e dorsal na metade do dia subjetivo induziram a liberação de 5-HT no NSQ, resultando no adiantamento de fase do ritmo de atividade locomotora (MEYER-BERNSTEIN; MORIN, 1999; GLASS et al., 2000, 2003). Em estudos *in vitro*, a injeção de 5-HT durante o dia subjetivo também causa um adiantamento de fase nos disparos neuronais (PROSSER, 2000; SPROUSE et al., 2004).

**Figura 10 - Representação esquemática das principais vias aferentes do sistema circadiano em mamíferos**



Principais vias aferentes dos núcleos supraquiasmáticos (NSQ). Os sinais fóticos vindos da retina são transmitidos para NSQ através do trato retino-hipotalâmico (TRH) tendo como principais neurotransmissores o glutamato (GLU) e o polipeptídeo ativador da *adenilato-ciclase pituitária* (PACAP). O NSQ também recebe informação fótica indiretamente do folheto intergeniculado lateral (FIL) pelo trato genículo-hipotalâmico (TGH) através de seus neurotransmissores: neuropeptídeo Y e GABA. Além disso, o NSQ recebe informações vindas dos núcleos da rafe média e dorsal (NRM e NRD), através da serotonina (5-HT) e, da glândula pineal, através da melatonina (MLT). DM-região dorso-medial e VL-região ventro-lateral. Fonte: Autora.

Microinjeção de um agonista da 5-HT resulta na redução dos disparos neuronais no NSQ após a estimulação do nervo óptico, na inibição na expressão de *c-Fos* induzido pela luz e, dependendo da dose, atenua o deslocamento de fase causado pela atividade na roda (equipamento que permite medir a atividade motora espontânea de animais em experimentação) (PROSSER et al., 1990; MEDANIC; GILLETTE, 1992, JIANG et al., 2000). O envolvimento da 5-HT na regulação rítmica parece ser mediado através dos receptores 5-HT1A e 5-HT7, localizados no NSQ, FIL e núcleos da rafe, e pelo receptor 5-HT1B, localizado pré-sinápticamente nos terminais do TRH (PICKARD et al., 1997; ANTLE et al., 2003; SMITH et al., 2001; EHLEN et al., 2001; SPROUSE et al., 2004; SMITH et al., 2008).

#### 2.4.4 Melatonina (MLT)

Além das projeções vindas do TRH, TGH e das projeções da 5-HT, outras vias, tais como a da MLT, podem atuar como aferentes do sistema circadiano (Figura 10). A MLT é um hormônio sintetizado na glândula pineal durante a fase escura do ciclo CE. A síntese e a liberação desse hormônio são reguladas pelas vias eferentes do NSQ através de uma cascata de sinalização multisináptica (FOULKES et al. 1997; PERREAU-LENZ et al., 2003). Por sua vez, a MLT também pode atuar na modulação do sistema circadiano (STARKEY et al., 1995).

A aplicação de MLT exógena pode resultar em uma mudança de fase dos disparos neuronais *in vitro*. (MCARTHUR et al., 1997; LIU et al., 1997) e, da atividade locomotora *in vivo* (SLOTTEN et al., 2002; SCHUHLER et al., 2002). Em humanos, a ingestão de MLT pode ajustar o sistema de temporização endógeno causando um adiantamento ou um atraso de fase, dependendo da CRF (BURGESS et al., 2008; KEIJZER et al., 2014). O uso de MLT pode ser um tratamento efetivo para diferentes distúrbios circadianos do sono como trabalhos em turno, *jetlag* e transtornos de fase avançada ou atrasada do sono (HARDELAND et al., 2008; BURGESS e EMENS, 2016).

Esse efeito regulatório da MLT no NSQ é exercido através a ativação dos receptores acoplados a proteína G (MT1 e MT2), os quais iniciam diferentes cascatas de sinalização celular (LIU et al., 2016, PÉVET, 2016). Estudos mostram que os receptores da MLT apresentam respostas distintas no NSQ: a inibição dos disparos neuronais está relacionada com a ativação do receptor MT1 enquanto que, o deslocamento de fase dos disparos neuronais está relacionado à ativação do MT2 (DUBOCOVICH; MARKOWSKA, 2005;

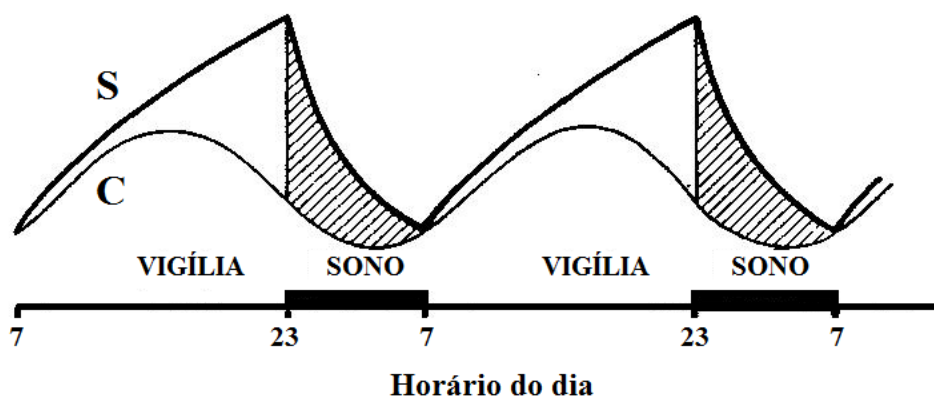
DUBOCOVICH, 2007; PFEFFER et al, 2012. A microinjeção de 4P-PDOT, um antagonista seletivo para o MT2, bloqueia o adiantamento de fase do ritmo de atividade mediado pela MLT em camundongos C3H/HeN (HUNT et al., 2001).

## 2.5 Sono e ritmos circadianos

A regulação do sono é realizada através da interação entre dois processos: o homeostático (processo S), dependente do sono e da vigília; e o circadiano (processo C), controlado pelo NSQ (BORBÉLY; ACHERMANN, 1999). O processo S representa a propensão ao sono, que aumenta durante a vigília e declina durante o sono. Quando essa propensão homeostática aumenta e atinge certo limiar, o sono é ativado; diferentemente, quando essa propensão diminui, atingindo um limiar diferente, a vigília é evocada (BORBÉLY et al., 2016).

O processo circadiano, por sua vez, representa a modulação diária dos níveis desses limiares (BORBÉLY; ACHERMANN, 1999) (figura 11). Uma considerável diferença individual tem sido observada em ambos os processos, que pode ser explicada devido à variabilidade genética (GOEL, 2017). Além desses dois sistemas, existe um sistema ultradiano responsável pela alternância cíclica do sono REM e não-REM durante a fase de sono (ROSENWASSER, 2009).

**Figura 11 – Representação dos dois modelos envolvidos na regulação do sono: homeostático (S) e circadiano (C)**



Fonte: BORBÉLY; ACHERMANN, 1999

Diferentes neurotransmissores, tais como glutamato, serotonina e neuropeptídeo Y, estão envolvidos na regulação da vigília e do sono (MONTI; PANDI-PERUMAL; SINTON, 2008). O glutamato é o neurotransmissor excitatório mais comum do cérebro e atua no controle da vigília (MURILLO-RODRÍGUEZ et al, 2012). Níveis elevados de glutamato extracelular têm sido encontrados durante a vigília quando comparados com a fase de sono (LENA et al., 2012). Estudos farmacológicos mostraram que a infusão de agonistas glutamatérgicos, tais como NMDA, induzem o estado de alerta (DATTA; PATTERSON; SPOLEY, 2001). Além disso, o glutamato está relacionado com início do sono REM, juntamente com a acetilcolina (PACE-SCHOTT; HOBSON, 2002).

A serotonina, localizada nos núcleos da rafe, também é um neurotransmissor que participa da regulação da vigília/sono, sendo o sistema serotoninérgico ativo durante a vigília e inativo durante o sono (MONTI; PANDI-PERUMAL; SINTON, 2008). Adicionalmente, a serotonina atua na inibição do sono REM (sono de ondas rápidas) e, sob certas circunstâncias, contribui para o aumento da propensão do sono (MONTI, 2010). A inibição da síntese de serotonina resulta na promoção da vigília (URSIN, 2002) e a administração de agonistas para seus receptores causam a diminuição do sono REM em roedores e humanos (WILSON et al., 2005; MONTI; JANTOS, 2006).

O neuropeptídeo Y é considerado um dos fatores de regulação do sono (MONTI; PANDI-PERUMAL; SINTON, 2008). Estudos com animais demonstraram que o NPY melhora a sincronização electroencefalográfica (EEG) e aumenta a continuidade do sono (FUXE et al, 1983; ZINI et al, 1984). Em humanos, a administração do NPY diminui a latência do sono e o início do sono REM e, aumenta o estágio 2 do sono (ANTONIJEVIC et al., 2000). Em estudo mais recente foi demonstrado que os níveis de NPY plasmáticos durante a manhã foram menores em pacientes com insônia primária comparados com os controles normais ( $M = 5,11$  e  $dp = \pm 2,87$  ng/ml vs.  $M = 7,01$  e  $dp = \pm 3,44$  ng/ml,  $p = 0,009$ ), reforçando o papel do NPY na promoção do sono (HUANG et al., 2015).

Além dos neurotransmissores, hormônios tais como a melatonina também possui um papel importante na regulação do ciclo vigília/sono. A participação da melatonina nessa regulação do sono pode estar relacionada a inibição do sistema responsável pela vigília dentro do hipotálamo (SHOCHAT; HAIMOV; LAVIE, 1998). A administração de melatonina durante o dia (quando seus níveis são mínimos) resulta na indução da fadiga e da sonolência em humanos (CAJOCHEN; KRÄUCHI; WIRZ-JUSTICE, 2003). Adicionalmente, o tratamento com melatonina tem sido relacionado a diminuição da latência do sono, aumento da eficiência do sono e da duração total do sono (XU et al., 2005), sendo utilizado para os

distúrbios circadianos do sono como a síndrome da fase atrasada do sono (SFAS) e a síndrome da fase avançada do sono (SFAVS), *jet lag* e a síndrome do sono diferente de 24 horas (ZISAPEL, 2010).

## 2.6 Preferência Diurna (cronotipo)

A preferência diurna ou cronotipo é a manifestação comportamental do sistema de temporização intrínseco, caracterizada principalmente pela preferência individual dos horários de dormir/acordar e realizar atividades (KALMBACH et al., 2016). Três tipos de cronotipos têm sido descritos: matutinos, intermediários e vespertinos. Na vida diária, os cronotipos matutinos preferem acordar e dormir cedo e são mais ativos durante o período da manhã, enquanto que os cronotipos vespertinos executam melhor suas atividades no período da tarde e começo da noite, preferindo acordar e dormir nos horários mais tardios (ADAN et al., 2012).

No entanto, a maioria dos indivíduos ocupa uma posição que está entre os tipos matutinos e vespertinos, sendo assim definidos como tipos intermediários. Tal cronotipo tem sido apontado como sendo o mais flexível em relação aos outros dois (MARQUES; MENNA-BARRETO, 2003). Pessoas matutinas e vespertinas se diferem biologicamente em suas temperaturas corporais internas (BAEHR et al., 2000), seus picos de secreção da MLT (BURGESS; FOGG, 2008; KANTERMANN et al., 2015), além de seus níveis de cortisol ao acordar (RANDLER; SCHAAL, 2010).

A matutividade e a vespertividade têm sido avaliada principalmente através de questionários tais como o Questionário de Matutividade e Vespertividade (MEQ) (HORNE OSTBERG, 1976), um instrumento amplamente utilizado para diferenciar cronotipos através de uma escala de pontuação; e o Questionário de Cronotipo de Monique (MCTQ) (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 (MSFsc). Ambos os questionários apresentaram uma boa correlação com o  $\tau$  (MEQ:  $r = -0,70$  e MSFsc:  $r = 0,68$ ) (KITAMURA et al., 2014; KANTERMANN; SUNG; BURGESS, 2015).

Evidências têm demonstrado que os cronotipos podem ser influenciados por fatores tais como idade, sexo e exposição à luz (ADAN et al., 2012). Crianças são geralmente mais matutinas (ZIMMERMANN, 2016; RANDLER; TRUC, 2014), enquanto que, durante a

adolescência tornam-se vespertinas (ROENNEBERG et al., 2004). No final da adolescência, as pessoas progressivamente tornam-se matutinas novamente (ROENNEBERG et al., 2004). Em relação ao sexo, estudos demonstram que mulheres tendem a serem mais matutinas que os homens até a meia idade, apresentando depois disso, cronotipos semelhantes aos homens (ROENNEBERG et al., 2004; ROENNEBERG et al., 2007; ADAN; NATALE, 2002; DUARTE et al., 2014).

A longitude e a latitude também são fatores relevantes para a preferência diurna (RANDLER; RAHAFAR, 2017). Em um estudo envolvendo adolescentes de 17 países, Randler et al. (2008) observaram uma diferença na distribuição dos cronotipos com relação ao local de residência dos indivíduos, sendo aqueles localizados nos trópicos mais matutinos comparados com os dos subtropicais. Além disso, a relação entre latitude e preferência diurna tem sido avaliada em estudos envolvendo regiões de um mesmo país (BORISENKOV et al., 2010.; MIGUEL et al. 2014; MASAL et al., 2015) e entre países diferentes (RANDLER, 2008.; SANI et al. 2015), com vespertinos sendo encontrados em locais mais distantes da linha do Equador em ambos estudos.

Os cronotipos podem, ainda, sofrer influência dos fatores como, as rotinas diárias de trabalho e estudo. A hora de dormir e acordar pode ser diferenciada entre os dias da semana, quando essa é tipicamente determinada pelos horários de trabalho e estudo; e finais de semana, quando as pessoas podem seguir seus próprios horários de sono. Tipos vespertinos apresentam um déficit de sono maior durante a semana porque mantêm seus horários preferenciais de ir dormir, mas por outro lado, são forçados a acordarem cedo para estudar/trabalhar. No entanto, o déficit de sono pode também ser observado em pessoas matutinas durante os finais de semana, devido à pressão social para ficar acordado até mais tarde (ROENNEBERG et al., 2003; ROEPKE; DUFFY, 2010). Essa diferença nos hábitos de sono entre os dias de semana e finais de semana recebe o nome de *jetlag* social e tem sido associada com alguns fatores de risco para a saúde, tais como obesidade e fumo (ROENNEBERG et al., 2012 WITTMANN et al., 2006).

### 2.6.1 Base genética da preferência diurna ou cronotipo

Uma diversidade de estudos tem demonstrado que a preferência diurna possui uma base genética. Pesquisas familiares e com gêmeos (monozigóticos e dizigóticos) mostraram que a preferência diurna é um traço herdado, com uma herdabilidade estimada de 23% a 47% para estudos familiares (KLEI et al., 2005; EVANS et al., 2011; SCHANTZ et al., 2015) e, de 40%-

54% para estudos com gêmeos quando as principais formas de acessibilidade do cronotipo foram utilizadas (DRENNAN et al., 1992; HUR et al., 1998, 2007; KOSKENVUO et al., 2007; VINK et al., 2001; BARCLAY et al., 2010; WATSON et al., 2013; TOOMEY et al., 2015).

A SFAS e a SFAVS são consideradas os casos mais extremos da preferência diurna com herança familiar (JONES et al., 1999; ANCOLI-ISRAEL et al., 2001; REID et al., 2001). A SFAVS foi a primeira variante circadiana descrita com padrão de herança mendeliana, sendo caracterizada por uma mutação no domínio da caseína kinase I (CKI), sítio de ligação para a proteína PER2 (TOH et al., 2001; SATOH et al., 2003; XU et al., 2005; VANSELOW et al., 2006). Adicionalmente, um polimorfismo de repetição em tandem (4 ou 5 repetições) no gene *Per3* tem sido associado com a SFAS (EBISAWA et al., 2001; ARCHER, et al., 2003; PEREIRA et al., 2005).

Além disso, estudos de genes candidatos têm investigado a associação de polimorfismos em genes circadianos (*Clock*, *Per -1, 2 e 3*, *Arntl2*, *Tim*, entre outros) com preferência diurna em diferentes populações (KATZENBERG et al., 1998; ARCHER et al., 2003; JOHANSSOM et al., 2003; MISHIMA et al., 2005; CARPEN et al., 2006; JONES et al., 2007; LÁZÁR et al., 2012). Contudo, outros estudos não encontraram essa associação (PEDRAZZOLI et al., 2007; CHANG et al., 2011; CHOUB et al., 2010; OSLAND et al., 2011). Essa discrepância nos resultados ainda não está clara, no entanto, pode estar relacionada com diferenças de métodos, localização geográfica, tamanho amostral e diferenças étnicas.

Recentemente, estudos envolvendo GWAS (*genome wide association studies*) revelaram novos loci associados com preferência diurna (HU et al., 2016; LANE et al. 2016; JONE et al., 2016). Hu et al. (2016), utilizando dados genéticos do *23andMe* (n = 89.283), encontraram 15 loci diferentes associados com matutividade, incluindo genes envolvidos na fototransdução. Em um segundo estudo, utilizando dados de 100.420 sujeitos pertencentes ao *UK Biobank*, Lane et al. (2016) encontraram 12 loci diferentes relacionados com cronotipo (vespertividade), sendo 8 destes, replicações do estudo anterior.

Outra pesquisa com GWAS, realizada com 128.266 indivíduos britânicos do mesmo *UK Biobank*, demonstrou 16 variantes associadas com matutividade, sendo que 7 destas não foram identificadas pelo estudo realizado com o *23andMe* (JONE et al., 2016). Todos os três estudos com GWAS acharam associação de variantes genéticas em genes circadianos e não circadianos com preferência diurna autodeclarada. Assim, esses achados indicam que polimorfismos em genes não circadianos envolvidos nas vias aferentes de sinalização podem estar associados com a preferência diurna.

## 2.7 Polimorfismos nos receptores MT2, 5-HTR1A, NPY2 e NMDA e no transportador 5-HTTLPR

Polimorfismos nos receptores da MT2, 5-HT, NPY e do NMDA, os quais estão envolvidos nas vias aferentes que regulam a ritmicidade do oscilador circadiano central têm sido associados com diferentes fenótipos. Alterações genéticas no gene do receptor MT2, considerado o principal receptor envolvido no deslocamento de fase no NSQ (DUBOCOVICH, 2007; PFEFFER et al, 2012), foram associadas com esclerose idiopática em adolescentes (YANG et al., 2015), nível elevado de glicose plasmática na diabetes mellitus gestacional (ZHAN et al., 2015) e depressão recorrente (GALECKA et al., 2011). O polimorfismo rs4753426 nesse mesmo gene foi associado com a duração da incidência solar na população global (JI et al., 2011), sendo a frequência do alelo C maior nos países com incidência solar menor, indicando assim um possível papel adaptativo desse SNP.

Estudos envolvendo polimorfismos no receptor 5-HTR1A, um dos receptores da 5-HT que pode atuar na regulação rítmica do NSQ (SPROUSE et al., 2004; SMITH et al., 2008), demonstraram correlação com esquizofrenia, depressão maior e comportamento suicida (SCHILD et al., 2013; ZHANG et al., 2016). O polimorfismo funcional rs6295 localizado na região promotora do gene *HTR1A*, foi associado com depressão maior, comportamento suicida, transtorno bipolar, resposta a antidepressivos e transtorno do pânico (WASSERMAN et al., 2006; KISHI et al., 2009; KATO et al., 2009; KISHI et al., 2013).

Além dos receptores, polimorfismos no gene do transportador da 5-HT (*SLC6A4*) têm sido associados a transtornos afetivos (GRESSION; CALATI; SERRETTI, 2016; WRAY et al., 2009). Um polimorfismo funcional (5-HTTLPR) no promotor desse gene tem sido relacionado com sono (CARSKADON et al., 2011; HARTMANN et al., 2014; DEUSCHLE et al., 2010). Adicionalmente, dois estudos envolvendo essa variante genética com a preferência diurna foram realizados (OJEDA et al., 2013; BARCLAY et al., 2011). Um dos estudos demonstrou uma associação significativa entre o polimorfismo 5-HTTLPR e os valores do questionário *Composite Scale of Morningness* (CSM) no modelo sobredominante (OJEDA et al., 2013). Já no outro estudo, uma diferença significativa foi observada para a qualidade do sono, porém nenhuma associação foi encontrada para a preferência diurna (BARCLAY et al., 2011).

Polimorfismos no receptor NPYR2, que também apresenta ter um papel importante na modulação dos ritmos através das projeções do TGH (GOLOMBEK et al., 1996; HUHMANN et al., 1996), foram associados com obesidade (HUNT et al., 2011; SIDDIQ et



al., 2007), doença de Huntington (KLOSTER et al., 2014), fumo (SATO et al., 2010) e com o processo de memória icônica (ARNING et al., 2014). Um SNP (rs2234759), localizado no promotor desse gene, tem sido associado com o início da doença de Huntington (KLOSTER et al., 2014). Além disso, os alelos desse SNP demonstraram contribuir diferentemente para a atividade transcricional desse gene, mostrando um possível efeito funcional desse polimorfismo (KLOSTER et al., 2014).

Finalmente, alterações genéticas na subunidade GRIN2B dos receptores NMDA, descritos como os principais envolvidos na via aferente do TRH (COLWELL, 2001; BENDOVIÁ; SLÁDEK; SVOBODOVIÁ et al., 2012), tem sido relacionada a diferentes alterações neurológicas tais como transtorno bipolar, Alzheimer, Schizophrenia, Transtorno Obsessivo Compulsivo e alcoolismo (MARTUCCI et al., 2006; KIM et al., 2006; WEICKERT et al., 2013; KOHLRAUSCH et al., 2016). O SNP rs1805247 (localizado no exon 13) foi significativamente associado com transtorno bipolar (ZHAO et al., 2011) e, com excitabilidade cortical e plasticidade em humanos (MORI et al., 2011), sugerindo que a atividade excitatória do receptor NMDA pode ser modulada por SNPs nos genes que codificam as suas subunidades.

Embora a regulação da ritmicidade circadiana seja mediada por diferentes vias aferentes de sinalização através do envolvimento de uma variedade de neurotransmissores e neuromoduladores, pouco se sabe sobre os mecanismos moleculares envolvidos nesse processo de sincronização do oscilador central. Vários estudos de associação envolvendo fenótipos circadianos têm sido realizados em diferentes populações, entretanto, a maioria deles tem focado apenas em genes circadianos (ALLEBRANDT; ROENNEBERG, 2008). Poucas pesquisas correlacionando genes não circadianos envolvidos nas vias aferentes regulatórias dos ritmos com preferência diurna e hábitos de sono foram realizadas (OJEDA et al., 2013; BARCLAY et al., 2011; KOIKE et al., 2013).

Além disso, os estudos em sua maioria 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 participam ou convergem na mesma via, combinações de diferentes polimorfismos em diferentes genes não circadianos poderiam ter um efeito sinérgico na modulação dos fenótipos circadianos. Assim, o estudo de polimorfismos em genes não circadianos que fazem parte dessas vias pode contribuir para o entendimento da modulação genética desses ritmos.

### 3- HIPÓTESES

- 1- Polimorfismos em genes não circadianos que fazem parte das vias aferentes do NSQ podem estar associados com preferência diurna.

Justificativa: O NSQ é considerado o principal oscilador circadiano e recebe as informações ambientais através de diferentes vias. Essas informações são responsáveis por manter uma relação de fase entre o ritmo circadiano endógeno e os ciclos ambientais. A preferência diurna, por sua vez, é a manifestação comportamental desse ritmo endógeno. Portanto, alterações nessas vias aferentes podem contribuir para essa preferência diurna.

- 2- Interação entre diferentes polimorfismos nas vias aferentes teriam uma contribuição maior para a preferência diurna.

Justificativa: As vias aferentes do NSQ envolvem cascatas de sinalização, as quais são compostas por diferentes transportadores e receptores. Assim, a interação entre combinações genotípicas e/ou alélicas específicas estariam contribuindo para um efeito sinérgico na preferência diurna, e não os polimorfismos individualmente.

- 3- Alterações em genes que fazem parte dessas vias aferentes podem estar correlacionadas com os hábitos de sono.

Justificativa: A regulação do sono envolve dois processos principais: o circadiano e o homeostático. Dessa forma, alterações nos ritmos circadianos podem resultar em hábitos de sono diferenciados.

- 4- A preferência diurna, juntamente com os polimorfismos nas vias aferentes, estariam contribuindo para diferenças nos hábitos de sono.

Justificativa: A preferência diurna tem sido amplamente relacionada com diferenças nos hábitos de sono: tipos matutinos preferem dormir e acordar cedo enquanto que os vespertinos preferem o oposto. Assim, a interação entre a preferência diurna e polimorfismos nas vias aferentes do NSQ estariam relacionados com os hábitos de sono.

#### 4- JUSTIFICATIVA

Poucos estudos relacionando polimorfismos em genes não circadianos envolvidos nas vias aferentes de sincronização rítmica com preferência diurna e hábitos de sono foram realizados. Recentemente, três pesquisas utilizando *GWAS* demonstraram que alguns *loci* de genes não circadianos foram associados com cronotipo. Como esses genes fazem parte de vias de sinalização importantes para o NSQ, o principal gerador dos ritmos circadianos em mamíferos, realizar estudos de associação entre polimorfismos em genes que fazem parte dessas vias e fenótipos circadianos tais como preferência diurna, hábitos de sono e *jetlag* social são de suma importância para o entendimento dos mecanismos envolvidos na modulação genética da ritmicidade circadiana.

## 5- OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo Principal

Realizar um estudo de investigação de moduladores genéticos do ritmo circadiano (preferência diurna) em humanos.

### 5.2 Objetivos Específicos

- 1) Correlacionar a preferência diurna com hábitos de sono e *jetlag* social;
- 2) Determinar as frequências alélicas e genóticas do polimorfismo rs2020933 (A/T íntron 2) no gene *SLC6A4*; 43pb ins/del no gene *SLC6A4* e rs6295 no gene *HTR1A* (-1019C/G);
- 3) Determinar as frequências alélicas e genóticas do polimorfismo rs2234759 (-244A/G) no gene *NPYR2*;
- 4) Determinar as frequências alélicas e genóticas do polimorfismo rs1805247 (4197A/G) no gene da subunidade *GRIN2B* do receptor NMDA;
- 5) Determinar as frequências alélicas e genóticas do polimorfismo rs4753426 (-1193C/T) no gene *MTNR1B*;
- 6) Relacionar essas frequências com preferência diurna, hábitos de sono e *jetlag* social;
- 7) Analisar a interação entre esses polimorfismos e sua associação com preferência diurna, hábitos de sono e *jetlag* social.

## **6- METODOLOGIA**

### **6.1 Escolha dos sujeitos**

Estudantes da Universidade Federal de Alagoas (UFAL) - Campus Arapiraca, A. C. Simões e Sertão; da Universidade Estadual de Alagoas (UNEAL) – Campus Arapiraca e Palmeira dos Índios; Instituto Federal de Alagoas (IFAL) – Campus Palmeira dos Índios; e CESAMA - Centro de Ensino Superior Arcanjo Mikael de Arapiraca, foram convidados a participarem da pesquisa. Após o esclarecimento dos objetivos do estudo e da assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido, os estudantes preencheram um formulário com perguntas relativas a sexo, idade, doença psiquiátrica dentre outras (ANEXO 1).

Além disso, responderam aos questionários para determinação da preferência diurna (ANEXO 2) e dos hábitos de sono (ANEXO 3). Os critérios de exclusão foram: questionários incompletos, idade inferior a 18 e superior a 30 anos, indivíduos diagnosticados com distúrbio psiquiátrico, uso de medicamento para sono ou psicoativo, alunos de pós-graduação, trabalhadores em turno, uso do despertador nos finais de semana e duração do sono maior que 14 horas e menor que 3 horas. A faixa etária foi escolhida para tornar a amostra mais homogênea, visto que a preferência diurna sofre influência da idade. O estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da UFAL com o nº 38930914.0.0000.5013 (ANEXO 4) e realizado no Laboratório de Biologia Molecular e Expressão Gênica da UFAL - Campus Arapiraca.

### **6.2 Determinação da preferência diurna**

Para a determinação da preferência diurna foi aplicado o questionário de Matutividade e Vespertinidade de Horne-Ostberg (MEQ) (HORNE; OSTBERG, 1976). Este questionário é constituído de 19 perguntas de múltipla escolha relacionadas à preferência individual dos horários de dormir e acorde (por exemplo: “a que horas você se sente cansado e com vontade de dormir?”) e, de realizar suas atividades diárias (por exemplo: “se você tiver que fazer duas horas de exercício físico pesado e considerando apenas o seu bem-estar pessoal, qual destes horários você escolheria?”). Além de envolver questões hipotéticas como “suponha que você possa escolher o seu próprio horário de trabalho e que você deva trabalhar cinco horas seguidas por dia. Imagine que seja um serviço interessante e que você ganhe por produção. Qual o horário que você escolheria?”

Os valores do MEQ variam segundo uma escala de pontuação que vai de 16 a 86, com valores mais altos indicando matutividade e mais baixos, vespertividade. O MEQ foi originalmente validado em uma amostra com idade entre 18 e 32 anos (HORNE; OSTBERG, 1976), sendo uma ferramenta amplamente utilizada por demonstrar uma correlação significativa com o período circadiano endógeno ( $\tau$ ) e com ritmos fisiológicos, tais como temperatura, MLT e cortisol (DUFFY et al., 1999). A preferência diurna foi classificada originalmente segundo a distribuição dos valores do questionário em: vespertino extremo (16-30), vespertino moderado (31-41), intermediário (42-58), matutino moderado (59-69) e matutino extremo (70-86).

Baseado na distribuição dos escores do MEQ na população estudada, os sujeitos foram classificados em três grupos (25%-50%-25%) de acordo com o método de gradiente de 5 pontos (CAROJI, 1914): vespertinos (18-43), intermediários (44-58), matutinos (59-77). Para as análises de associação genética, foram selecionados 7% de cada extremo da distribuição dos valores do MEQ, correspondendo aos matutinos e vespertinos mais extremos (ROBILLIARD et al., 2002). Um grupo de intermediários com a mesma quantidade de sujeitos foi incluído no estudo. Esse critério foi adotado para reduzir a variância da amostra e aumentar o poder da genotipagem individualmente (ROBILLIARD et al., 2002).

### **6.3 Determinação dos hábitos do sono e *jetlag* social**

Para a determinação dos hábitos de sono foi aplicado o Questionário de Cronotipo de Munique (MCTQ) (ROENNEBERG; MERROW, 2003). O MCTQ é composto por questões simples referente aos horários individuais de sono, separando os dias de estudo/trabalho dos finais de semana. É uma ferramenta essencialmente utilizada para coletar informações sobre os hábitos de sono incluindo: hora de dormir e de acordar, duração do sono, latência do sono e o ponto médio do sono (ZAVADA et al., 2005). A fase média do sono (MSF) é calculada baseada no ponto médio do sono nos dias livres, corrigida para o débito de sono nos dias de trabalho (MSF<sub>sc</sub>) (WITTMANN et al., 2006).

Além dos hábitos de sono, o MCTQ foi utilizado também para o cálculo do *jetlag* social (JLS) (WITTMANN et al., 2006). JLS é o padrão de restrição/extensão do sono, no qual os sujeitos dormem menos nos dias de semana e tendem a compensar esse débito nos finais de semana; seu cálculo é baseado na diferença do ponto médio do sono entre os finais de semana e os dias de estudo/trabalho (MSF-MSW) (ROENNEBERG et al., 2003; ROENNEBERG et

al., 2012). Assim, o JLS mede a discrepância entre os horários sociais de estudo/trabalho e o biológico. Indivíduos vespertinos podem apresentar *jetlag* social mais pronunciado, pois precisam reajustar seus hábitos temporais internos às demandas sociais (WITTMANN et al., 2006). Adicionalmente, matutinos podem sofrer com o *jetlag* social durante os finais de semana quando eles ficam acordados até tarde da noite sem a habilidade de estender seu sono no dia seguinte.

#### 6.4 Coleta e Extração de DNA

Amostras de células bucais de todos os sujeitos da pesquisa foram coletadas utilizando escova citológica estéril e armazenadas em microtubos de 2mL secos. A extração do DNA genômico foi realizada utilizando protocolo adaptado de NaCl (ABRÃO et al., 2005): Aos microtubos contendo os swabes, foram adicionados 600µL de TES (Tris HCl 10mM pH 8.0; EDTA 1mM; SDS 0,6%) e 7µL de proteinase K, seguido por incubação a 42°C por 2 horas. Após a incubação, retirou-se a escova, adicionou-se 84µL de NaCl saturado (6 M) e centrifugou-se a 14.000 rpm por 1 minuto.

O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e adicionou-se 2 vezes o volume de etanol absoluto, seguido por centrifugação a 14.000 rpm por 1 minuto. O etanol absoluto foi desprezado e adicionou-se 1ml de etanol 70%, seguido por centrifugação a 14.000 rpm por 1 minuto. O etanol 70% foi descartado e o DNA dissolvido em 60µl de TE10:0,1 (Tris HCl 10mM; EDTA 0,1mM), seguido por armazenamento a -20°C. A integridade e quantidade do DNA foram avaliadas através de eletroforese em gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídio (0,5µg/mL) e espectrofotômetro (Eppendorf® AG, Hamburg, Germany), respectivamente. Todas as amostras foram normalizadas para uma concentração final de 4ng/µl.

#### 6.5 Detecção dos Polimorfismos Através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A região contendo o polimorfismo 43pb ins/del no 5-HTTLPR, foi amplificada com iniciadores específicos em reações de PCR utilizando *Go Taq* DNA polimerase (Promega, USA). Cada reação teve um volume final de 12,5µl, contendo 6,25µl *Go Taq Green Maxter Mix*, 3,25µl de água pura, 1µl de cada um dos iniciadores - direto (5'-GGCGTTGCCGCTCTGAATGC-3') e reverso (5'-GAGGGACTGAGCTGGACAACCAC-3'), e 1µL de DNA genômico. Os parâmetros de amplificação incluíram: 95° por 5 minutos;

seguido por 40 ciclos de: 94° por 30 segundos, 55° por 30 segundos e 72° por 40 segundos; e 72° por 10 minutos. Os produtos de amplificação foram visualizados e genotipados em eletroforese em gel de agarose 2.5%, corado com brometo de etídio (0,5µg/mL), sob voltagem de 100v.

Os polimorfismos rs2020933 no gene do transportador da 5-HT (*SLC6A4*); rs2234759 no gene *NPYR2*; rs1805247 no gene *GRIN2B*; rs4753426 no gene *MTNR1B*; e rs6295 no gene *HTR1A*, foram genotipados utilizando o método *Taqman Genotyping Assay* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). As reações de PCR foram realizadas com 5,0µL de 2X TaqMan Genotyping Master Mix, 0,125µL de TaqMan 40X Assay e 4,87µL de DNA normalizado para 4ng/µl, para um volume final de 10µL. Os parâmetros de amplificação consistiram em 95°C por 10 minutos, seguidos por 40 ciclos de 92°C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto usando o equipamento *StepOnePlus™* Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). A discriminação genotípica individual foi feita através do software *StepOnePlus™*, versão 2.3 ao final de cada reação.

## 6.6 Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o pacote estatístico SPSS versão 22.0 para Windows (Statistical Package for the Social Sciences, IBM, Armonk, New York, USA). Para a análise de correlação entre os valores do MEQ e os hábitos de sono foi realizado o teste de correlação de Pearson. Uma análise de variância (ANOVA) foi usada para comparar as diferenças das médias dos hábitos de sono e da preferência diurna entre os genótipos dos polimorfismos estudados e, para as comparações alélicas, foi utilizado o teste t de *student*. Para a verificação do equilíbrio de *Hardy–Weinberg* e comparação das frequências genotípicas e alélicas, o teste do qui-quadrado foi realizado.

Uma análise genética baseada nos modelos de codominância (genótipos), dominância (uma ou duas cópias do alelo associado à variável) e recessividade (duas cópias associadas com a variável) foi realizada para cada um dos SNPs nos grupos matutinos e vespertinos utilizando o *SNPStats* (<http://bioinfo.iconcologia.net/SNPstats>) (SOLÉ et al., 2006). O *SNPStats* também foi utilizado para calcular as frequências das combinações alélicas (“haplotipos”) dos diferentes polimorfismos nos dois grupos de preferência diurna. Os resultados dessas análises foram reportados através da razão de chances (*odds ratios* - OR) e seu intervalo de confiança de 95%.



Além disso, a análise de variância fatorial foi conduzida para investigar a influência dos genótipos e da preferência diurna nos hábitos de sono, sendo o  $\omega^2$  reportado para descrever o tamanho do efeito. Para explicar a natureza dos efeitos e das interações significativas, um teste t de *student* para amostras independentes foi realizado a *posteriori*, sendo o *d* de Cohen reportado para descrever o tamanho dos efeitos. Em todos os testes foi adotado o nível de significância estatística de 0,05.

## 7- RESULTADOS

### 7.1 Análise dos Questionários

Uma amostra de 1223 estudantes universitários (Alagoas, latitude 9°S), 790 mulheres e 433 homens, com idade entre 16 e 59 anos ( $M = 22,5$  e  $DP = \pm 4,05$ ), responderam aos questionários para determinação da preferência diurna e hábitos do sono. Destes participantes: 1) 155 foram excluídos pelo uso de despertador nos finais de semana; 2) 129 foram excluídos por apresentarem idade menor que 18 e maior que 30 anos; 3) 73 foram excluídos por dados incompletos e, 4) 46 foram excluídos por afirmarem ter sido diagnosticados com transtorno de humor. Ao final, 820 sujeitos foram incluídos no estudo (264 homens e 556 mulheres; média de idade = 21,36 e  $DP = \pm 2,74$ ).

Os valores de MEQ variaram entre 18 e 77 ( $M = 50,9$  e  $DP = \pm 10,9$ ) e a distribuição dos cronotipos foram 197 (24,0%) vespertinos, 413 (50,4%) intermediários, e 210 (25,6%) matutinos. Já os valores do MCTQ, apresentaram uma média de 04:03 horas ( $DP = \pm 01:40$  horas). A distribuição das frequências de ambos os questionários demonstrou uma distribuição normal dos dados (Tabela 1 e Figura 12). A preferência diurna foi normalmente distribuída com uma leve tendência para a matutuidade (Figura 12).

Os escores do MEQ não diferiram significativamente entre os gêneros masculino e feminino (mulheres:  $M = 51,27$  e  $DP = \pm 10,87$ , homens:  $M = 50,31$  e  $DP = \pm 11,00$ ;  $t(818) = 1,18$ ,  $p = 0,236$ ) e não houve correlação entre a idade e os valores do MEQ em nossa amostra ( $r = -0,01$ ,  $p = 0,236$ ).

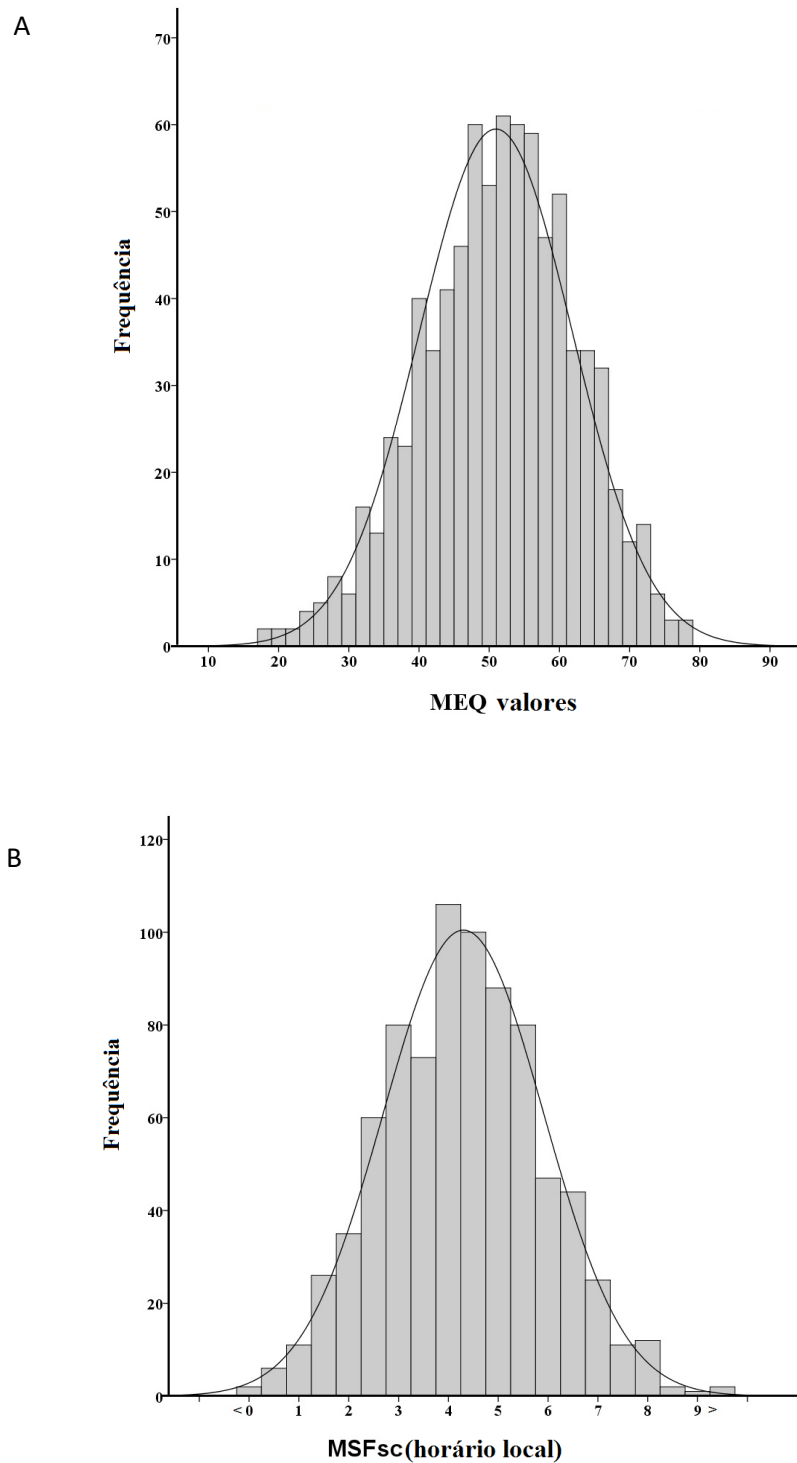
**Tabela 1 – Estatística descritiva para indicar uma distribuição normal**

Variável	Média-Mediana	Skewness	Kurtosis	K-S teste ( $p$ )	Plots	Distribuição
MEQ	0,040	-0,235	-0,161	0,003	simétricos	Normal
MCTQ	0,00	0,341	0,856	0,200	simétricos	Normal

K-S teste: teste de *Kolmogorov – Smirnov*.

Fonte: Autora

**Figura 12 - Distribuição das frequências dos valores dos questionários**



Fonte: Autora

Os valores do MEQ tiveram uma correlação negativa com escores do MCTQ ( $r = -0,611, p < 0,001$ ), com os horários de dormir ( $r = -0,567, p < 0,001$ ), acordar ( $r = -0,384, p < 0,001$ ) e com o ponto médio do sono ( $r = -0,615, p < 0,001$ ) nos dias de estudo/trabalho.

Correlações negativas com MEQ também foram identificadas nos horários de dormir ( $r = -0,615$ ,  $p < 0,001$ ), acordar ( $r = -0,647$ ,  $p < 0,001$ ) e ponto médio do sono ( $r = -0,698$ ,  $p < 0,001$ ) nos finais de semana, além do *jetlag* social ( $r = -0,328$ ,  $p < 0,001$ ), demonstrando que pessoas vespertinas dormem e acordam mais tarde que as matutinas nos dias de estudo/trabalho e também nos finais de semana, como descrito em outros estudos.

Adicionalmente, os vespertinos tiveram um valor de *jetlag* social maior que os matutinos. Uma correlação positiva foi encontrada entre os valores do MEQ e a duração do sono nos dias de estudo/trabalho ( $r = 0,174$ ,  $p < 0,001$ ), porém nenhuma correlação foi encontrada com a duração do sono nos finais de semana ( $r = -0,027$ ,  $p = 0,217$ ), sugerindo que indivíduos matutinos dormem mais durante a semana e que ambos os cronotipos apresentam a mesma duração de sono nos finais de semana.

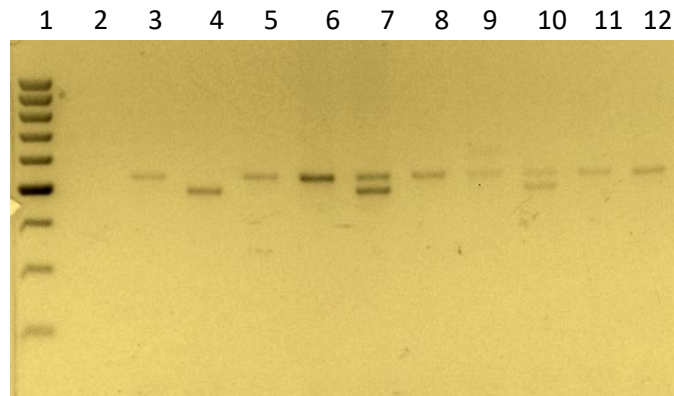
## **7.2 Análise de associação entre as frequências genotípicas e alélicas com preferência diurna, hábitos do sono e *jetlag* social.**

As frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos 5-HTTLPR do gene *SLC6A4*, rs2020933 do gene *SLC6A4*, rs2234759 do gene *NPYR2*, rs1805247 no gene da subunidade GRIN2B, rs4753426 no gene *MTNR2* e rs6295 do gene *HTR1A* nos 7% mais extremos dos indivíduos matutinos e vespertinos, juntamente com a mesma quantidade de intermediário (56 de cada grupo, 168 no total), foram testadas para associação com a preferência diurna e os hábitos do sono.

### **7.2.1 Polimorfismos do transportador (ins/del 5-HTTLPR) e rs2020933e do receptor (rs6295) da 5-HT.**

A sequência contendo o polimorfismo ins/del5-HTTLPR foi amplificada com iniciadores específicos produzindo fragmentos de 484 e 528pb (Figura 13). Como esse polimorfismo trata-se de uma inserção/deleção de 43pb, o mesmo pode ser genotipado apenas por PCR. Foi observada uma frequência de 56,8% para o alelo longo (L) e de 43,2% para o alelo curto (S). Contudo, a distribuição dos genótipos apresentou estar em desequilíbrio de *Hardy-Weinberg* na amostra analisada ( $\chi^2(1) = 14,23$ ,  $p < 0,05$ ; 167 sujeitos - uma amostra falhou na amplificação devido a degradação do DNA).

**Figura 13 - Fotografia do gel de agarose 2,5% para a detecção do polimorfismo 5HTTLPR (43pb ins/Del) no gene SLC6A4**



Genotipagem do polimorfismo 5HTTLPR (43pb ins/del) no gene *SLC6A4*. 1-Marcador de peso molecular 100pb; amostra 2 - controle negativo, amostras 3,5,6,8,9,11 e 12 - homozigotas L/L; amostra 4 - homozigota S/S e amostra 7 e 10 - heterozigota L/S. Fonte: Autora.

As discriminações genóticas resultantes da *TaqMan SNP Genotyping Assay* para os polimorfismos rs2020933 e rs6295 estão representadas nas figuras 14 e 15 (a e b). Ambos os SNPs demonstraram estar em equilíbrio de *Hardy-Weinberg* (rs2020933:  $\chi^2(1) = 0,009$ ,  $p = 0,92$ ; rs6295:  $\chi^2(1) = 1,05$ ,  $p = 0,30$ ). O polimorfismo rs2020933 apresentou uma frequência de 86,3% para o alelo A e 13,7% para o alelo T; enquanto que o SNP rs6295 apresentou uma frequência de 53,3% para o alelo G e 46,7% para o alelo C.

**Figura 14 - Distribuição genotípica e curva de amplificação do polimorfismo rs2020933 do gene SLC6A4**

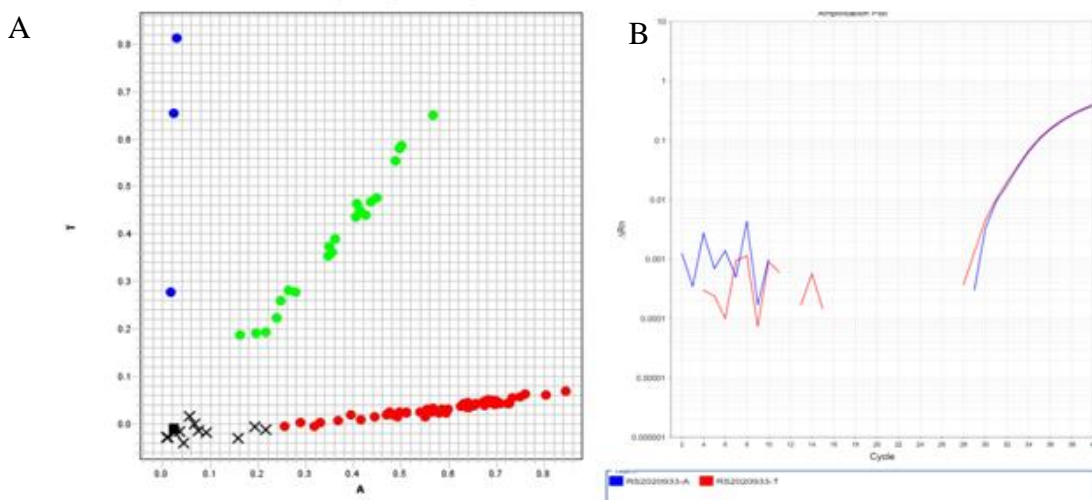


Gráfico gerado ao final da reação de *TaqMan SNP Genotyping Assay* mostrando: (A) - distribuição genotípica do polimorfismo rs2020933; (B) - curva de amplificação da PCR para um heterozigoto A/T. Os círculos azuis e vermelhos representam os homozigotos para os diferentes alelos, e os verdes, os heterozigotos. Os X representam as amostras indeterminadas. Fonte: autora

**Figura 15 - Distribuição genotípica e curva de amplificação do polimorfismo rs6295 do gene HTR1A**

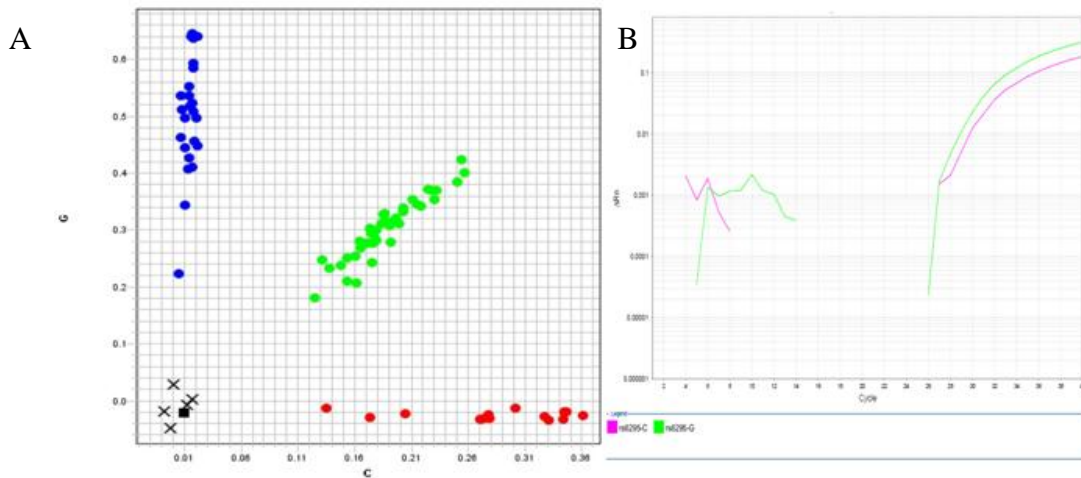


Gráfico gerado ao final da reação de *TaqMan SNP Genotyping Assay* mostrando (A) distribuição genotípica do polimorfismo rs6295. (B) – curva de amplificação de da PCR para um heterozigoto A/T. Os círculos azuis e vermelhos representam os homozigotos para os diferentes alelos, e os verdes, os heterozigotos. Os X representam as amostras indeterminadas. Fonte: autora

A Tabelas 2 mostra as frequências genotípicas dos polimorfismos 5-HTTLPR, rs2020933 e rs6295 nos grupos de matutinos, intermediários e vespertinos. Nenhuma diferença significativa foi observada entre os matutinos, intermediários e vespertinos quanto às frequências dos genótipos dos três polimorfismos (5-HTTLPR-  $\chi^2(4) = 2,49$ ,  $p = 0,646$ ; rs2020933-  $\chi^2(4) = 0,46$ ,  $p = 0,977$ ; rs6295 -  $\chi^2(4) = 5,30$ ,  $p = 0,257$ ).

**Tabela 2 - Distribuição das frequências genotípicas para os polimorfismos 5-HTTLPR (n=167), rs2020933 (n=168) e rs6295 (n=168) nos grupos matutinos, intermediários e vespertinos**

Polimorfismo	Preferência diurna	Genótipos						$\chi^2$	gl	p
		L/L	%	L/S	%	S/S	%			
5-HTTLPR	Vespertino	23	41,9	20	36,3	12	21,8	2,49	4	0,646
	Intermediário	25	44,6	17	30,4	14	25			
	Matutino	18	32,2	21	37,5	17	30,3			
	Total	66	39,6	58	34,7	43	25,7			
rs2020933	Vespertino	43	76,8	12	21,4	1	1,8	0,46	4	0,977
	Intermediário	40	71,4	15	26,8	1	1,8			
	Matutino	42	75,0	13	23,2	1	1,8			
	Total	125	74,4	40	23,8	3	1,8			
rs6295	Vespertino	13	23,3	23	41,0	20	35,7	5,30	4	0,257
	Intermediário	9	16,0	29	51,8	18	32,8			
	Matutino	18	32,2	25	44,6	13	23,2			
	Total	40	23,8	77	45,8	51	30,4			

gl= graus de liberdade. Fonte: Autora

Em relação as frequências alélicas, nenhuma associação foi encontrada com preferência diurna nos três polimorfismos da via da serotonina (tabela 3) (5-HTTLPR:  $\chi^2(2) = 2,46, p = 0,29$ ; rs2020933:  $\chi^2(2) = 0,32, p = 0,83$ ; rs6295:  $\chi^2(2) = 4,11, p = 0,12$ ). Além disso, às médias dos valores do MEQ, não se diferenciaram entre os três grupos genotípicos (5-HTTLPR:  $F(2,164) = 0,38, p = 0,68$ ; rs2020933:  $F(2,165) = 0,12, p = 0,88$ ; rs6295:  $F(2,165) = 1,11, p = 0,33$ ) e alélicos (5-HTTLPR:  $t(332) = 0,99, p = 0,32$ ; rs2020933:  $t(334) = -0,48, p = 0,62$ ; rs6295:  $t(334) = 1,54, p = 0,12$ ) dos três polimorfismos.

**Tabela 3 - Distribuição das frequências alélicas para os polimorfismos 5-HTTLPR (n = 167), rs2020933 (n = 168) e rs6295 (n = 168) nos grupos matutinos, intermediários e vespertinos**

Polimorfismo	Preferência diurna	Alelos						
		L	%	S	%	$\chi^2$	gl	p
5-HTTLPR	Vespertino	66	60,0	44	40,0	2,46	2	0,291
	Intermediário	67	59,8	45	40,2			
	Matutino	57	50,9	55	49,2			
	Total	190	56,8	144	43,2			
rs2020933	Vespertino	98	87,5	14	12,5	0,32	2	0,838
	Intermediário	95	84,8	17	15,2			
	Matutino	97	86,6	15	13,4			
	Total	290	86,3	46	13,7			
rs6295	Vespertino	49	43,7	63	56,3	4,11	2	0,128
	Intermediário	47	42,0	65	58,0			
	Matutino	61	54,4	51	45,6			
	Total	157	46,7	179	53,3			

gl= graus de liberdade. Fonte: autora

A análise de variância para a diferença entre as médias dos hábitos de sono (horário de dormir/acordar, duração do sono e ponto médio do sono) - durante os dias de estudo e finais de semana - e do *jetlag* social nas frequências genotípicas e alélicas, demonstrou que, para o polimorfismo 5-HTTLPR do transportador da serotonina, nenhum efeito significativo foi observado para os genótipos (tabela 4) e seus alelos (tabela 5). Adicionalmente, as médias dos hábitos de sono e *jetlag* não se diferenciaram em relação as frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo rs6295, localizado no gene do receptor da serotonina 1A (tabelas 6 e 7, respectivamente).

**Tabela 4 - Comparação das médias dos hábitos de sono e jetlag social de acordo com os grupos genotípicos do polimorfismo 5HTTLPR (n = 167)**

	Hábitos do sono	Genótip	Média (h:min)	DP (h:min)	F(2,165)	p
<b>Dias de Estudo</b>	HD	S/S	00:05	1:50	2,37	0,097
		L/S	00:23	1:31		
		L/L	00:18	1:53		
	HA	S/S	6:30	1:31	1,35	0,261
		L/S	6:29.	1:39		
		L/L	6:54	1:34		
	DS	S/S	6:28	1:30	0,88	0,415
		L/S	6:51	1:19		
		L/L	6:35	1:36		
PMS	S/S	3:15	1:30	2,15	0,119	
	L/S	3:00	1:25			
	L/L	3:36	1:31			
<b>Finais de Semana</b>	HD	S/S	00:24	2:19	0,95	0,388
		L/S	00:26	2:05		
		L/L	00:55	2:20		
	HA	S/S	8:34	2:18	0,46	0,627
		L/S	8:47	2:21		
		L/L	9:01	2:23		
	DS	S/S	8:06	1:00	0,57	0,567
		L/S	8:20	1:28		
		L/L	8:04	1:24		
PMS	S/S	4:30	2:15	0,90	0,403	
	L/S	4:36	2:06			
	L/L	4:57	2:15			
<b>Jetlag social</b>		S/S	1:15	1:17	0,62	0,537
		L/S	1:33	1:36		
		L/L	1:21	1:28		

HD = horário de ir dormir; HA= horário de acordar; DS= duração do sono; PMS= ponto médio do sono; DP = desvio padrão. Fonte: Autora.

**Tabela 5 - Comparação das médias dos hábitos de sono e jetlag social de acordo com os grupos alélicos do polimorfismo 5HTTLPR (n = 167)**

	Hábitos do sono	Alelo	Média (h:min)	DP (h:min)	t	p
<b>Dias de Estudo</b>	HD	S	23:30	103.21	1,28	0,201
		L	00:05	108.25		
	HA	S	6:29	1:33	1,61	0,108
		L	6:46	1:36		
	DS	S	6:36	1:28	0,27	0,783
		L	6:37	1:32		
PMS	S	3:10	1:28	1,56	0,119	
	L	3:28	1:31			

Continua



Continuação

<b>Finais de Semana</b>	HD	S	00:25	2:13.	1,41	0,156
		L	00:46	2:15		
	HA	S	8:40	2:18	1,10	0,270
		L	8:57	2:21		
	DS	S	8:13	1:13	0,36	0,716
		L	8:10	1:25		
PMS	S	4:32	2:10	1,28	0,199	
	L	4:51	2:12			
<b>Jetlag social</b>	S	1:22	1:25	0,32	0,745	
	L	1:25	1:30			

HD = horário de ir dormir; HA= horário de acordar; DS= duração do sono; PMS= ponto médio do sono; DP = desvio padrão. Fonte: Autora.

**Tabela 6 - Comparação das médias dos hábitos de sono e jetlag social de acordo com os grupos alélicos do polimorfismo 5HTTLPR (n = 167)**

	Hábitos do sono	Genótipo	Média (h:min)	DP (h:min)	F(2,165)	p
<b>Dias de Estudo</b>	HD	C/C	23:46	1:40	0,47	0,621
		C/G	00:00	1:38		
		G/G	00:07	2:00		
	HA	C/C	6:38	1:45	0,00	0,999
		C/G	6:40	1:32		
		G/G	6:40	1:33		
	DS	C/C	6:51	1:35	0,64	0,526
		C/G	6:37	1:31		
		G/G	6:30	1:24		
PMS	C/C	3:12	1:33	0,18	0,829	
	C/G	3:19	1:22			
	G/G	3:24	1:38			
<b>Finais de Semana</b>	HD	C/C	0:22	2:25	0,92	0,398
		C/G	0:32	2:11		
		G/G	0:58	2:13		
	HA	C/C	8:46	2:45	0,31	0,734
		C/G	8:44	2:23		
		G/G	9:03	1:47		
	DS	C/C	8:23	1:18	0,69	0,503
		C/G	8:11	1:30		
		G/G	8:00	1:06		
PMS	C/C	4:34	2:30	0,63	0,533	
	C/G	4:38	2:09			
	G/G	5:00	2:00			
<b>Jetlag social</b>	C/C	1:21	1:46	0,76	0,465	
	C/G	1:18	1:33			
	G/G	1:36	1:00			

HD = horário de ir dormir; HA= horário de acordar; DS= duração do sono; PMS= ponto médio do sono; DP = desvio padrão. Fonte: Autora.

**Tabela 7 - Comparação das médias dos hábitos de sono e jetlag social de acordo com os alelos do polimorfismo rs6295 (n = 168)**

	Hábitos do sono	Alelo	Média (h:min)	DP (h:min)	<i>t</i>	<i>p</i>
<b>Dias de Estudo</b>	HD	C	23:57	1:41	0,96	0,336
		G	0:04	1:49		
	HA	C	6:38	1:38	0,12	0,900
		G	6:40	1:32		
	DS	C	6:44	1:30	1,04	0,297
		G	6:34	1:27		
PMS	C	3:15	1:27	0,65	0,511	
	G	3:22	1:30			
<b>Finais de Semana</b>	HD	C	0:29	2:16	1,14	0,252
		G	0:46	2:13		
	HA	C	8:46	2:33	0,51	0,605
		G	8:54	2:09		
	DS	C	8:17	1:24	1,09	0,276
		G	8:07	1:16		
	PMS	C	4:37	2:19	0,88	0,376
		G	4:50	2:00		
	<b>Jetlag social</b>	C	1:27	1:30	0,64	0,524
		G	1:06	1:00		

HD = horário de ir dormir; HA= horário de acordar; DS= duração do sono; PMS= ponto médio do sono; DP = desvio padrão. Fonte: Autora.

Entretanto, o polimorfismo rs2020933, localizado no transportador da serotonina, demonstrou um efeito significativo do genótipo desse SNP no horário de acordar nos dias de estudo/trabalho ( $F(2,165) = 3,13$ ,  $p = 0,46$ ,  $\omega = 0,16$ ). Um teste *post hoc* (Fisher/LSD) confirmou que existe uma diferença no horário de acordar entre os indivíduos com genótipo A/A ( $M = 6:32$  e  $DP = 1:28$ , 95% IC [6:17 – 6:46] horas) e T/T ( $M = 8:20$  e  $DP = 4:38$ , 95% IC [-2::52 – 20:20] horas;  $p = 0,021$ ,  $d = 0,70$ ) (tabela 8).

Quanto às frequências alélicas desse polimorfismo, o resultado do teste *t* de *student* mostrou que indivíduos carregando o alelo T diferiram significativamente na duração do sono nos dias de estudo/trabalho ( $M = 7:00$  e  $DP = 1:36$ , 95% IC [6:25 – 6:45] horas) comparados com aqueles que carregam alelo A ( $M = 6:34$  e  $DP = 1:34$ , 95% IC [6:24 – 7:45] horas;  $t(334) = -2,16$ ,  $p = 0,031$ ,  $d = 0,33$ ). Esse resultado indica que portadores do alelo T dormem mais durante os dias de estudo/trabalho que aqueles com o alelo A. Contudo, os grupos genotípicos A/A e alélico T apresentam uma variabilidade nos horários de acordar, demonstrados pelos intervalos de confiança de ambos. Nenhuma diferença de média para os dois alelos do SNP rs2020933 foi encontrada para as demais variáveis dos hábitos de sono e *jetlag* social (tabela 9).

**Tabela 8 - Comparação das médias dos hábitos de sono e jetlag social de acordo com os grupos genotípicos do polimorfismo rs2020933 (n = 168)**

	Hábitos do sono	Genótipo	Média (h:min)	DP(h:min)	F(2,165)	p
<b>Dias de Estudo</b>	HD	A/A	0:00	1:36	0,12	0,881
		A/T	23:55	2:11		
		T/T	00:26	2:40		
	HA	A/A	6:32	1:22	3,13	0,046
		A/T	6:51	1:50		
		T/T	8:20	4:38		
	DS	A/A	6:31	1:28	2,78	0,065
		A/T	6:55	1:25		
		T/T	8:13	2:36		
PMS	A/A	3:16	1:17	1,10	0,332	
	A/T	3:23	1:52			
	T/T	4:33	3:33			
<b>Finais de Semana</b>	HD	A/A	0:44	2:05	1,22	0,295
		A/T	0:14	2:30		
		T/T	1:53	4:43		
	HA	A/A	8:52	2:25	0,59	0,552
		A/T	8:40	1:53		
		T/T	10:10	5:00		
	DS	A/A	8:23	1:22	0,74	0,475
		A/T	8:25	1:15		
		T/T	8:16	1:06		
	PMS	A/A	4:48	2:09	0,92	0,400
		A/T	4:26	2:07		
		T/T	6:00	4:53		
<b>Jetlag social</b>		A/A	1:31	1:35	1,54	0,217
		A/T	1:00	1:00		
		T/T	1:28	1:19		

HD = horário de ir dormir; HA= horário de acordar; DS= duração do sono; PMS= ponto médio do sono; DP=desvio padrão. Fonte: Autora.

**Tabela 9 - Comparação das médias dos hábitos de sono e jetlag social de acordo com os grupos alélicos do polimorfismo rs2020933 (n =168)**

	Hábitos do sono	Alelo	Média (h:min)	DP (h:min)	t	p
<b>Dias de Estudo</b>	HD	A	0:00	1:40	0,00	0,998
		T	0:19	2:11		
	HA	A	6:35	1:26	1,46	0,149
		T	7:05	2:16		
	DS	A	6:34	1:34	2,16	0,031
		T	7:00	1:36		
	PMS	A	3:17	1:22	0,78	0,437
		T	3:32	2:00		

Continua

Continuação

Finais de Semana	HD	A	0:40	2:09	0,50	0,614
		T	0:27	2:47		
	HA	A	8:50	2:21	0,03	0,970
		T	8:51	1:22		
	DS	A	8:10	1:21	1,11	0,266
		T	8:24	1:12		
	PMS	A	4:45	2:09	0,30	0,763
		T	4:39	2:30		
<b>Jetlag social</b>		A	1:27	1:32	1,50	0,133
		T	1:06	1:00		

HD = horário de ir dormir; HA= horário de acordar; DS= duração do sono; PMS= ponto médio do sono; DP=desvio padrão. Fonte: Autora.

### 7.2.2 Interação entre os polimorfismos do transportador e receptor de 5-HT com preferência diurna

Uma ANOVA fatorial foi realizada para avaliar o efeito da interação entre os genótipos dos polimorfismos 5-HTTLPR, rs2020933 e rs6295 na preferência diurna. A análise revelou que não houve efeito principal dos polimorfismos na preferência diurna (tabela 10). Além disso, os polimorfismos não apresentaram nenhum efeito de interação na preferência diurna ( $F(11, 146) = 1,76, p = 0,065, \omega^2 = 1,19$ ).

**Tabela 10 - Análise de variância fatorial para a preferência diurna em função dos genótipos dos polimorfismos 5-HTTLPR, rs2020933 e rs6295 (n = 167)**

Fonte	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F	p	$\omega^2$
<b>Modelo corrigido</b>	9089,03	20	454,45	1,64	0,049	0,07
<b>5-HTTLPR</b>	1168,67	2	584,33	2,12	0,124	0,43
<b>rs2020933</b>	113,95	2	56,98	0,20	0,813	0,30
<b>rs6295</b>	100,45	2	50,22	0,18	0,834	0,31
<b>5-HTTLPR * rs2020933</b>	1200,57	3	400,19	1,45	0,230	0,12
<b>5-HTTLPR * rs2020933 * rs6295</b>	5346,06	11	486,00	1,76	0,065	1,19
<b>Total</b>	468020,00	167				

Fonte: Autora

Quando as análises foram realizadas incluindo apenas os grupos de matutinos e vespertinos extremos (n= 111), foi observado um efeito principal apenas para o SNP 5-HTTLPR (tabela 11). Um efeito de interação 5-HTTLPR\*rs2020933\*rs6295 (três

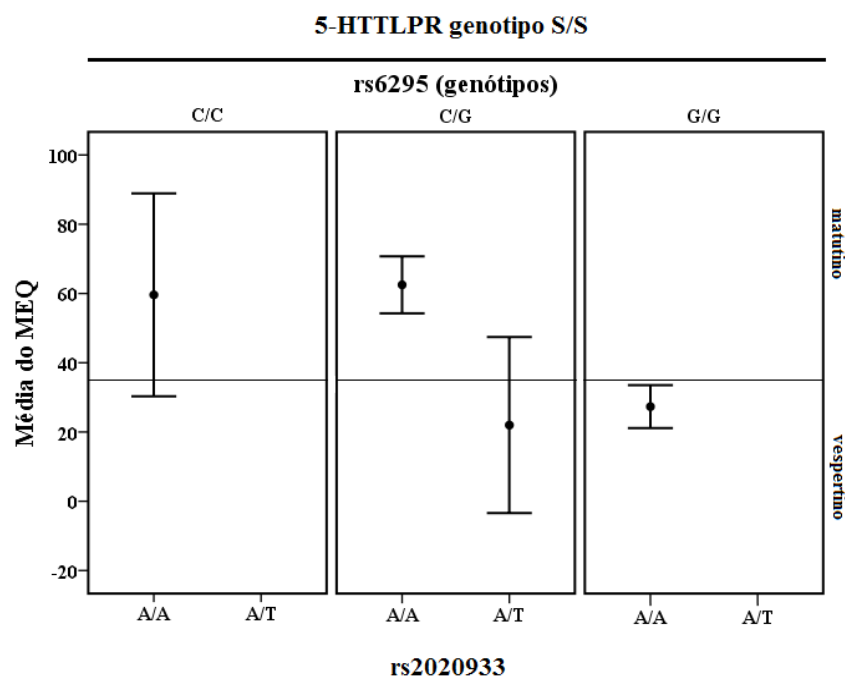
polimorfismos da via da 5-HT) foi encontrado para a preferência diurna ( $F(11, 93) = 2,12, p = 0,041, \omega^2 = 0,29$ ). O resultado da análise de variância demonstrou que indivíduos com a combinação S/S; A/A; C/G ( $M = 62,50$  e  $DP = 15,47$ ) possuem uma média maior dos valores do MEQ, ou seja, são matutinos, quando comparados com os S/S; A/T; C/G ( $M = 22,0$  e  $DP = 2,82$ ) e S/S; A/A; G/G ( $M = 27,33$  e  $DP = 5,92$ ) ( $F(2, 24) = 11,16, p < 0,001, \omega^2 = 0,42$ ) (figura 16), indicando que a adição de um alelo T (do SNP 5-HTTLPR) ou dois alelos G (do SNP rs6295) predispõem a vespertinidade na amostra estudada.

**Tabela 11 - Análise de variância fatorial para a preferência diurna em função dos genótipos dos polimorfismos 5-HTTLPR, rs2020933 e rs6295 (n= 111)**

Fonte	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F	P	$\omega^2$
Modelo corrigido	12999,91	17	764,70	1,96	0,022	0,26
5-HTTLPR	3049,97	2	1524,99	3,91	0,023	0,76
rs2020933	109,20	2	54,60	0,14	0,869	0,22
rs6295	1283,14	2	641,57	1,64	0,198	0,16
5-HTTLPR * rs2020933	3484,37	3	1161,46	2,98	0,035	0,04
5-HTTLPR * rs2020933 * rs6295	6615,56	8	826,94	2,12	0,041	0,29
Total	322847,00	111				

Fonte: Autora

**Figura 16 - Diferença entre os médias dos valores do MEQ para as combinações genóticas dos três polimorfismos 5-HTTLPR, rs2020933 e rs6295 da via da 5-HT**



Barras: IC de 95%. Fonte: Autora

Em relação aos alelos, nenhum efeito principal ou de interação foi encontrado para os polimorfismos 5-HTTLPR, rs2020933 e rs6295 com a preferência diurna na amostra total ( $n = 167$ ) (tabelas 12). Adicionalmente, não houve efeito principal ou de interação para os grupos de matutinos e vespertinos extremos ( $n = 111$ ) (tabela 13). No entanto, a análise das frequências dessas combinações entres matutinos e vespertinos, mostrou que as combinações S-A-C (OR= 0,24, 95%IC [0,09 - 0,60],  $p = 0,003$ ) e L-T-G (OR = 0,13, 95% IC [0,02 - 0,71],  $p = 0,020$ ) foram mais frequentes nos matutinos comparado com os vespertinos que (tabela 14).

**Tabela 12 - Análise de variância fatorial para a preferência diurna em função dos alelos dos polimorfismos 5-HTTLPR, rs2020933 e rs6295 ( $n = 167$ )**

Fonte	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	$F_{(326)}$	$P$	$\omega^2$
Modelo corrigido	3230,76 <sup>a</sup>	7	461,53	1,57	0,141	0,03
5-HTTLPR	5,14	1	5,14	0,018	0,895	0,51
rs2020933	42,02	1	42,02	0,144	0,705	0,44
rs6295	35,97	1	35,97	0,123	0,726	0,45
5-HTTLPR *rs2020933	62,20	1	62,20	0,213	0,645	0,05
5-HTTLPR * rs2020933 * rs6295	1578,55	3	526,18	1,78	0,147	0,41
<b>Total</b>	<b>936040,0</b>	<b>334</b>				

Fonte: Autora

**Tabela 13 - Análise de variância fatorial para a preferência diurna em função dos alelos dos polimorfismos 5-HTTLPR, rs2020933 e rs6295 ( $n = 111$ )**

Fonte	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	$F_{(326)}$	$P$	$\omega^2$
Modelo corrigido	4804,55 <sup>a</sup>	6	800,75	1,83	0,093	0,04
5-HTTLPR	86,27	1	86,27	0,19	0,657	0,23
rs2020933	126,41	1	126,41	0,29	0,591	0,29
rs6295	0,012	1	0,012	0,00	0,996	0,00
5-HTTLPR * rs2020933	475,75	1	475,75	1,09	0,297	0,00
5-HTTLPR * rs2020933 * rs6295	2335,57	2	1167,78	2,68	0,071	0,49
<b>Total</b>	<b>645694,00</b>	<b>222</b>				

Fonte: Autora

**Tabela 14 – Frequência das diferentes combinações alélicas (“haplótipos”) para os polimorfismos 5-HTTLPR, rs2020933 e rs6295 nos grupos matutinos e vespertinos (n = 111)**

Nº C	5HTTLPR	rs2020933	rs6295	FT	Vespertinos	Matutinos	OR (95% IC)	p
1	L	A	G	0,22	0,15	0,27	1	---
2	L	A	C	0,21	0,22	0,23	0,46 (0,17 - 1,24)	0,130
3	S	A	C	0,21	0,12	0,27	<b>0,24 (0,09 - 0,60)</b>	0,003
4	S	A	G	0,21	0,25	0,20	0,70 (0,26 - 1,89)	0,480
5	L	T	G	0,06	0,04	0,08	0,13 (0,02 - 0,71)	0,020
6	L	T	C	0,05	0,06	0,03	1,04 (0,24 - 4,49)	0,960
7	S	T	G	0,01	0	0,01	2,49 (0,18 - 35,31)	0,500

Nº C – número de combinações. FT – Frequência total: Fonte: autora

### 7.2.3 Interação entre os polimorfismos do transportador e receptor de 5-HT com hábitos de sono e *jetlag* social

As análises envolvendo os hábitos de sono e *jetlag* social demonstraram que, para o polimorfismo 5-HTTLPR, houve um efeito principal significativo da preferência diurna nos hábitos de sono (exceto duração do sono nos finais de semana) e no *jetlag* social nos grupos genotípicos e alélicos (tabelas 15 e 16). Um efeito principal dos genótipos foi encontrado para o horário de dormir nos dias de estudo (tabela 15), porém nenhum efeito principal foi observado em relação aos alelos (tabela 16). O efeito da interação ‘preferência diurna\*5-HTTLPR<sub>(genótipos)</sub>’ foi visto apenas no horário de ir dormir nos dias de estudo ( $F(4, 158) = 3,90, p = 0,005, \omega^2 = 0,01$ ).

O resultado do teste *post hoc* demonstrou que indivíduos vespertinos com o genótipo L/S vão dormir mais cedo ( $M = 00:40$  e  $DP = 1:18$  horas) comparados com aqueles que possuem genótipos L/L ( $M = 2:13$  e  $DP = 1:23$  horas) e S/S ( $M = 2:20$  e  $DP = 1:20$ ) (figura 17). Nenhum efeito de interação foi encontrado com relação aos alelos nos hábitos de sono e *jetlag* social (tabela 16).

**Tabela 15 - Resultado da ANOVA fatorial para os hábitos de sono e jetlag social em função da preferência diurna e genótipos do polimorfismo 5-HTTLPR (n= 167)**

Medidas		Efeito da Preferência diurna			Efeito do Genótipo (5-HTTLPR)			Interação		
		<i>F</i> (158)	<i>p</i>	$\omega^2$	<i>F</i> (158)	<i>p</i>	$\omega^2$	<i>F</i> (158)	<i>p</i>	$\omega^2$
<b>Dias de estudo</b>	HD	113,9	<0,001	0,59	4,25	0,016	0,05	3,90	0,005	0,01
	HA	27,3	<0,001	0,25	0,93	0,394	0,01	0,69	0,597	0,01
	DS	11,71	<0,001	0,12	1,25	0,287	0,01	1,68	0,157	0,04
	PMS	85,8	<0,001	0,52	2,79	0,064	0,03	2,19	0,072	0,05
<b>Finais de semana</b>	HD	119,2	<0,001	0,60	,619	0,540	0,00	1,13	0,343	0,02
	HA	102,05	<0,001	0,56	0,02	0,980	----	0,52	0,721	0,01
	DS	0,011	0,990	----	0,46	0,628	0,00	0,88	0,473	0,02
	PMS	140,01	<0,001	0,63	0,26	0,767	0,00	0,83	0,508	0,02
<b>Jetlag Social</b>		22,34	<0,001	0,22	0,63	0,531	0,00	1,06	0,378	0,02

HD = horário de ir dormir; HA- horário de acordar; DS= duração do sono; PMS= ponto médio do sono;  $\omega^2$ =ômega ao quadrado. Fonte: Autora.

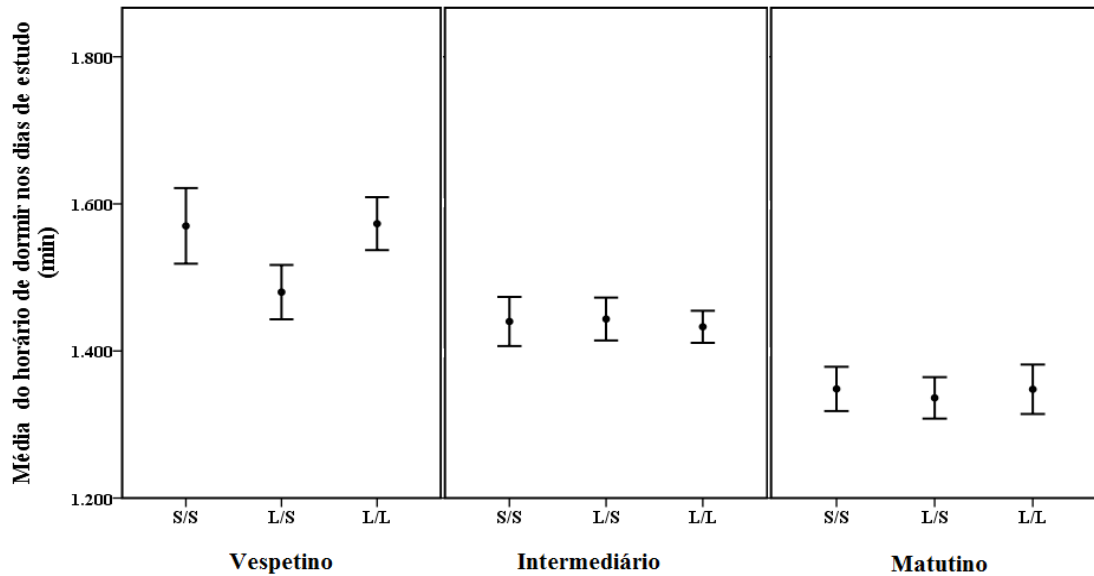
**Tabela 16 - Resultado da ANOVA fatorial para os hábitos de sono e jetlag social em função da preferência diurna e alelos do polimorfismo 5-HTTLPR (n = 167)**

Medidas		Efeito da Preferência diurna			Efeito dos Alelos (5-HTTLPR)			Interação		
		<i>F</i> (330)	<i>p</i>	$\omega^2$	<i>F</i> (330)	<i>p</i>	$\omega^2$	<i>F</i> (330)	<i>p</i>	$\omega^2$
<b>Dias de estudo</b>	HD	202,93	<0,001	0,55	0,172	0,679	0,00	0,667	0,514	0,00
	HA	55,73	<0,001	0,25	1,14	0,285	0,00	0,354	0,702	0,00
	DS	22,034	<0,001	0,11	0,625	0,430	0,00	0,625	0,430	0,00
	PMS	162,08	<0,001	0,49	0,732	0,393	0,00	0,040	0,960	----
<b>Finais de semana</b>	HD	238,36	<0,001	0,59	0,383	0,536	0,00	0,065	0,937	----
	HA	210,40	<0,001	0,56	0,023	0,881	----	0,389	0,678	0,00
	DS	0,053	0,949	----	0,158	0,691	----	0,550	0,577	0,00
	PMS	284,05	<0,001	0,63	0,137	0,711	----	0,155	0,857	0,00
<b>Jetlag Social</b>		45,451	<0,001	0,21	0,102	0,750	----	0,215	0,806	0,00

HD = horário de ir dormir; HA- horário de acordar; DS= duração do sono; PMS= ponto médio do sono;  $\omega^2$ =ômega ao quadrado. Fonte: Autora.



**Figura 17 - Média do horário de ir dormir dos três genótipos do polimorfismo 5-HTTLPR nos grupos vespertinos, intermediários e matutinos (n= 167)**



Barras: IC de 95%. Fonte: Autora

No polimorfismo rs2020933, a preferência diurna apresentou um efeito principal para os hábitos do sono (exceto duração do sono nos dias de estudo e finais de semana - genótipos e, duração do sono nos finais de semana para - alelos) e *jetlag* social (tabelas 17 e 18). Os genótipos do polimorfismo apresentaram um efeito principal apenas para o horário de acordar nos dias de estudo (tabela 17), enquanto que os alelos demonstraram um efeito principal para o horário de acordar e duração do sono nos dias de estudo (tabela 18).

**Tabela 17 - Resultado da ANOVA fatorial para os hábitos de sono e jetlag social em função da preferência diurna e genótipos do polimorfismo rs2020933 (n = 168)**

Medidas		Efeito da Preferência diurna			Efeito do Genótipo (rs2020933)			Interação		
		F(158)	p	$\omega^2$	F(158)	p	$\omega^2$	F(158)	p	$\omega^2$
Dias de estudo	HD	28,50	<0,001	0,02	0,22	0,802	0,00	4,50	0,002	0,01
	HA	25,17	<0,001	0,01	4,88	0,009	0,05	5,60	<0,001	0,01
	DS	1,79	0,170	0,02	3,01	0,052	0,03	2,84	0,026	0,01
	PMS	38,57	<0,001	0,02	2,74	0,067	0,03	6,15	0,000	0,01
Finais de semana	HD	41,13	<0,001	0,04	2,44	0,090	0,03	3,57	0,008	0,02
	HA	32,22	<0,001	0,01	1,24	0,292	0,01	2,13	0,079	0,01
	DS	0,44	<0,644	0,00	0,62	0,535	0,00	2,46	0,047	0,02
	PMS	46,02	<0,001	0,05	2,11	0,124	0,02	2,83	0,026	0,01
<b>Jetlag Social</b>		3.85	0,023	0,04	1,69	0,186	0,02	0,73	0,570	0,01

HD = horário de ir dormir; HA- horário de acordar; DS= duração do sono; PMS= ponto médio do sono;  $\omega^2$ =ômega ao quadrado. Fonte: Autora.

**Tabela 18 - Resultado da ANOVA fatorial para os hábitos de sono e jetlag social em função da preferência diurna e os alelos do polimorfismo rs2020933 (n = 168).**

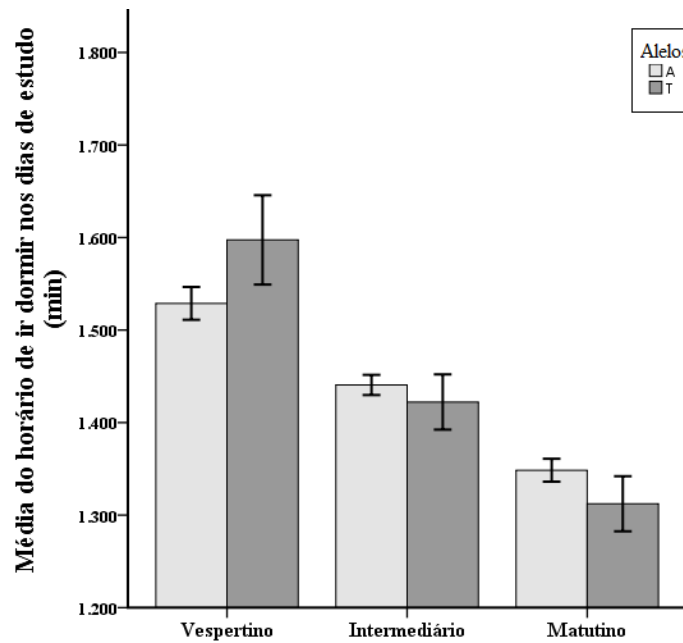
Medidas		Efeito da Preferência diurna			Efeito dos Alelos (rs2020933)			Interação		
		F(330)	p	$\omega^2$	F(330)	p	$\omega^2$	F(330)	p	$\omega^2$
<b>Dias de estudo</b>	HD	143,53	<0,001	0,29	0,17	0,674	0,03	8,32	<0,000	0,04
	HA	51,28	<0,001	0,12	7,32	0,007	0,02	7,95	<0,000	0,04
	DS	9,58	<0,001	0,05	5,11	0,024	0,01	,130	0,878	0,00
	PMS	129,21	<0,001	0,27	3,87	0,050	0,01	11,76	<,000	0,06
<b>Finais de semana</b>	HD	157,97	<0,001	0,22	0,28	0,596	0,00	6,39	0,002	0,03
	HA	109,84	<0,001	0,20	0,14	0,703	----	,733	0,481	0,00
	DS	1,12	0,326	0,00	1,04	0,308	0,00	2,66	0,071	0,01
	PMS	166,60	<0,001	0,32	0,00	0,941	----	3,36	0,036	0,02
<b>Jetlag Social</b>		16,22	<0,001	0,04	2,60	0,107	0,00	,728	0,484	0,00

HD = horário de ir dormir; HA- horário de acordar; DS= duração do sono; PMS= ponto médio do sono;  $\omega^2$ =ômega ao quadrado. Fonte: Autora.

Com relação à interação ‘preferência diurna\*rs2020933’, um efeito significativo foi encontrado para os hábitos de sono (exceto duração do sono) nos grupos dos genotípicos e alélicos. Os resultados dos testes t mostraram que no grupo de vespertinos houve uma diferença significativa entre as médias dos alelos A e T para os horários de dormir (A:  $M = 1:28$  e  $DP = 1:28$ ; T:  $M = 2:37$  e  $DP = 2:23$  horas;  $t(110) = -2,73$ ,  $p = 0,007$ ,  $d = 0,89$ ) (figura 18) e acordar (A:  $M = 7:25$  e  $DP = 1:40$ ; T:  $M = 9:13$  e  $DP = 2:40$  horas;  $t(110) = -2,42$ ,  $p = 0,030$ ,  $d = 0,90$ ) (figura 19), e para ponto médio do sono (A:  $M = 4:27$  e  $DP = 1:18$ ; T:  $M = 5:55$  e  $DP = 1:47$ ;  $t(110) = -3,68$ ,  $p < 0,001$ ,  $d = 0,96$ ) (figura 20) nos dias de estudo.

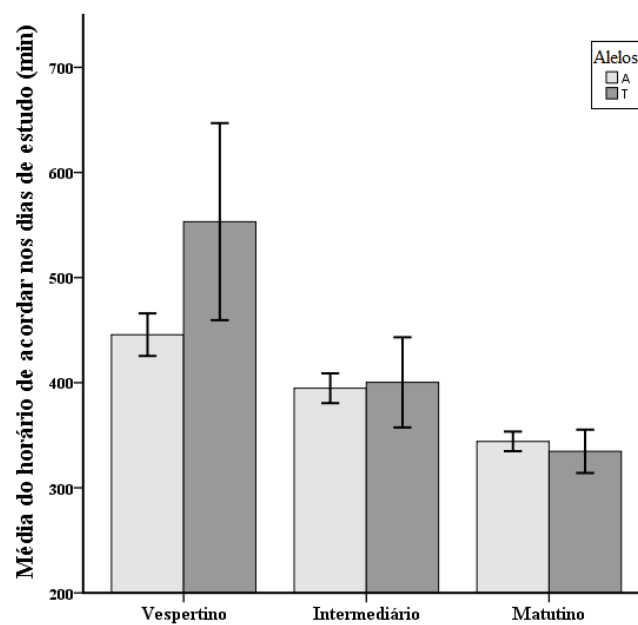
Além disso, as médias dos alelos A e T diferenciaram-se no horário de ir dormir no grupo vespertino (A:  $M = 1:42$  e  $DP = 1:33$ ; T:  $M = 3:44$  e  $DP = 1:57$ ;  $t(110) = -2,22$ ,  $p < 0,028$ ,  $d = 0,76$ ) e matutinos (A:  $M = 22:40$  e  $DP = 1:12$ ; T:  $M = 21:52$  e  $DP = 0:45$ ;  $t(110) = 2,54$ ,  $p < 0,012$ ,  $d = 0,91$ ) nos finais de semana (figura 21). Esses achados indicam que, indivíduos vespertinos com alelo A dormem e acordam mais cedo comparados com os que possuem o alelo T. Entretanto, esse efeito apresenta ser oposto no grupo de matutinos para o horário de dormir nos finais de semana.

**Figura 18 - Médias do horário de ir dormir nos dias de estudo entre os alelos do polimorfismo rs2020933 nos matutinos, intermediários e vespertinos.**



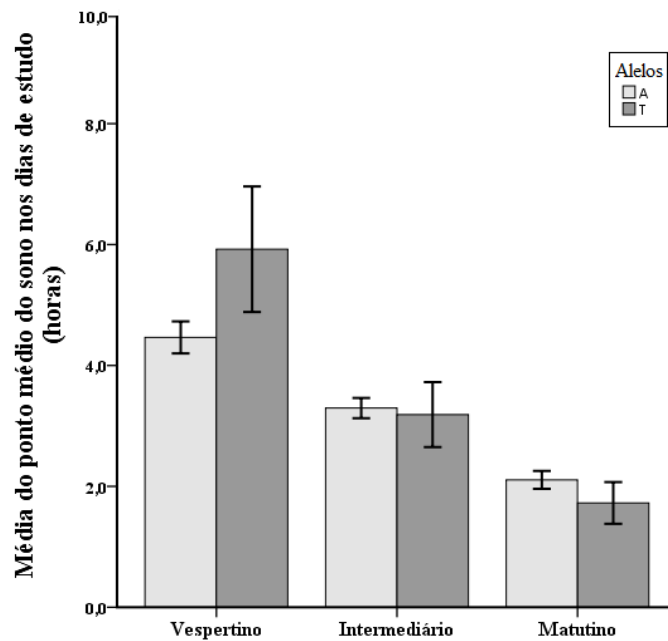
Barras: IC de 95%. Fonte: Autora

**Figura 19 - Médias do horário de acordar nos dias de estudo entre os alelos do polimorfismo rs2020933 nos grupos matutinos, intermediários e vespertinos.**



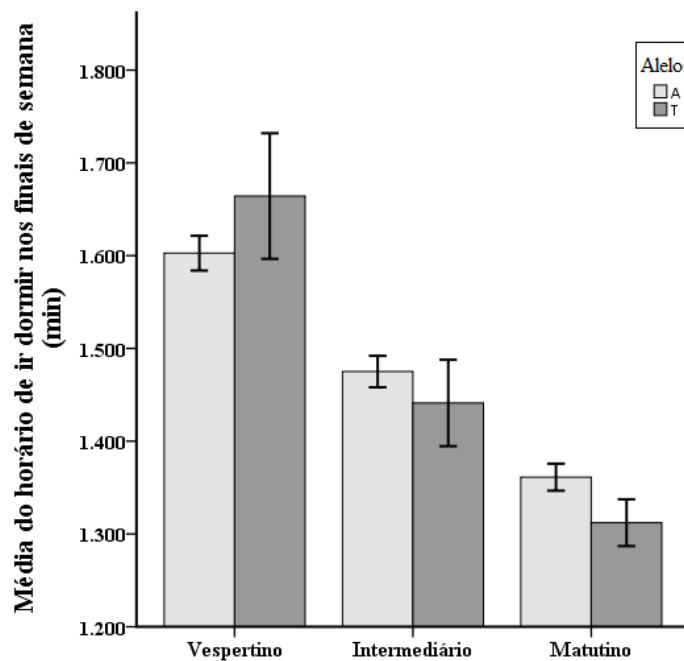
Barras: IC de 95%. Fonte: Autora

**Figura 20 - Médias do ponto médio do sono nos dias de estudo entre os alelos do polimorfismo rs2020933 nos matutinos, intermediários e vespertinos.**



Barras: IC de 95%. Fonte: Autora

**Figura 21 - Diferença no horário de ir dormir nos finais de semana entre os alelos do polimorfismo rs2020933 nos matutinos, intermediários e vespertinos**



Barras: IC de 95%. Fonte: Autora

Para o polimorfismo rs6295, a preferência diurna também teve um efeito principal nos hábitos de sono (exceto duração do sono nos finais de semana) e no *jetlag* social - grupos genotípicos (tabelas 19) e alélicos (tabelas 20). Não houve efeito principal dos genótipos e alelos em relação aos hábitos de sono. Além disso, nenhum efeito da interação ‘preferência diurna\*rs6295’ foi encontrado em ambos os grupos. Esses resultados mostram que o polimorfismo rs6295, localizado no receptor da serotonina 1A, não está relacionado com os hábitos de sono na amostra estudada.

**Tabela 19 - Resultado da ANOVA fatorial para os hábitos de sono e jetlag social em função da preferência diurna e genótipos do polimorfismo rs26592 (n=168)**

		Efeito da Preferência diurna			Efeito do Genótipo (rs6295)			Interação		
		F (158)	p	$\omega^2$	F(158)	p	$\omega^2$	F(158)	p	$\omega^2$
<b>Medidas</b>										
<b>Dias de estudo</b>	HD	104,24	<0,001	0,56	0,44	0,639	0,00	1,73	0,144	0,04
	HA	27,92	<0,001	0,26	0,52	0,596	0,00	0,67	0,614	0,01
	DS	10,69	<0,001	0,11	0,34	0,707	0,00	0,46	0,763	0,01
	PMS	82,95	<0,001	0,51	0,51	0,598	0,00	1,50	0,204	0,03
<b>Finais de semana</b>	HD	115,91	<0,001	0,59	0,13	0,873	0,00	1,43	0,224	0,03
	HA	99,27	<0,001	0,55	0,14	0,870	0,00	0,39	0,810	0,01
	DS	0,030	0,971	----	0,71	0,489	0,00	1,19	0,315	0,02
	PMS	135,46	<0,001	0,63	0,00	0,995	----	0,84	0,518	0,02
<b>Jetlag Social</b>		20,15	<0,001	0,20	0,40	0,671	0,00	0,87	0,484	0,02

HD = horário de ir dormir; HA= horário de acordar; DS= duração do sono; PMS= ponto médio do sono;  $\omega^2$ = ômega ao quadrado. Fonte: Autora.

**Tabela 20 - Resultado da ANOVA fatorial para os hábitos de sono e jetlag social em função da preferência diurna e alelos do polimorfismo rs6295 (n = 168)**

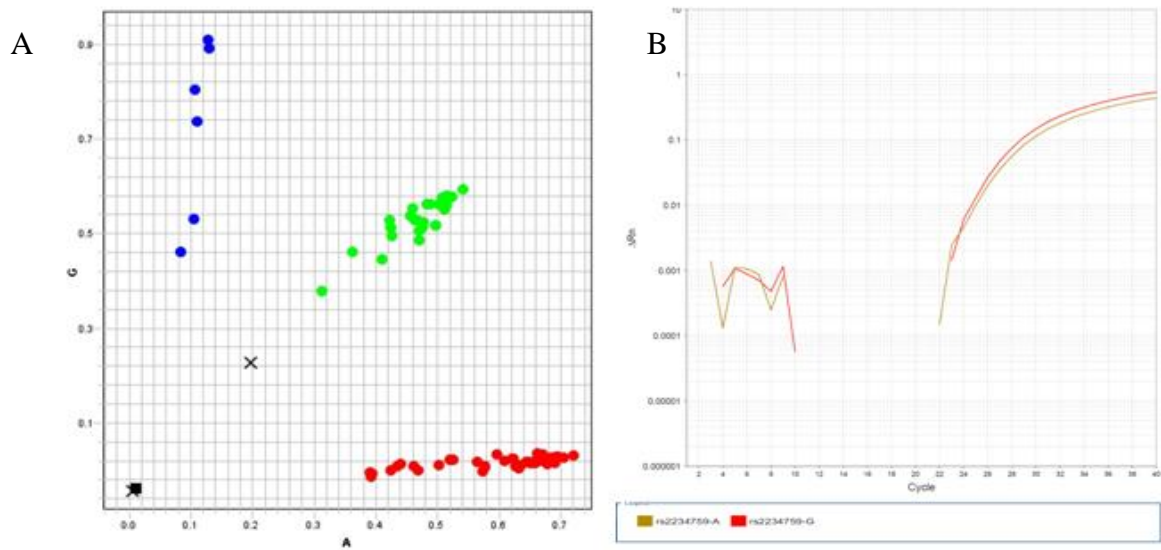
		Efeito da Preferência diurna			Efeito dos Alelos (rs6295)			Interação		
		F(330)	p	$\omega^2$	F(330)	p	$\omega^2$	F(330)	p	$\omega^2$
<b>Medidas</b>										
<b>Dias de estudo</b>	HD	209,50	<0,001	0,55	0,10	0,746	----	1,68	0,188	0,01
	HA	54,96	<0,001	0,25	0,55	0,459	0,00	0,388	0,679	0,00
	DS	23,36	<0,001	0,12	0,25	0,616	0,00	0,618	0,540	0,00
	PMS	164,15	<0,001	0,49	0,39	0,532	0,00	1,20	0,300	0,00
<b>Finais de semana</b>	HD	249,53	<0,001	0,60	0,00	0,969	----	1,54	0,214	0,00
	HA	219,00	<0,001	0,57	0,89	0,345	0,00	0,488	0,614	0,00
	DS	,088	0,916	0,00	1,26	0,262	0,00	2,62	0,074	0,01
	PMS	295,34	<0,001	0,64	0,29	0,590	0,00	0,595	0,552	0,00
<b>Jetlag Social</b>		48,47	<0,001	0,22	0,00	0,970	----	0,965	0,382	0,00

HD = horário de ir dormir; HA= horário de acordar; DS= duração do sono; PMS= ponto médio do sono;  $\omega^2$ = ômega ao quadrado. Fonte: Autora.

### 7.3 Polimorfismo rs2234759 do receptor do neuropeptídeo NPY2 com hábitos de sono e *jetlag* social

O gráfico resultante da TaqMan SNP Genotyping Assay para a discriminação genotípica do polimorfismo rs2234759 localizado no gene do receptor 2 do NPY encontra-se na figura 22. O SNP encontra-se em equilíbrio de *Hardy-Weinberg* ( $\chi^2(1) = 1,98, p > 0,15$ ) e as frequência dos alelos foram 76% para o alelo A e 24% para o alelo G. A distribuição das frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo rs2234759 nos grupos de matutinos, intermediário e vespertinos encontram-se na tabela 21. Nenhuma diferença significativa foi observada na frequência dos genótipos e dos alelos quanto aos três grupos de preferência diurna ( $\chi^2(4) = 5,61, p = 0,23$  e  $\chi^2(2) = 1,62, p = 0,44$ , respectivamente).

**Figura 22 - Distribuição genotípica (A) e curva de amplificação (B) para o polimorfismo rs2234759 do gene NPY2**



Gráficos de discriminação genotípica gerado ao final da reação de TaqMan SNP Genotyping Assay. Os círculos azuis e vermelhos representam os homocigotos G/G e A/A respectivamente; os verdes, heterocigotos A/G. Os X representam as amostras indeterminadas. B- Curva de amplificação para um heterocigoto A/G. Fonte: Autora.

**Tabela 21 - Frequência genotípica e alélica do polimorfismo rs2234759 nos grupos de matutinos, intermediários e vespertinos (n = 168)**

Cronotipos	Genótipos			Alelos					
	A/A (%)	A/G (%)	G/G (%)	$\chi^2(4)$	<i>p</i>	A (%)	G (%)	$\chi^2(2)$	<i>p</i>
Vespertinos	34(60,0)	20(35,0)	2(5,0)			88(78,6)	24(21,4)		
Intermediários	35(62,0)	18(32,0)	3(6,0)	5,61	0,23	88(78,6)	24(21,4)	1,62	0,44
Matutinos	26(46,0)	29(51,0)	1(1,0)			81(72,3)	31(27,7)		
<b>Total</b>	95(56,0)	67(40,0)	6(3,0)			257(76,5)	79 (23,5)		

Fonte: Autora.

Além disso, às médias dos valores do MEQ não se diferenciaram entre os três grupos genotípicos ( $F(2,165) = 2,22, p = 0,11$ ) e alélicos ( $t(334) = 1,39, p = 0,16$ ) do polimorfismo. Em relação às médias dos hábitos de sono e *jetlag* social, houve uma tendência entre os genótipos para a duração do sono nos dias de estudo, mas não nos finais de semana (tabela 22). Entretanto, para os alelos, foi observada uma diferença entre as médias de A ( $M = 6:30$  e  $DP = 1:30$ , IC 95% [6:21 - 6:43] horas) e G ( $M = 6:59$  e  $DP = 1:24$ , IC 95% [6:40 - 7:18] horas) na duração do sono nos dias de estudo ( $t(334) = 2,27, p = 0,024, d = 0,25$ ) (Figura 23), demonstrando que os indivíduos que possuem o alelo G tem uma duração de sono maior que (cerca de 29 minutos) aqueles com o alelo A. Os demais hábitos do sono não apresentaram diferença (tabela 23).

**Tabela 22 - Comparação das médias dos hábitos de sono e jetlag social de acordo com os grupos genotípicos do polimorfismo rs2234759 (n =168).**

	Hábitos de Sono	Genótipo	Média (h:mim)	DP (h:mim)	$F(2,165)$	<i>p</i>
Dias de Estudo	HD	A/A	00:10	01:47	1,28	0,280
		A/G	23:57	01:35		
		G/G	00:00	02:52		
	HA	A/A	06:34	01:26	0,35	0,706
		A/G	06:43	01:41		
		G/G	07:00	01:37		
	DS	A/A	06:23	01:30	3,24	0,042
		A/G	06:58	01:28		
		G/G	07:00	00:49		
	PMS	A/A	03:22	01:26	0,21	0,810
		A/G	03:23	01:28		
		G/G	03:30	02:43		

Continua

Continuação

<b>Finais de Semana</b>	HD	A/A	00:46	02:17	1,56	0,213
		A/G	00:20	01:48		
		G/G	01:45	02:22		
	HA	A/A	09:00	02:24	2,13	0,122
		A/G	08:24	02:18		
		G/G	09:45	01:37		
	DS	A/A	08:18	01:24	0,74	0,480
		A/G	08:00	01:15		
		G/G	07:58	01:24		
PMS	A/A	04:53	02:15	1,93	0,150	
	A/G	04:22	02:08			
	G/G	05:45	02:08			
<b>Jetlag social</b>	A/A	01:30	01:36	2,54	0,081	
	A/G	01:10	01:15			
	G/G	02:15	01:52			

HD = horário de ir dormir; HA= horário de acordar; DS= duração do sono; PMS= ponto médio do sono; DP = desvio padrão. Fonte: Autora.

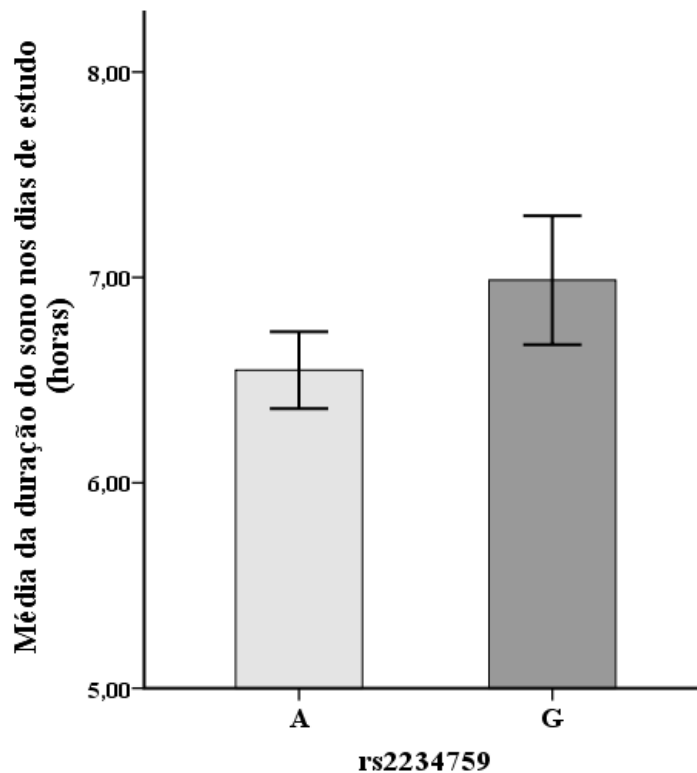
**Tabela 23 - Comparação das médias dos hábitos de sono e jetlag social de acordo com os diferentes alélicos do polimorfismo rs2234759 (n = 168)**

	Hábitos de Sono	Alelo	Média (h:mim)	DP (h:mim)	t(334)	p
<b>Dias de Estudo</b>	HD	A	00:03	01:45	1,28	0,201
		G	23:36	01:47		
	HA	A	06:36	01:30	0,77	0,438
		G	06:46	01:49		
	DS	A	06:30	01:30	2,27	0,024
		G	06:59	01:24		
PMS	A	03:20	01:26	0,31	0,754	
	G	03:16	01:40			
<b>Finais de Semana</b>	HD	A	00:39	02:15	0,39	0,695
		G	00:37	02:15		
	HA	A	08:55	02:23	0,99	0,320
		G	08:57	02:14		
	DS	A	08:15	02:17	1,12	0,260
		G	08:05	02:05		
	PMS	A	04:47	02:12	0,71	0,474
		G	04:30	02:08		
<b>Jetlag social</b>	A	01:27	01:30	0,74	0,457	
	G	01:18	01:22			

HD = horário de ir dormir; HA= horário de acordar; DS= duração do sono; PMS= ponto médio do sono; DP = desvio padrão. Fonte: Autora.



**Figura 23 - Diferença na duração do sono nos dias de estudo para os alelos do polimorfismo rs2234759 (n= 168).**



Barras: IC de 95%. Fonte: Autora

### 7.3.1 Interação entre o polimorfismo rs2234759 e os hábitos de sono e social *jetlag*

O resultado da ANOVA fatorial mostrou um efeito principal para a preferência diurna nos hábitos de sono (exceto duração do sono nos dias de estudo e finais de semana) e no *jetlag* social nos grupos genotípicos (exceto duração do sono nos dias de estudo) (tabelas 24) e nos grupos alélicos (tabelas 25). Um efeito principal dos alelos foi encontrado para a duração do sono dias de estudo ( $F(2, 158) = 4,73, p = 0,030, \omega^2 = 0,014$ ), porém nenhum efeito principal foi observado em relação aos genótipos (Tabela 24). Não houve efeito significativo para interação ‘preferência diurna\*rs2234759’ nos hábitos de sono e *jetlag* social nos grupos genotípico e alélicos.

**Tabela 24 - Resultado da ANOVA fatorial para os hábitos de sono e jetlag social em função da preferência diurna e genótipos do polimorfismo rs2234759 (n = 168)**

Medidas		Efeito da Preferência diurna			Efeito dos Genótipo (rs2234759)			Interação		
		<i>F</i> (158)	<i>p</i>	$\omega^2$	<i>F</i> (158)	<i>p</i>	$\omega^2$	<i>F</i> (158)	<i>p</i>	$\omega^2$
<b>Dias de estudo</b>	HD	21,82	<0,001	0,21	0,50	0,607	0,00	0,56	0,690	0,01
	HA	8,20	<0,001	0,09	1,36	0,259	0,01	0,83	0,506	0,02
	DS	1,39	0,252	0,01	2,31	0,102	0,02	1,34	0,256	0,03
	PMS	19,54	<0,001	0,19	0,40	0,667	0,00	0,41	0,796	0,01
<b>Finais de semana</b>	HD	33,16	<0,001	0,29	0,43	0,647	0,00	0,52	0,718	0,01
	HA	20,49	<0,001	0,20	0,72	0,486	0,00	0,27	0,894	0,00
	DS	0,84	0,433	0,01	0,49	0,608	0,00	0,78	0,535	0,02
	PMS	33,13	<0,001	0,29	0,61	0,543	0,00	0,26	0,902	0,00
<b>Jetlag Social</b>		5,48	0,005	0,06	1,61	0,202	0,02	0,18	0,946	0,00

HD = horário de ir dormir; HA= horário de acordar; DS= duração do sono; PMS= ponto médio do sono;  $\omega^2$ =ômega ao quadrado. Fonte: Autora.

**Tabela 25 - Resultado da ANOVA fatorial para os hábitos de sono e jetlag social em função da preferência diurna e alelos do polimorfismo rs2234759 (n = 168)**

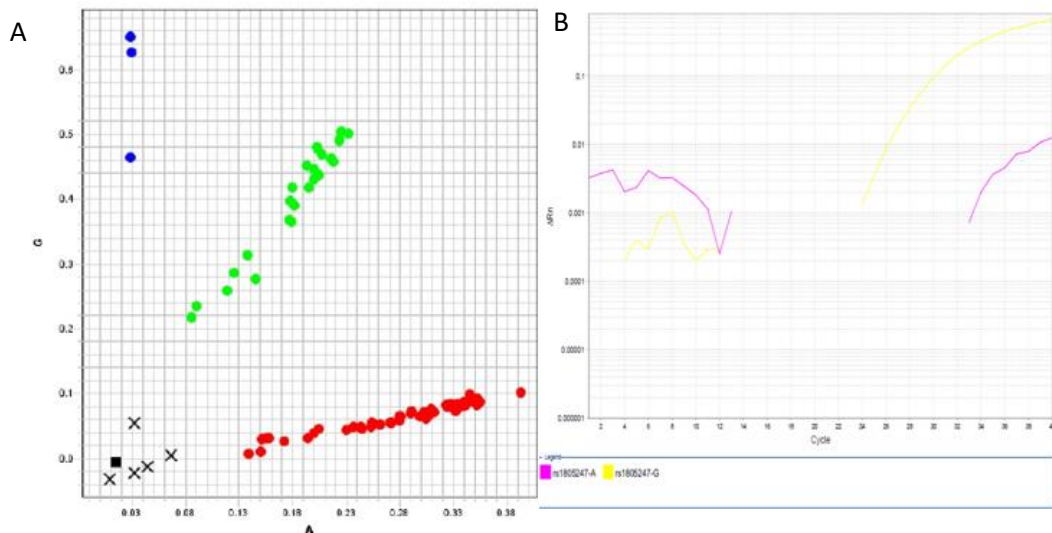
Medidas		Efeito da Preferência diurna			Efeito dos Alelos (rs2234759)			Interação		
		<i>F</i> (330)	<i>p</i>	$\omega^2$	<i>F</i> (330)	<i>p</i>	$\omega^2$	<i>F</i> (330)	<i>p</i>	$\omega^2$
<b>Dias de estudo</b>	HD	144,62	<0,001	0,46	0,54	0,460	0,00	0,64	0,527	0,00
	HA	48,02	<0,001	0,22	2,74	0,098	0,00	1,57	0,209	0,00
	DS	11,54	<0,001	0,06	4,74	0,030	0,01	2,46	0,088	0,01
	PMS	123,88	<0,001	0,42	0,48	0,486	0,00	0,57	0,562	0,00
<b>Finais de semana</b>	HD	183,20	<0,001	0,52	0,50	0,480	0,00	0,14	0,868	0,00
	HA	156,76	<0,001	0,48	0,06	0,792	0,00	0,63	0,532	0,00
	DS	0,08	0,045	0,95	1,21	0,272	0,00	0,34	0,709	0,00
	PMS	215,12	<0,001	0,56	0,06	0,798	0,00	0,42	0,657	0,00
<b>Jetlag Social</b>		33,23	<0,001	0,16	0,09	0,760	0,00	0,04	0,953	0,00

HD = horário de ir dormir; HA= horário de acordar; DS= duração do sono; PMS= ponto médio do sono;  $\omega^2$  = ômega ao quadrado. Fonte: Autora.

#### 7.4 Polimorfismo rs1805247 no gene da subunidade GRIN2B do receptor NMDA

A distinção genotípica fornecida pela reação de *TaqMan SNP Genotyping Assay* está representada na figura 24. O polimorfismo rs1805247 demonstrou estar em equilíbrio *Hardy-Weinberg* ( $\chi^2(1) = 0,024, p = 0,87$ ) na amostra estudada, sendo as frequências alélicas de 85% para o alelo A e 15% para o alelo G. A distribuição das frequências genotípicas e alélicas desse polimorfismo entre os grupos matutinos, intermediários e vespertinos estão representadas na tabela 25. Nenhuma associação foi encontrada entre os genótipos ( $\chi^2(4) = 2,11, p > 0,75$ ) ou alélicos ( $\chi^2(2) = 0,32, p = 0,84$ ) do polimorfismo rs1805247 com preferência diurna (tabela 26). Adicionalmente, não houve diferença significativa na média dos valores do MEQ para os diferentes genótipos ( $F(2,165) = 0,364, p = 0,69$ ) e alelos ( $t(334) = -0,612, p = 0,334$ ).

**Figura 24 - Distinção genotípica (A) e curva de amplificação (B) do para o polimorfismo rs1805247.**



Gráficos de gerado ao final da reação de *TaqMan SNP Genotyping Assay* para o polimorfismo rs1805247. Os círculos azuis e vermelhos representam os homocigotos G/G e A/A respectivamente; os verdes, heterocigotos A/G. Os X representam as amostras indeterminadas. B - Curva gerada para um homocigoto G/G. Fonte: Autora.

**Tabela 26 - Frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo rs1805247 nos grupos de matutinos, intermediários e vespertinos (n = 168)**

	Genótipos			$\chi^2(2)$	<i>p</i>	Alelos		$\chi^2(2)$	<i>p</i>
	A/A	A/G	G/G			A (%)	G (%)		
<b>Vespertino</b>	39(60,0)	14(35,5)	2(4,5)			95 (84,8)	17(15,2)		
<b>Intermediário</b>	42(75,0)	14(25,0)	0(0,0)	2,09	0,718	97(86,6)	15(13,4)	0,32	0,848
<b>Matutino</b>	40(71,4)	14(25,0)	2(3,0)			94(83,9)	18(16,1)		
<b>Total</b>	121(72,0)	42(25,0)	4(3,0)			286(85,1)	50(14,9)		

Fonte: Autora

Em relação aos hábitos do sono e do *jetlag* social, houve uma diferença entre as médias dos genótipos (tabela 27) e a duração do sono nos dias de trabalho para o polimorfismo rs1805247 ( $F(2,165) = 4,51$ ,  $p = 0,012$ ), localizado no gene da subunidade GRIN2B do receptor NMDA. Indivíduos com o genótipo G/G apresentaram uma duração do sono maior ( $M = 9:11$  e  $DP = 0:37$ , IC 95% [7:36 - 10:48] horas) comparado com A/A ( $M = 6:36$  e  $DP = 1:30$ , IC 95% [6:18 - 6:48] horas) e A/G ( $M = 6:36$  e  $DP = 1:26$ , IC 95% [6:09 - 7:00] horas) nos dias de estudo. Nenhuma diferença foi encontrada os seus respectivos alelos (tabela 28).

**Tabela 27 - Comparação das médias dos hábitos de sono e jetlag social de acordo com os grupos genotípicos do polimorfismo rs1805247 (n = 168)**

	Hábitos do sono	Genótipo	Média (h:mim)	DP (h:mim)	$F(2,165)$	<i>p</i>
<b>Dias de Estudo</b>	HD	A/A	0:00	1:45	1,71	0,184
		A/G	23:57	1:44		
		G/G	22:13	1:49		
	HA	A/A	6:41	1:30	0,59	0,555
		A/G	6:30	1:38		
		G/G	7:25	1:54		
	DS	A/A	6:36	1:30	4,51	0,012
		A/G	6:36	1:26		
		G/G	9:11	0:37		
	PMS	A/A	3:22	1:27	0,43	0,650
		A/G	3:11	1:37		
		G/G	2:48	1:50		

Continua

Continuação

<b>Finais de Semana</b>	HD	A/A	0:43	2:14	1,56	0,213
		A/G	0:20	2:13		
		G/G	23:20	2:48		
	HA	A/A	8:49	2:17	0,23	0,802
		A/G	8:55	2:30		
		G/G	8:00	2:10		
	DS	A/A	8:05	1:15	1,27	0,283
		A/G	8:27	1:30		
		G/G	8:36	1:37		
PMS	A/A	4:46	2:10	0,36	0,694	
	A/G	4:42	2:16			
	G/G	3:42	3:00			
<b>Jetlag social</b>	A/A	1:24	1:24	0,28	0,751	
	A/G	1:30	1:43			
	G/G	0:52	1:08			

HD= horário de ir dormir; HÁ= horário de acordar; DS= duração do sono; PMS= ponto médio do sono; DP= desvio padrão. Fonte: Autora.

**Tabela 28 - Comparação das médias dos hábitos de sono e jetlag social de acordo com os grupos alélicos do polimorfismo rs1805247 (n = 336)**

	Hábitos do sono	Alelo	Média (h:mim)	DP (h:mim)	t(334)	p
<b>Dias de Estudo</b>	HD	A	0:02	1:45	1,27	0,205
		G	23:52	1:47		
	HA	A	6:40	1:32	0,27	0,783
		G	6:35	1:46		
	DS	A	6:36	1:30	1,23	0,217
		G	6:53	1:36		
PMS	A	3:21	1:28	0,91	0,362	
	G	3:09	1:36			
<b>Finais de Semana</b>	HD	A	0:41	1:53	0,98	0,327
		G	0:21	2:21		
	HA	A	8:51	2:20	0,18	0,858
		G	8:43	2:28		
	DS	A	8:10	1:23	1,38	0,169
		G	8:25	1:30		
	PMS	A	4:46	2:11	0,60	0,545
		G	4:30	2:18		
<b>Finais de Semana</b>	A	1:24	1:26	0,02	0,984	
	G	1:25	1:36			

HD = horário de ir dormir; HÁ= horário de acordar; DS= duração do sono; PMS= ponto médio do sono; DP=desvio padrão. Fonte: Autora.

#### 7.4.1 Interação entre o polimorfismo rs1805247 com hábitos de sono e *jetlag* social

Os dados da ANOVA fatorial apresentaram um efeito principal da preferência diurna nos hábitos do sono, com exceção da duração do sono nos dias de estudo e finais de semana, e *jetlag* social quando o grupo genotípico foi considerado (tabela 29). Para o grupo alélico, a preferência diurna teve um efeito principal para todos os hábitos de sono e para o *jetlag* social (tabela 30). Contudo, nenhum efeito principal foi encontrado para os genótipos e alelos do polimorfismo rs1805247. Além disso, não houve efeito da interação ‘preferência diurna\*rs1805247’ nos hábitos de sono e social *jetlag* para ambos os grupos genotípicos e alélicos (tabelas 29 e 30).

**Tabela 29 - Resultado da ANOVA fatorial para os hábitos de sono e *jetlag* social em função da preferência diurna e genótipos do polimorfismo rs1805247 (n = 168)**

		Efeito da Preferência diurna			Efeito dos Genótipo (rs1805247)			Interação		
		<i>F</i> (158)	<i>p</i>	$\omega^2$	<i>F</i> (158)	<i>p</i>	$\omega^2$	<i>F</i> (158)	<i>p</i>	$\omega^2$
<b>Dias de estudo</b>	HD	18,88	0,000	0,19	2,07	0,128	0,02	1,13	0,335	0,02
	HA	7,30	0,001	0,08	1,59	0,206	0,02	0,70	0,551	0,01
	DS	,941	0,392	0,01	4,36	0,014	0,05	0,22	0,882	0,00
	PMS	17,11	0,000	0,01	0,73	0,480	0,00	1,21	0,305	0,02
<b>Finais de semana</b>	HD	31,17	0,000	0,28	0,72	0,489	0,00	0,84	0,471	0,01
	HA	17,96	0,000	0,18	0,05	0,949	0,00	0,46	0,710	0,00
	DS	1,02	0,361	0,01	1,17	0,312	0,01	0,92	0,433	0,01
	PMS	30,06	0,000	0,27	0,18	0,834	0,00	0,57	0,631	0,01
<b>Jetlag Social</b>		5,02	0,008	0,05	0,14	0,864	0,00	0,09	0,962	0,00

HD = horário de ir dormir; HÁ= horário de acordar; DS= duração do sono; PMS= ponto médio do sono;  $\omega^2$ = ômega ao quadrado. Fonte: Autora.

**Tabela 30 - Resultado da ANOVA fatorial para os hábitos de sono e jetlag social em função da preferência diurna e alelos do polimorfismo rs1805247 (n = 168)**

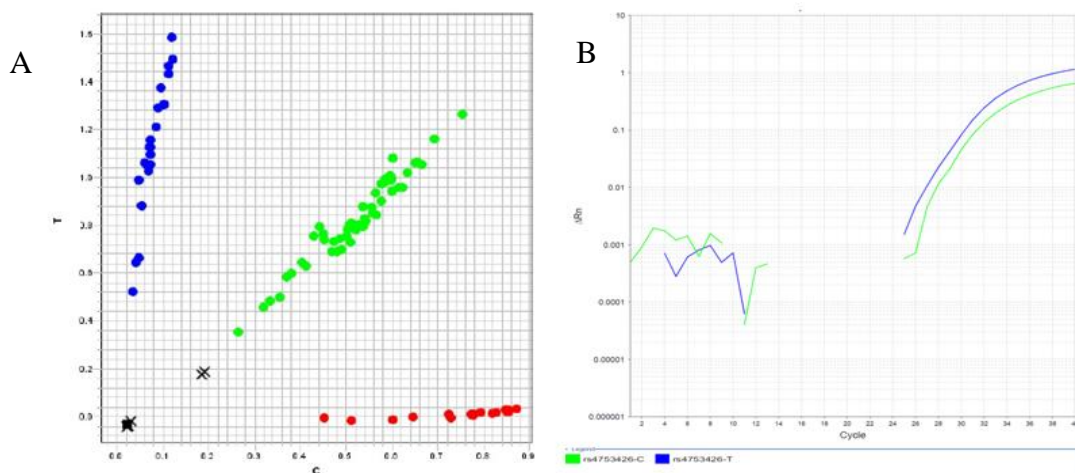
		Efeito da Preferência diurna			Efeito dos Alelos (rs1805247)			Interação		
		F(330)	p	$\omega^2$	F(330)	p	$\omega^2$	F(330)	p	$\omega^2$
<b>Dias de estudo</b>	HD	105,09	<0,001	0,38	2,63	0,106	0,00	1,85	0,158	0,01
	HA	26,67	<0,001	0,13	0,04	0,832	----	0,17	0,840	0,00
	DS	12,22	<0,001	0,06	1,37	0,241	0,00	0,65	0,518	0,00
	PMS	80,79	<0,001	0,32	1,11	0,292	0,00	1,03	0,358	0,00
<b>Finais de semana</b>	HD	136,93	<0,001	0,45	1,64	0,200	0,00	0,66	0,513	0,00
	HA	12,22	<0,001	0,06	1,37	0,241	0,00	0,65	0,518	0,00
	DS	80,79	<0,001	0,32	1,11	0,292	0,00	1,03	0,358	0,00
	PMS	136,93	<0,001	0,45	1,64	0,200	0,00	0,66	0,513	0,00
<b>Jetlag Social</b>		27,57	<0,001	0,14	0,01	0,913	----	0,13	0,873	0,00

HD = horário de ir dormir; HÁ= horário de acordar; DS= duração do sono; PMS= ponto médio do sono;  $\omega^2$ = ômega ao quadrado. Fonte: Autora.

### 7.5 Polimorfismo rs4753426 no gene do receptor 2 da melatonina - MT2

A discriminação dos genótipos para polimorfismo rs4753426 oriundos da reação *TaqMan SNP Genotyping Assay* encontra-se na figura 25. A distribuição genotípica demonstrou que esse polimorfismo se encontra em equilíbrio de *Hardy-Weinberg* (n = 814) ( $\chi^2(1) = 0,31, p = 0,577$ ), sendo as frequências alélicas de 51% para o alelo T e 49% para o alelo C. As frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo rs4753426 nos grupos matutinos, intermediários e vespertinos estão contidos nas figuras 26 e 27.

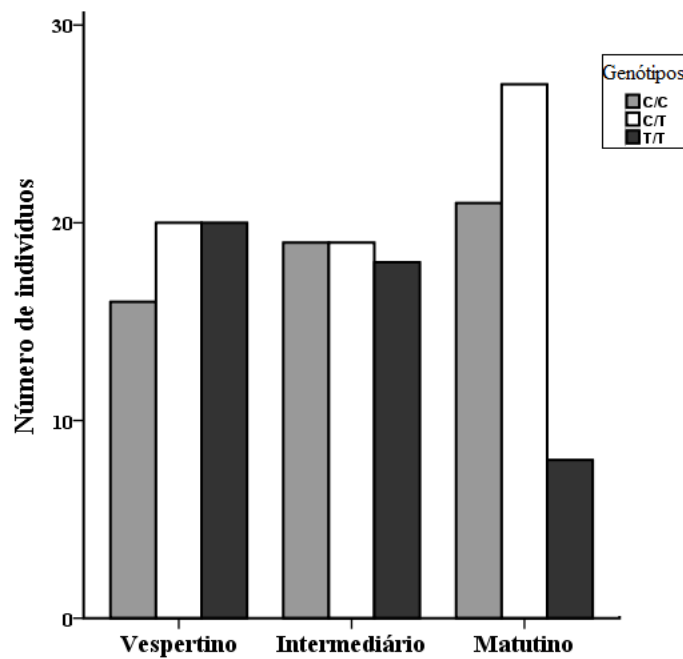
**Figura 25 - Distinção genotípica (A) e curva de amplificação (B) do polimorfismo 4753426 no gene MTNR1B**



Gráficos gerados ao final da reação de *TaqMan SNP Genotyping Assay* para o polimorfismo rs4753426. Os círculos azuis e vermelhos representam os homocigotos C/C e T/T respectivamente; os verdes, heterocigotos C/T. Os X as representam amostras indeterminadas. B- Curva gerada para um heterocigoto C/T. Fonte: Autora.

Nenhuma diferença foi encontrada entre os genótipos e a preferência diurna ( $\chi^2(4) = 7,16, p = 0,127$ ) considerando a amostra total ( $n = 168$ ) ( $\chi^2(2) = 4,97, p = 0,083$ ). Todavia, quando os grupos de matutinos e vespertinos extremos foram analisados, uma associação foi encontrada entre o alelo C e a matutuidade ( $\chi^2(1) = 4,60, p = 0,032, OR = 1,78, 95\% IC [1,05 - 3,04]$ ) nos modelos genéticos de codominância (C/C vs. T/T:  $OR = 3,12, 95\% IC [1,09 - 8,92], p = 0,049$ ) e recessividade (C/C-C/T vs. T/T:  $OR = 3,08, 95\% IC [1,21 - 7,81], p = 0,014$ ). Não foi observada diferença nas comparações entre os demais grupos: matutinos versus intermediários ( $\chi^2(1) = 2,61, p = 0,106, OR = 0,64, 95\% IC [0,38 - 1,09]$ ) e intermediário versus vespertino ( $\chi^2(1) = 0,28, p = 0,596, OR = 0,51, 95\% IC [0,51 - 1,46]$ ).

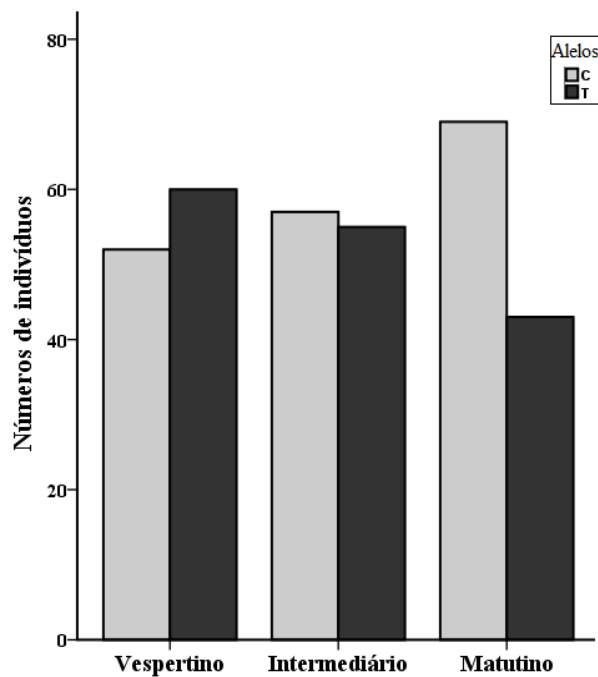
**Figura 26 - Distribuição genotípica do polimorfismo rs4753426 nos grupos de matutinos, intermediários e vespertinos**



Fonte: Autora



**Figura 27 - Distribuição alélica do polimorfismo rs4753426 nos grupos de matutinos, intermediários e vespertinos**



Fonte: Autora

Quanto às médias do MEQ (preferência diurna), nenhuma diferença foi observada para os genótipos  $F(2,165) = 2,27, p = 0,10$  e alelos ( $t(334) = 1,64, p = 0,101$ ). Além disso, a médias dos hábitos de sono (nos dias de estudo e de trabalho) e *jetlag* social não se diferenciaram quanto aos grupos genotípicos (tabela 31) e alélicos (tabela 32).

**Tabela 31 - Comparação das médias dos hábitos de sono e *jetlag* social de acordo com os grupos genotípicos do polimorfismo 4753426 (n = 168)**

	Hábitos do sono	Genótipos	Média (h:min)	DP (h:min)	$F(2,165)$	$p$
Dias de Estudo	HD	C/C	23:45	1:30	0,90	0,408
		C/T	0:15	1:50		
		T/T	0:00	1:45		
HA	C/C	C/C	6:40	1:30	0,36	0,698
		C/T	6:30	1:35		
		T/T	6:45	1:40		
DS	C/C	C/C	6:30	1:40	0,28	0,752
		C/T	6:45	1:30		
		T/T	6:35	1:20		
PMS	C/C	C/C	3:25	1:30	0,77	0,463
		C/T	3:08	1:20		
		T/T	3:25	1:30		

Continua

Continuação

<b>Finais de Semana</b>	HD	C/C	0:30	2:15	0,84	0,430
		C/T	0:25	2:22		
		T/T	1:00	1:00		
	HA	C/C	8:40	2:08	0,83	0,435
		C/T	8:45	2:38		
		T/T	9:15	2:20		
	DS	C/C	8:08	1:20	0,06	0,934
		C/T	8:15	1:20		
		T/T	8:15	1:20		
PMS	C/C	4:40	2:10	0,90	0,407	
	C/T	4:40	2:20			
	T/T	5:10	1:55			
<b>Jetlag social</b>	C/C	1:12	1:20	1,28	0,279	
	C/T	1:20	1:35			
	T/T	1:40	1:20			

HD = horário de ir dormir; HA- horário de acordar; DS= duração do sono; PMS= ponto médio do sono;  $\omega^2$ =ômega ao quadrado. Fonte: Autora.

**Tabela 32 - Comparação das médias dos hábitos de sono e jetlag social de acordo com os grupos alélicos do polimorfismo 4753426 (n = 336)**

		Hábitos do sono	Alelo	Média (h:min)	DP (h:min)	t(334)	p
<b>Dias de Estudo</b>	HD	C	0:00	1:47	0,07	0,943	
		T	0:00	1:35			
	HA	C	6:38	1:30	0,13	0,890	
		T	6:40	1:36			
	DS	C	6:34	1:32	0,30	0,764	
		T	6:39	1:21			
PMS	C	6:19	1:30	0,00	0,998		
	T	6:19	1:30				
<b>Finais de Semana</b>	HD	C	0:30	2:30	1,10	0,268	
		T	0:47	2:10			
	HA	C	8:42	8:42	1,20	0,230	
		T	9:00	2:23			
	DS	C	8:10	1:21	0,32	0,745	
		T	8:13	1:20			
	PMS	C	4:36	2:13	1,18	0,237	
		T	4:40	2:10			
<b>Jetlag social</b>	HD	C	1:16	1:28	1,76	0,079	
		T	1:34	1:28			

HD = horário de ir dormir; HA- horário de acordar; DS= duração do sono; PMS= ponto médio do sono;  $\omega^2$ =ômega ao quadrado. Fonte: Autora.

Nos resultados da ANOVA fatorial para a interação preferência diurna\*4753426, a preferência diurna apresentou um efeito principal em todos os hábitos de sono (exceto a duração do sono nos finais de semana) e no *jetlag* social nos grupos genotípicos (tabelas 33) e alélicos (tabelas 34). Um efeito principal do polimorfismo rs4753426 foi visto para o horário

de ir dormir nos finais de semana e para o ponto médio do sono nos alelos. No entanto, nenhum efeito da interação preferência diurna\*rs4753426 foi encontrado para os hábitos de sono e *jetlag* social em ambos os grupos (tabelas 32 e 33).

**Tabela 33 - Resultado da ANOVA fatorial para os hábitos de sono e jetlag social em função da preferência diurna e genótipos do polimorfismo (n = 168)**

		Efeito da Preferência diurna			Efeito dos Alelos (rs4753426)			Interação		
		F(330)	p	$\omega^2$	F(330)	p	$\omega^2$	F(330)	p	$\omega^2$
<b>Dias de estudo</b>	HD	213,71	<0,001	0,56	6,33	0,012	0,01	1,85	0,158	0,01
	HA	55,18	<0,001	0,25	1,10	0,293	0,00	0,32	0,720	0,00
	DS	23,45	<0,001	0,12	1,25	0,264	0,00	0,48	0,615	0,00
	PMS	166,67	<0,001	0,50	4,49	0,035	0,01	1,35	0,259	0,00
<b>Finais de semana</b>	HD	244,67	<0,001	0,59	0,66	0,415	0,00	0,37	0,687	0,00
	HA	219,00	<0,001	0,57	0,36	0,546	0,00	2,17	0,115	0,01
	DS	,102	0,903	0,00	0,06	0,795	0,00	2,07	0,128	0,01
	PMS	293,64	<0,001	0,64	0,70	0,403	0,00	1,22	0,295	0,00
<b>Jetlag Social</b>		46,88	<0,001	0,22	0,74	0,390	0,00	0,49	0,608	0,00

HD = horário de ir dormir; HA- horário de acordar; DS= duração do sono; PMS= ponto médio do sono;  $\omega^2$ =ômega ao quadrado. Fonte: Autora.

**Tabela 34 - Resultado da ANOVA fatorial para os hábitos de sono e jetlag social em função da preferência diurna e alelos do polimorfismo (n= 168)**

		Efeito da Preferência diurna			Efeito dos Genótipos (rs4753426)			Interação		
		F(158)	p	$\omega^2$	F(158)	p	$\omega^2$	F(158)	p	$\omega^2$
<b>Dias de estudo</b>	HD	101,04	<0,001	0,56	3,14	0,046	0,03	1,66	0,160	0,04
	HA	26,07	<0,001	0,24	0,65	0,522	0,00	0,36	0,831	0,00
	DS	10,23	<0,001	0,11	0,49	0,609	0,00	0,54	0,703	0,01
	PMS	78,93	<0,001	0,49	2,36	0,097	0,02	1,18	0,318	0,02
<b>Finais de semana</b>	HD	103,62	<0,001	0,56	0,10	0,900	0,00	0,55	0,698	0,01
	HA	99,38	<0,001	0,55	0,32	0,721	0,00	1,39	0,239	0,03
	DS	0,389	0,679	0,00	0,13	0,879	0,00	2,03	0,092	0,04
	PMS	128,30	<0,001	0,61	0,27	0,763	0,00	0,76	0,551	0,01
<b>Jetlag Social</b>		19,12	<0,001	0,19	0,80	0,447	0,01	1,60	0,177	0,03

HD = horário de ir dormir; HA- horário de acordar; DS= duração do sono; PMS= ponto médio do sono;  $\omega^2$ =ômega ao quadrado. Fonte: Autora.

### 7.6 Interação entre os polimorfismos dos receptores rs1805247 do gene *GRIN2B*, rs2234759 do gene *NPYR2*, rs4753426 do gene *MTNR1B* e rs6295, do gene *HTTTR1A* com preferência diurna

Os resultados da ANOVA fatorial para os polimorfismos rs1805247, rs2234759, rs4753426 e rs6295 com preferência diurna não demonstraram efeito principal para nenhum dos polimorfismos nas análises genotípicas (tabela 35). Contudo, para a análise alélica, um efeito principal foi observado para o polimorfismo rs2234759 (tabela 36). Adicionalmente, não houve efeito de interação entre esses SNPs na preferência diurna (genótipos:  $F(32, 127) = 1,20$ ,  $p = 0,234$ ,  $\omega^2 = 0,23$ ; alelos: ( $F(10, 321) = 1,64$ ,  $p = 0,093$ ,  $\omega^2 = 0,04$ ).

**Tabela 35 – ANOVA fatorial para a preferência diurna em função dos genótipos dos polimorfismos rs1805247, rs2234759, rs4753426 e rs6295 (n=168)**

Fonte	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	$F(321)$	$p$	$\omega^2$
Modelo Corrigido	7485,67	14	534,69	1,87	0,029	0,07
rs2234759	1743,05	1	1743,05	6,09	0,014	0,01
rs1805247	1045,73	1	1045,73	3,65	0,057	0,01
rs4753426	27,21	1	27,21	0,09	0,758	0,00
rs6295	71,15	1	71,15	0,24	0,618	0,00
rs1805247*rs2234759* rs4753426*rs6295	4707,04	10	470,70	1,64	0,093	0,04
<b>Total</b>	<b>938088</b>	<b>336</b>				

Fonte: Autora

**Tabela 36 - ANOVA fatorial para a preferência diurna em função dos alelos dos polimorfismos rs1805247, rs2234759, rs4753426 e rs6295 (n=168)**

Fonte	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	$F(127)$	$p$	$\omega^2$
Modelo Corrigido	13815,28	40	345,38	1,22	0,199	0,27
rs2234759	77,49	2	38,74	0,13	0,872	0,00
rs1805247	114,70	2	57,351	0,20	0,816	0,00
rs4753426	1649,38	2	824,69	2,92	0,057	0,04
rs6295	229,31	2	114,65	0,40	0,667	0,00
rs1805247*rs2234759* rs4753426*rs6295	10859,53	32	339,36	1,20	0,234	0,23
<b>Total</b>	<b>469044</b>	<b>168</b>				

Fonte: Autora

Já na ANOVA fatorial para a interação entre os polimorfismos rs2234759, rs4753426 e rs6295 na preferência diurna, observou-se um efeito principal do polimorfismo rs4753426, localizado no gene do receptor MT2, para seus genótipos e, um efeito do SNP rs2234759, localizado no gene do receptor do NPY2, para seus alelos. Não houve efeito de interação entre os três SNPs nos cronotipos em relação aos genótipos (tabela 37). Entretanto, para os alelos, um efeito de interação foi encontrado para os três polimorfismos na preferência diurna (tabela 38).

**Tabela 37 - ANOVA fatorial para a preferência diurna em função dos genótipos dos polimorfismos rs2234759, rs4753426 e rs6295 (n=168)**

Fonte	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F (145)	P	$\omega^2$
<b>Modelo Corrigido</b>	9859,37	22	448,15	1,63	0,046	0,19
<b>rs2234759</b>	624,11	2	312,05	1,13	0,324	0,01
<b>rs4753426</b>	1704,72	2	852,36	3,10	0,048	0,04
<b>rs6295</b>	292,57	2	146,28	,533	0,588	0,00
<b>rs2234759*rs4753426*rs6295</b>	6947,47	16	434,21	1,58	0,080	0,14
<b>Total</b>	469044	168				

Fonte: Autora

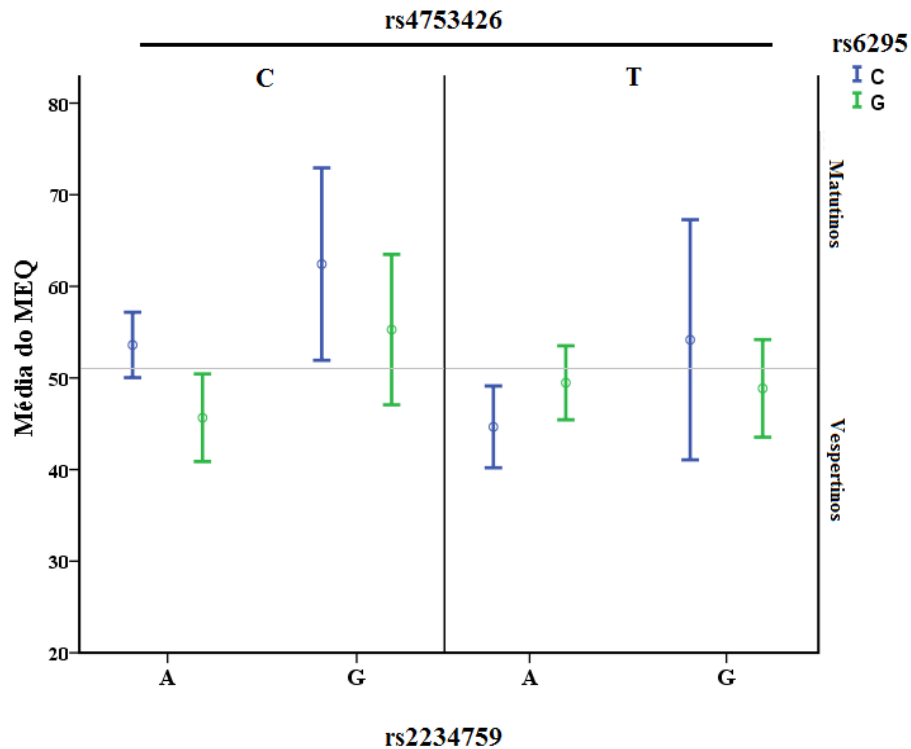
**Tabela 38 – ANOVA fatorial para a preferência diurna em função dos alelos dos polimorfismos rs2234759, rs4753426 e rs6295 (n=168)**

Fonte	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F(328)	p	$\omega^2$
<b>Modelo Corrigido</b>	9859,37	22	448,15	1,63	0,046	0,19
<b>rs2234759</b>	2007,09	1	2007,09	7,01	0,008	0,02
<b>rs4753426</b>	1053,52	1	1053,52	3,68	0,056	0,01
<b>rs6295</b>	652,79	1	652,79	2,28	0,132	0,00
<b>rs2234759*rs4753426*rs6295</b>	2850,57	4	712,64	2,49	0,043	0,02
<b>Total</b>	938088	336				

Fonte: Autora

A figura 28 mostra as diferenças nas médias dos valores do questionário de MEQ para as combinações alélicas dos três *SNPs* (rs2234759, rs4753426 e rs6295). As combinações alélicas C-A-C ( $M = 53,60$  e  $DP = \pm 17,32$ ) e C-G-C ( $M = 62,43$  e  $DP = \pm 11,35$ ) mostraram uma média maior dos valores do MEQ comparada com as combinações C-A-G ( $M = 45,66$  e  $DP = \pm 18,65$ ) e T-A-C ( $M = 44,66$  e  $DP = \pm 14,68$ );  $t(152) = 2,70$ ,  $p = 0,008$ ,  $d = 0,66$  e  $t(53) = 3,68$ ,  $p = 0,001$ ,  $d = 0,97$ ), indicando que indivíduos com as combinações C-G-C e C-A-G são mais matutinos. Adicionalmente, as análises das frequências dessas combinações confirmaram que C-G-C (OR = 0,31 95%IC [0,10 – 0,98],  $p = 0,049$ ) e C-A-G (OR = 0,13 95%IC [0,02 – 0,71],  $p = 0,020$ ) estão associadas com matutividade, enquanto que os T-A-C estão correlacionados com a vespertinidade (OR = 3,96 95%IC [1,09 – 14,44],  $p = 0,039$ ) na amostra de matutinos e vespertinos ( $n = 112$ ) (tabela 39).

**Figura 28 - Médias dos valores do MEQ nas diferentes combinações alélicas para os polimorfismos rs2234759, rs4753426 e rs6295**



Barras: IC de 95%. Fonte: Autora

**Tabela 39 – Frequência das diferentes combinações alélicas (“haplótipos”) para os polimorfismos rs2234759, rs4753426 e rs6295 nos grupos matutinos e vespertinos (n = 112)**

N° C	rs4753426	rs2234759	rs6295	FT	Vespertino	Matutino	OR (95% IC)	p
1	C	A	G	0.24	0.25	0.22	1.00	---
2	C	A	C	0.19	0.17	0.25	<b>0.31 (0.10 - 0.98)</b>	<b>0.049</b>
3	T	A	G	0.16	0.15	0.16	0.53 (0.19 - 1.48)	0.220
4	T	A	C	0.15	0.20	0.08	<b>3.96 (1.09 - 14.44)</b>	<b>0.039</b>
5	T	G	G	0.08	0.11	0.03	2.11 (0.48 - 9.39)	0.330
6	C	G	C	0.07	0.01	0.10	<b>0.13 (0.02 - 0.71)</b>	<b>0.019</b>
7	T	G	C	0.05	0.05	0.10	0.10 (0.01 - 1.86)	0.110
8	C	G	G	0.02	0.03	0.03	0.41 (0.04 - 4.10)	0.450

N° C – número de combinações. FT – Frequência total: Fonte: autora

Em relação a interação rs2234759\*rs6295, não houve efeito principal dos genótipos e alelos na preferência diurna para ambos os polimorfismos. Além disso, não houve efeito de interação entre os *SNPs* na preferência diurna no grupo genotípico ( $F(3,160) = 2,52$ ,  $p = 0,059$ ,  $\omega^2 = 0,045$  e alélico ( $F(1, 332) = 0,419$ ,  $p = 0,518$ ,  $\omega^2 = 0,014$ ). Entretanto, quando apenas os grupos de matutinos e vespertinos foram analisados, um efeito significativo da interação rs2234759\*rs6295 na preferência diurna foi observado para os genótipos (tabela 40).

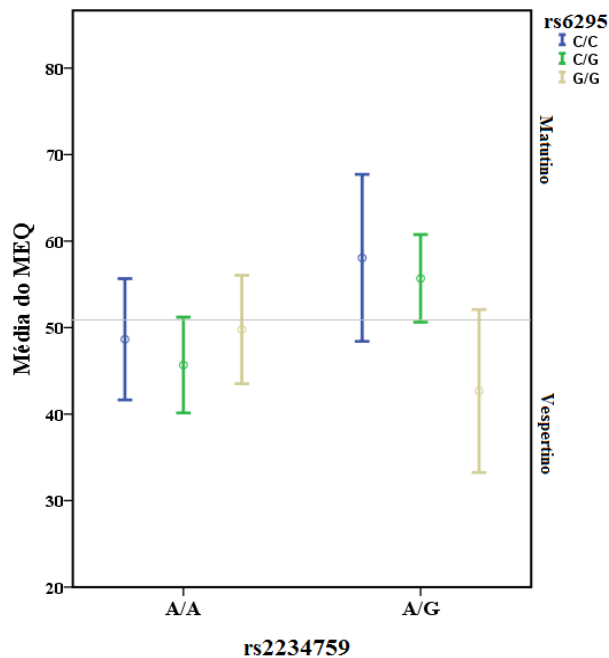
**Tabela 40 - ANOVA fatorial para a preferência diurna em função dos genótipos dos polimorfismos rs2234759 e rs6295 (n=112)**

Fonte	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F(105)	p	$\omega^2$
Modelo Corrigido	5599,59	6	933,26	2,23	0,046	0,11
rs2234759	1251,43	2	625,71	1,49	0,229	0,02
rs6295	752,05	2	376,02	0,89	0,410	0,01
rs2234759*rs6295	2996,10	2	1498,05	3,58	0,031	0,06
<b>Total</b>	323871	112				

Fonte: Autora

Um teste post hoc mostrou que a combinação A/G;G/G apresenta uma média menor dos valores do MEQ ( $M = 42,67$  e  $DP = \pm 17,02$ ), ou seja vespertinos, comparada com os A/G;C/C ( $M = 58,06$  e  $DP = \pm 18,77$ ) e A/G; C/G ( $M = 55,69$  e  $DP = \pm 14,75$ ) ( $F(1, 46) = 4,35$ ,  $p = 0,018$ ,  $\omega = 0,10$ ) (figura 29). Não houve efeito de interação para os alelos do polimorfismo (tabela 41). Entretanto, quando as frequências desses alelos foram testadas quanto aos grupos matutinos e vespertinos, a combinação alélica G-C foi associada com a matutuidade (OR = 0,25 95%IC [0,08 – 0,73],  $p = 0,013$ ) (tabela 42).

**Figura 29 - Diferença das médias dos valores do MEQ nas diferentes combinações genóticas dos SNPs rs2234759 e rs6295.**



Barras: IC de 95%. Fonte: Autora

**Tabela 41 -ANOVA fatorial para a preferência diurna em função dos alelos dos polimorfismos rs2234759 e rs6295 (n=168)**

Fonte	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	$F(332)$	$p$	$\omega^2$
Modelo Corrigido	1827,35	3	609,11	2,07	0,103	0,01
rs2234759	1114,84	1	1114,84	3,79	0,052	0,01
rs6295	1090,50	1	1090,50	3,71	0,055	0,01
rs2234759*rs6295	122,88	1	122,88	0,41	0,518	0,00
<b>Total</b>	938088	336				

Fonte: Autora



**Tabela 42 – Frequência das diferentes combinações alélicas (“haplótipos”) para os polimorfismos rs2234759 e rs6295 nos grupos matutinos e vespertinos (n = 112)**

N° C	rs2234759	rs6295	FT	Vespertino	Matutino	OR (95% CI)	p
1	A	G	0.40	0.42	0.38	1.00	---
2	A	C	0.34	0.36	0.33	1.04 (0.53 - 2.03)	0.91
3	G	C	0.13	0.07	0.21	<b>0.25 (0.08 - 0.73)</b>	0.013
4	G	G	0.10	0.15	0.06	1.55 (0.50 - 4.77)	0.45

N° C – número de combinações. FT – Frequência total: Fonte: autora

Já o resultado da ANOVA fatorial para os polimorfismos rs4753426\*rs6295 demonstrou que não houve efeito principal de ambos os *SNPs* na preferência diurna e nenhuma interação foi encontrada para o grupo genotípico (tabela 43). No entanto, um efeito da interação rs4753426\*rs6295 com preferência diurna foi achado para o grupo alélico ( $F(1, 332) = 5,39, p = 0,021, \omega^2 = 0,014$ ) (tabela 44).

**Tabela 43 - ANOVA fatorial para a preferência diurna em função dos genótipos dos polimorfismos rs4753426 e rs6295 (n=168)**

Fonte	Soma quadrática	Degraus de liberdade	Média quadrática	F(159)	p	$\omega^2$
Modelo Corrigido	3600,20 <sup>a</sup>	8	450,02	1,55	0,143	0,07
rs4753426	312,04	2	156,02	,539	0,585	0,00
rs6295	1044,75	2	522,37	1,80	0,168	0,02
rs4753426*rs6295	1879,77	4	469,94	1,62	0,171	0,03
Total	469044	168				

Fonte: Autora

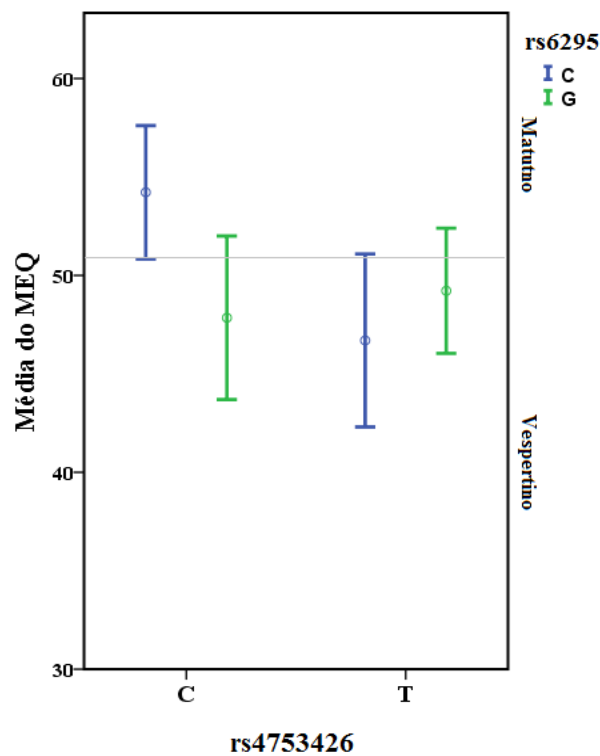
**Tabela 44 - ANOVA fatorial para a preferência diurna em função dos alelos dos polimorfismos rs4753426 e rs6295 (n=168)**

Fonte	Soma quadrática	Degraus de liberdade	Média quadrática	F(332)	p	$\omega^2$
Modelo Corrigido	777466,10	1	777466,10	2675,68	0,000	0,89
rs4753426	294,07	1	294,07	1,01	0,315	0,00
rs6295	751,14	1	751,14	2,58	0,109	0,00
rs4753426*rs6295	1568,75	1	1568,75	5,39	0,021	0,01
Total	938088	336				

Fonte: Autora

A figura 30 mostra que a combinação alélica C-C apresenta uma média dos valores do MEQ maior ( $M = 54,22$  e  $DP = \pm 17,08$ ), ou seja, mais matutinos, que as combinações T-C ( $M = 46,70$  e  $DP = \pm 16,40$ ;  $t(154) = 2,70$ ,  $p = 0,008$ ,  $d = 0,67$ ) e C-G ( $M = 47,85$  e  $DP = \pm 18,54$ ;  $t(177) = 2,38$ ,  $p = 0,018$ ,  $d = 0,629$ ). Esse resultado indica que os sujeitos são mais vespertinos na presença tanto do alelo T do polimorfismo do receptor MT2 quanto G do receptor 1 A da 5-HT.

**Figura 30 - Diferença das médias dos valores do MEQ nas diferentes combinações alélicas dos SNPs rs4753426 e rs6295**



Barras: IC de 95%. Fonte: Autora

## 8- DISCUSSÃO

A associação de polimorfismos em genes circadianos com preferência diurna 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). Entretanto, pouca atenção tem sido dada em relação a polimorfismos em genes não circadianos (OJEDA et al., 2013; BARCLAY et al., 2010; KOIKE et al., 2013).

Em nosso estudo, nenhuma diferença foi encontrada entre as médias dos valores do questionário de MEQ (preferência diurna) com relação aos sexos feminino e masculino, corroborando com alguns dados encontrados na literatura (PAINE; GANDER; TRAVIER, 2006; ZIMMERMANN, 2011). No entanto, a maior parte dos estudos tem demonstrado que mulheres tendem a ser mais matutinas que os homens (NATALE; DANESI, 2002; ROENNEBERG et al., 2004; RANDLER, 2007; NATALE; DIMILIA, 2011; RANDLER, 2011; TONETTI et al., 2011; BORISENKOV et al., 2012; DUARTE et al., 2014). Diferenças na preferência diurna entre os sexos podem estar relacionada com os padrões de sincronização entre homens e mulheres (ADAN; NATALE, 2002), além da influencia socio-cultural (PARK et al., 1997),

Uma diferença consistente nos hábitos de sono (exceto na duração do sono nos finais de semana) e *jetlag* social foi encontrada entre os cronotipos, ratificando os achados de diversos estudos (TAILLARD et al., 1999; MORGRAIN et al., 2004; ROEPKE; DUFFY, 2010; BAKOTIC; RADOSEVIC-VIDACEK; BJELAJAC, 2016; PAINE; GANDER, 2016; WITTMANN et al., 2006a; LEVANDOVSKI et al., 2011). Pessoas matutinas e vespertinas diferem em seu período endógeno, com períodos curtos associados com matutividade e períodos longos com vespertinidade (DUFFY et al., 1999). Assim, tipos vespertinos preferem dormir e acordar em horários mais avançados que os matutinos (PAINE; GANDER, 2016).

Contudo, durante os dias de semana, os vespertinos precisam acordar cedo para atenderem a pressão social dos horários de estudo e trabalho, resultando assim, em uma duração do sono menor que a dos matutinos (RUSSO et al., 2007; KAUDERER; RANDLER, 2013). Já durante os finais de semana, quando estão livres de seus compromissos sociais, ambos cronotipos demonstraram uma duração do sono semelhante (MORGRAIN et al., 2004; LEHNKERING; SIEGMUND, 2007; PAINE; GANDER, 2016). Além disso, o débito de sono acumulado pelos vespertinos durante os dias de semana tende a ser compensado nos finais de

semana. Por isso, os vespertinos possuem um valor maior de *jetlag* social quando comparados com os matutinos (WITTMANN et al., 2006a; LEVANDOVSKI et al., 2011).

### 8.1 Polimorfismos no transportador e receptor da 5-HT

A 5-HT tem sido considerada o principal neurotransmissor dos NRM, a terceira via aferente mais importante do NSQ (GILLETTE, 2002). Aplicações de 5-HT resultam no deslocamento (avanço) de fase dos ritmos circadianos em estudos *in vitro* e *in vivo* (GLASS et al., 2000, 2003; SPROUSE et al., 2004). Esse efeito da 5-HT na ritmicidade circadiana parece ser mediado através de seus receptores localizados no NSQ (EHLEN et al., 2001; SPROUSE et al., 2004; SMITH et al., 2008). Em nossos dados, nenhuma associação significativa foi encontrada entre as frequências genótípicas e alélicas dos polimorfismos 5-HTTLPR e rs2020933 (no transportador da 5-HT) e rs6295 (no receptor da 5-HT) com preferência diurna, quando analisados individualmente.

Os polimorfismos rs2020933 e rs6295 foram associados a diferentes fenótipos psiquiátricos (STROBEL et al., 2003; HUEZO-DIAZ et al., 2009; YU et al., 2013; KISHI et al., 2013) e resposta a antidepressivos – rs6295 (LEMOND et al., 2004), contudo, esse é o primeiro estudo a correlacioná-los com a preferência diurna (base de dados: PubMed, descritores: “rs2020933” AND “diurnal preference ” or “rs6295” AND “diurnal preference”, último acesso em: 10 de junho de 2017). Um segundo polimorfismo no gene *SLC6A4*, o 5-HTTLPR, tem sido investigado em uma variedade de fenótipos, incluindo a preferência diurna e o fenótipos do sono (CARSKADON et al., 2012; HARTMANN et al., 2014; DEUSCHLE et al., 2010).

Ojeda e colaboradores (2013) mostraram uma diferença significativa entre os genótipos do 5-HTTLPR e os valores de CSM (*Composite Scale of Morningness*; maiores valores indicam matutinos) em um modelo genético sobredominante (heterozigoto vs. homozigotos), indicando que os sujeitos heterozigotos são mais matutinos que os demais genótipos e sugerindo assim, um efeito de heterose. Nenhuma diferença foi encontrada em relação aos alelos desse polimorfismo (OJEDA et al., 2013). Diferentemente desse estudo, Barclay e colaboradores (2011) não encontraram efeito significativo do polimorfismo 5-HTTLPR nas médias dos valores do MEQ em uma amostra da população inglesa, corroborando assim com os nossos achados.

Embora nenhuma associação com preferência diurna tenha sido encontrada entre os três polimorfismos individualmente, o resultado da ANOVA fatorial demonstrou um efeito

significativo da interação 5-HTTLPR\*rs2020933\*rs6295 nas médias dos valores do MEQ, demonstrando que indivíduos que carregam a combinação genotípica S/S; A/A; C/G são mais matutinos comparados com aqueles que possuem as composições S/S; A/T; C/G e S/S; A/A; G/G (diferença entre as médias: 40,5 e 35,17 respectivamente).

Estudos sugerem que a regulação gênica do *SLC6A4* é determinada por um conjunto de efeitos regulatórios exercidos por diferentes variantes dessa mesma unidade (MARTIN et al., 2007; WRAY et al., 2009; STRUG et al., 2010). Diferenças na expressão e função do 5-HTT foram relacionadas com as variantes alélicas do polimorfismo 5-HTTLPR (HEILS et al., 1996, HEILS; MÖSSNER; LESCH 1997). Estudos utilizando gene repórter mostraram que o alelo S reduz a transcrição do gene *SLC6A4*, resultando na baixa expressão do 5-HTT e captação da 5-HT (HEILS; MÖSSNER; LESCH, 1997; GREENBERG et al., 1999).

Adicionalmente, foi reportado que o SNP rs2020933 (localizado no primeiro íntron do gene *SLC6A4*, a 870pb do final do primeiro exon não codificante) contribui com a regulação genica do *SLC6A4* e encontra-se em desequilíbrio de ligação como o polimorfismo 5-HTTLPR (HUEZO-DIAZ et al., 2009). Assim, haplótipos desses polimorfismos poderiam contribuir mais significativamente para a variação na expressão do gene *SLC6A4* e sua associação com variantes fenotípicas (MARTIN et al., 2007) tais como a preferência diurna.

Um terceiro SNP (rs6295) localizado no promotor do gene *HTR1A*, que também participa da neurotransmissão da 5-HT, tem sido relacionado com a regulação da expressão de seus receptores (CZESAK et al., 2006). A mudança de C → G altera o sítio de ligação para os fatores de transcrição Deaf-1 e Hes5, e resulta no aumento da expressão dos auto receptores 5-HT1A pré-sinápticos, induzindo a hiperpolarização dos neurônios serotoninérgicos, diminuição dos disparos neuronais e, conseqüentemente, a liberação da 5-HT (ALBERT, 2012; DONALDSON et al., 2016).

Pesquisas têm descrito a interação biológica entre o 5-HT1A e o 5-HTT (LI et al., 2000; DAVID et al., 2005; ZHANG et al., 2009; GU et al., 2013). Estudos com modelo animal mostraram que a expressão do 5-HT1A é reduzida em camundongos *knock-out* para 5-HTT (LI et al., 2000). Resultados obtidos por tomografia por emissão de pósitrons demonstram que os valores dos potenciais de ligação do 5-HT1A foram reduzidos em indivíduos com os genótipos S/S e S/L comparados com os L/L (DAVID et al., 2005). Assim, uma possível explicação para nossos achados seria que, a adição de um alelo T (variante do SNP 5-HTTLPR) ou dois alelos G (variante do SNP rs6295) na S/S; A/-; -/G diminuiria a concentração de serotonina nos neurônios do NSQ, resultando assim em um atraso na fase

circadiana que levaria a vespertinidade. De fato, a frequência da combinação alélica S-A-T foi menos frequente em sujeitos vespertinos (12%) que nos matutinos (27%).

Em relação aos hábitos de sono e os três polimorfismo da 5-HT, houve uma diferença significativa na interação ‘5-HTTLPR<sub>(genótipo)</sub>\*preferência diurna’ apenas para os horários de ir dormir nos dias de trabalho, demonstrando que dentro do grupo vespertino, indivíduos com genótipo L/S vão dormir mais cedo comparados com os genótipos L/L e S/S. Já os resultados da interação ‘preferência diurna\*rs2020933<sub>(alelo)</sub>’ para o segundo polimorfismo do SLC6A4 mostraram que houve uma diferença significativa nas médias dos horários de dormir/acordar, do ponto médio do sono nos dias de estudo e do horário de dormir nos finais de semana em relação aos alelos A e T no grupo de vespertinos. Isso mostra que nesse grupo, sujeitos que possuem o alelo A dormem e acordam mais cedo que os portadores do alelo T e, conseqüentemente, apresentam um ponto médio do sono maior nos dias de estudo.

As análises envolvendo o polimorfismo rs6295 do receptor 5-HT1A não demonstraram nenhuma diferença significativa entre os hábitos do sono para os dias de estudo e finais de semana e nos genótipos e alelos desse SNP, demonstrando que em nossa amostra, esse polimorfismo não está relacionado aos hábitos de sono. Contudo, estudos mostram que o receptor 5-HT1A pode estar envolvido na mediação dos efeitos da 5-HT no sono (PORTAS et al., 1996; BJORVATN et al., 1997, 1998; SEIFRITZ et al., 1996; TISSIER et al., 1993). A administração do antagonista 8-OH-DPAT desse receptor demonstrou uma melhora no despertar e uma redução do sono REM (BJORVATN et al., 1997). O agonista ipsapiron foi relacionado com um aumento na atividade das ondas lentas em humanos (SEIFRITZ et al., 1996) e em ratos (TISSIER et al., 1993),

O sono é regulado basicamente por dois processos: o homeostático e o circadiano (BORBÉLY; ACHERMANN, 1999). Lesões no NSQ de primatas causam, além da perda dos ritmos circadianos, um aumento no tempo total da duração do sono (SCHWARTZ; ROTH, 2008). A serotonina pode causar deslocamento de fase dos ritmos circadianos, dependendo da fase que é administrada (PROSSER e al, 2000). Agonistas da 5-HT induzem o adiantamento de fase durante o dia subjetivo (CT6) *in vitro* (PROSSER, 2003; MEDANIC; GILLETTE, 1992; SPROUSE et al., 2004) e também *in vivo* (COLECCHIA et al., 1996; CUTRERA et al., 1996; BARTOSZEWICZ et al., 2010). Adicionalmente, o neurotransmissor 5-HT participa da regulação do sono (MONTI; PANDI-PERUMAL; SINTON, 2008).

Uma possível explicação para esses resultados seria que o genótipo L/S (do polimorfismo 5-HTTLPR) ou o alelo A (do SNP rs2020933), quando comparados com suas repecticas variantes, poderiam causar um aumento (1) na regulação gênica do *SLC6A4*, (2) na

concentração dos seus transportadores e (3) no aumento da 5-HT excretada na fenda sináptica. O aumento da concentração de 5-HT no NSQ, por sua vez, resultaria em um adiantamento de fase dos ritmos circadianos de vigília/sono, permitindo assim com que indivíduos heterozigotos fossem para a cama mais cedo comparados com ambos os homozigotos e, que sujeitos com o alelo A dormissem e acordassem em horários mais adiantados que aqueles com o T.

Contudo, nenhuma diferença foi encontrada para os alelos L e S, sugerindo um efeito de heteroze (COMINGS; MACMURRAY, 2000), o qual só poderia ser observado nas combinações genótípicas, visto que, nas análises alélicas, os indivíduos heterozigotos contribuem igualmente para ambas as variantes gênicas. Assim, se um caráter se expressa por heterozigose o poder de detecção do mesmo passaria a ser diminuído. De fato, a heterose molecular (quando o heterozigoto de um polimorfismo simples mostra um efeito significativamente maior ou menor para um determinado traço comparado com os homozigotos) foi descrita para o gene *SLC6A4* (COMINGS; MACMURRAY, 2000).

Comparados com matutinos, indivíduos vespertinos apresentam uma irregularidade em seus horários de sono e uma flexibilidade maior para dormir em diferentes horários (BREITHAUPT et al., 1978; HILLIKER et al., 1992), que pode ser evidenciada nas diferenças entre os dias de estudo/trabalho e finais de semana (TAILLARD; PHILIP; BIOULAC, 1999; CROWLEY; CARSKADON, 2010). Adicionalmente, tipos matutinos acumulam uma pressão homeostática mais rápida durante o dia e a dissipam rapidamente durante a noite comparado com os vespertinos (SCHMIDT et al., 2009; MONGRAIN; CARRIER; DUMONT, 2006). Provavelmente por causa disso, as diferenças nos horários dos hábitos de sono foram encontrados no grupo vespertino e não nos matutinos.

## **8.2 Polimorfismo no rs2234759 do receptor NPY2**

O receptor NPYR2 tem sido relacionado com o avanço de fase dos ritmos circadianos, apresentando um importante papel na transmissão dos sinais vindo do TGH e, por sua vez, na modulação desses ritmos (GOLOMBEK et al., 1996; HUHMAN et al., 1996). O polimorfismo rs2234759 tem sido associado com fenótipos tais como memória icônica (ARNING et al., 2014) e início da doença de Huntington (KLOSTER et al., 2014). No entanto, nenhuma associação foi encontrada entre os genótipos e os alelos desse polimorfismo com preferência diurna em nossos dados.

Wang e colaboradores (2007) também não encontraram associação desse SNP com obesidade entre crianças e adolescentes. Todavia, nosso estudo é o primeiro a correlacionar um polimorfismo no gene *NPYR2* com preferência diurna (base de dados: PubMed, descritores: “rs2234759” AND “diurnal preference”, acessado em 10 de junho de 2017). Uma possível explicação para esses achados poderia estar relacionada ao tamanho amostral de cronotipos extremos utilizado.

Em relação aos hábitos de sono, uma diferença significativa foi encontrada entre as médias da duração do sono nos dias de estudo e os alelos do polimorfismo rs2234759, demonstrando que indivíduos com o alelo G dormem mais durante os dias da semana do que os sujeitos que possuem o alelo A. O NPY tem sido considerado um fator de regulação do sono, porém o mecanismo pelo o qual essa modulação acontece ainda é desconhecido (MONTI; PANDI-PERUMAL; SINTON, 2008).

Como o SNP rs2234759 está localizado na região promotora do gene *NPYR2* e o alelo G foi associado com uma maior atividade relativa da luciferase em ensaios *in vitro* (KLOSTER et al., 2014), uma provável justificativa para a diferença na duração do sono seria que o alelo G resultaria no aumento dos níveis do receptor NPY2, causando assim um avanço na sua ativação. Esse avanço, por sua vez, levaria a um adiantamento no horário de ir dormir e, portanto, a uma duração do sono maior nos dias de estudo. Nos finais de semana, quando os sujeitos tendem a expressar sua preferência endógena, pois estão livres dos compromissos sociais de estudo e trabalho, nenhuma diferença foi encontrada na duração do sono.

Em relação à interação ‘preferência diurna\*rs2234759’ nenhum efeito foi encontrado para os hábitos de sono nos dias de estudo/trabalho e finais de semana entre os grupos matutinos e vespertinos. Em humanos, o NPY tem sido relacionado com a promoção do sono e modulação do sono REM (DYZMA et al., 2009). A aplicação intravenosa de NPY em sujeitos saudáveis diminui a latência do sono e o primeiro período do sono REM, além de aumentar o estágio 2 do sono e o tempo de sono (ANTONIJEVIC et al., 2000). Em um estudo envolvendo pacientes depressivos, a injeção de NPY mostrou uma diminuição da latência de início do sono, enquanto os níveis dos hormônios adrenocorticotrófico e cortisol não foram afetados (HELD et al., 2006). Os níveis plasmáticos do NPY foram significativamente menores em pacientes com insônia primária comparado com os padrões de sono normais dos controles (HUANG et al., 2015).

Esses achados indicam que o NPY pode participar da regulação do sono atuando principalmente no horário do início do sono como um antagonista do hormônio liberador da corticotrofina através dos receptores GABA (STEIGER, 2003). Assim, dada a importância do



NPY no sono, esse é o primeiro estudo a fazer uma correlação entre hábitos de sono com o polimorfismo rs2234759 no gene desse receptor. De fato, poucos estudos têm sido realizados com variantes nos genes dos receptores NPY (HUNT et al., 2011; SIDDIQ et al., 2007; KLOSTER et al., 2014; SATO et al., 2010; ARNING et al., 2014).

### 8.3 Polimorfismo rs1805247 no gene da subunidade GRIN2B do receptor NMDA

Os receptores NMDA foram descritos como sendo os principais receptores envolvidos na via aferente do TRH (COLWELL, 2001; BENDOVIĆ et al., 2012). A subunidade GRIN2B possui um papel importante para a funcionalidade desse receptor. Polimorfismos nesse gene têm sido associado com vários fenótipos neurológicos transtorno bipolar, esquizofrenia e transtorno obsessivo compulsivo (WEICKERT e al., 2013; KOHLRAUSCH et al., 2016). Em nossos resultados nenhuma diferença significativa foi encontrada para as frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo rs1805247 do gene da subunidade GRIN2B do receptor NMDA com preferência diurna. Uma diferença entre as médias dos hábitos da duração do sono nos dias de estudo foi observada para as variantes desse SNP. Com relação às análises da interação ‘preferência diurna\*rs1805247’, nenhum efeito foi encontrado para todos os hábitos de sono, demonstrando assim que esse polimorfismo não tem associação com essas variáveis em nossa amostra.

Glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central. Em mamíferos, aproximadamente 70% das sinapses contem receptores do tipo NMDA ou AMPA (MITCHELL; BAKER, 2009). Rs1805247 é um polimorfismo no exon 13 do gene da subunidade GRIN2B do receptor NMDA. Os diferentes alelos desse SNP alteram a base na sequência de do DNA, mas não o aminoácido codificado. Alterações na estrutura dessa subunidade poderiam estar relacionadas a mudança de fase nos ritmos circadianos através da resposta ao Ca<sup>+</sup> mediada pela ativação dos receptores NMDA nos neurônios do NSQ (COLWELL, 2001; PENNARTZ et al., 2001).

Adicionalmente, pesquisas têm mostrado um possível papel desses receptores no sono. Em camundongos mantidos em regime de privação de sono por 24 horas, foi observada uma redução da expressão dos receptores de superfície do NMDA (CHEN et al., 2006). O uso do NPC 12626, antagonista competitivo do receptor NMDA, reduziu significativamente as duas medidas do sono paradoxal, fornecendo evidências de que o antagonista para o NMDA resulta em padrões anormais de sono (STONE; WALKER; GOLD, 1992). Estudo em *Drosophila*

(TOMITA et al., 2015) também tem demonstrado um possível papel do NMDA na regulação do sono. Tatsuki e colaboradores. (2016) mostraram que o uso de antagonistas para NMDA em camundongos selvagens resultou em uma diminuição significativa na duração do sono. Indivíduos portadores do alelo G para o polimorfismo rs1805247 mostraram um aumento na facilitação intracortical e no potencial de longa duração após estimulação magnética (MORI et al., 2011). Assim, uma possível explicação para a diferença encontrada na duração do sono nos dias de estudo seria que a presença de dois alelos G aumentaria a atividade do receptor e o influxo de Ca<sup>+</sup>, resultando no avanço de fase do ritmo circadiano e conseqüentemente na duração do sono maior.

#### **8.4 Polimorfismo rs4753426 do receptor MT2**

Evidências indicam que a MLT está envolvida na regulação dos ritmos circadianos principalmente através da ativação dos receptores MT2 (DUBOCOVICH, 2007; PFEFFER et al, 2012). Alterações genéticas nesse receptor têm sido associadas com uma variedade de fenótipos tais como obesidade, depressão e diabetes (WANG et al., 2015; GALECKA et al., 2011; ZHAN et al., 2015). Em nosso estudo, uma associação significativa foi encontrada entre os alelos do polimorfismo rs4753426 no gene *MTNR1B* com preferência diurna, com a frequência do alelo C (62%) maior no grupo de matutinos comparado com os vespertinos (47%).

Ji e colaboradores (2010) investigaram a correlação entre o polimorfismo rs4753426 e a duração da incidência solar entre diferentes populações ao redor do mundo. Eles encontraram uma correlação negativa entre o alelo C e a duração diária da incidência solar, sugerindo que esse alelo derivado pode promover uma vantagem seletiva às populações adaptadas a diferentes durações de incidência solar e, conseqüentemente, uma adaptação mais eficiente as variações sazonais.

Se considerarmos que a curta duração de luz solar aumenta a duração da melatonina secretada (ADAMSSON; LAIKE; MORITA, 2016), uma adaptação fisiológica poderia ser a seleção de variantes genéticas nos receptores da melatonina que balanceariam esse aumento da melatonina, resultado em um impacto nos ritmos circadianos e na homeostase do sono. Adicionalmente, nós encontramos uma associação do alelo T com o grupo que tem uma duração do sono maior que 8 horas nos finais de semana (dados não mostrados), sugerindo que esse alelo poderia modular o papel da melatonina na regulação circadiana do sono (GANDHI et al., 2015).

Uma possível explicação para esses resultados é que, desde que o polimorfismo rs4753426 está localizado na região promotora, o alelo -1193C poderia ser responsável pela diminuição dos níveis de MT2, resultando no atraso da ativação da melatonina. Além disso, uma lenta dessensibilização dos receptores MT2 nos sujeitos portadores do alelo -1193T poderia contribuir com uma prolongada transdução do sinal da melatonina levando a uma duração do sono mais longa (GERDIN et al., 2004).

Essa hipótese poderia explicar também outros dois achados: (1) a alta frequência do alelo C no grupo matutino, que poderia expressar uma inativação rápida da melatonina nas horas iniciais do dia e, (2) a baixa frequência desse alelo nas populações expostas a longas incidências solares (JI et al., 2010), que pode levar ao aumento dos níveis de MT2, compensando assim a baixa síntese de melatonina nesse ambiente. Contudo essas especulações devem ser funcionalmente validadas.

Estudos *in vitro* (HUNT et al., 2001; DUBOCOVICH et al., 2005; GERDIN et al., 2004) e *in vivo* (DUBOCOVICH et al., 1998; PFEFFER et al., 2012) têm demonstrado que o adiantamento de fase causado pela MLT no NSQ é mediado através da ativação do receptor MT2, dependendo da dose e da sensibilidade em sua CRF (McARTHUR et al., 1997; GERDIN et al., 2004). Pesquisas sugerem que o deslocamento de fase mediado pelo MT2 ocorre através do aumento da atividade da proteína quinase C (PKC) (HUNT et al., 2001; McARTHUR et al., 1997; RIVERA-BERMUDEZ et al., 2004). A ativação da PKC, por sua vez, é necessária para induzir mudanças nos genes circadianos *Per1* and *Per2* (KANDALEPAS et al., 2016). Assim, alterações genéticas no MT2 poderiam contribuir para a modulação do sistema circadiano e na expressão de seus fenótipos.

### **8.5 Interação entre os polimorfismos rs2234759 no gene do *NPYR2*, rs4753426 do gene *MTNR2* e rs6295 do gene *HTR1A* com preferência diurna**

O resultado da ANOVA fatorial mostrou um efeito de interação significativo entre os alelos dos polimorfismos rs2234759, rs4753426 e rs6295 na preferência diurna. As combinações alélicas C-A-C e C-A-G tiveram uma média maior dos valores do MEQ comparado com as combinações C-A-G e T-A-C, mostrando que portadores dessa combinação são mais matutinos comparados com os C-A-G e T-A-C.

Uma análise das frequências desses alelos entre matutinos e vespertinos confirmara que as combinações C-A-C (matutinos: 25% e vespertinos: 17%) e C-A-G (matutinos: 10% e vespertinos: 1%) estão associados com a matutividade, enquanto que, a combinação T-A-C

foi associada com a vespertinidade (matutinos: 8% e vespertinos: 20%). Todas essas diferenças nas combinações alélicas entre matutinos e vespertinos mostram uma interação entre polimorfismos de genes envolvidos nas diferentes vias aferentes do NSQ na modulação do fenótipo circadiano (preferência diurna).

A 5-HT, derivada do triptofano, exerce sua função através de diferentes receptores expressos no sistema nervoso central e periférico (MILLAN et al., 2008). A MLT, por sua vez, é derivada da 5-HT e se liga com alta afinidade aos seus receptores MT1 e MT2 (JOCKERS et al., 2008). Os receptores de 5-HT e da MLT pertencem à classe da superfamília de proteínas acopladas a proteína G. Apesar dessa similaridade, pouquíssimos estudos têm focado na comunicação entre as transmissões serotoninérgicas e melatonérgicas (PROSSER, 2000; CHENU et al., 2014; KAMAL et al., 2015). Esses estudos têm demonstrado uma potencial interação funcional entre essas cascatas de sinalização.

De fato, um efeito de interação também foi encontrado para os polimorfismos dos genes dos receptores 5-HTR1A e MT2, com a combinação alélica C-C tendo uma média do MEQ significativamente maior comparado com a combinação C-G, ou seja, os indivíduos C-C apresentam serem mais matutinos que os C-G. Esse resultado sugere uma possível interação na transmissão de sinal entre essas vias que regulam a ritmicidade circadiana. Entretanto, não houve associação entre essas combinações alélicas e os grupos matutinos e vespertinos.

Além de sua participação na via de síntese da MLT, a 5-HT também estabelece comunicação com o neuropeptídeo Y através da conexão com o FIL. Dois componentes anatômicos do sistema circadiano, o SQN e o FIL, recebem conexões serotoninérgicas dos núcleos da rafe medial (MEYER-BERNSTEIN; MORI, 1996). Estudos indicam que as fibras serotoninérgicas do FIL vindas do NRM podem atuar no deslocamento de fase através da ativação do TGH e suas terminações no NSQ (MINTZ et al., 1997; CHALLET et al., 1998). Assim, a 5-HT e o NPY poderiam atuar na mudança de fase induzida pela luz durante a noite (REA; GLASS; COLWELL, 1994).

A sensibilidade do SCN é similar para NPY:5HT, causando deslocamento de fase em animais noturnos e modulando a resposta aos sinais fóticos a noite (MEDANIC; GILLETTE et al., 1992; YANNIELLI, 2000). Tais achados indicam uma possível interação de ambos os receptores na regulação dos ritmos circadianos. Por sua vez, nossos dados mostraram um efeito de interação entre os polimorfismos dos receptores rs2234759 e rs6295 nos genes do *NPY2* e *HTR1A* com preferência diurna. A combinação genotípica A/G; G/G mostrou uma média significativamente menor do MEQ comparado com as outras duas combinações A/G;

C/C e A/G; C/G, demonstrando assim, que sujeitos portadores dos genótipos A/G; G/G são mais vespertinos comparados com as demais combinações.

Adicionalmente, as análises da frequência das combinações alélicas desses polimorfismos indicaram uma associação entre a combinação G-C com a matutividade (matutinos: 21% e vespertinos: 7%). Uma possível explicação para todos esses achados seria que, como os polimorfismos rs2234759, rs4753426 e rs6295 tenham sido descritos como sendo funcionais, ou seja, que podem contribuir para a regulação da transcrição de seus genes (LEMONDE et al., 2004; KLOSTER et al., 2014), o efeito aditivo de suas variantes poderia resultar em uma diminuição dos produtos desses receptores e assim, contribuir mais eficientemente para o deslocamento da fase circadiana (adiantamento ou atraso), que pode ser expresso fenotipicamente como preferência diurna.

#### **8.6 Interação dos polimorfismos rs2020933 no gene *SLC6A4*; 43pb ins/del no gene *SLC6A4*, rs2234759 no gene *NPYR2*; rs1805247 no gene *GRIN2B*; rs4753426 no gene *MTNR1B* e rs6295 no gene *HTR1A* com *jetlag* social**

Os horários de estudo e trabalho impostos pela sociedade interferem na preferência individual do sono, matutinos e vespertinos diferem significativamente em suas preferências nos horários de dormir/acordar e realizar suas atividades (KALMBACH et al., 2016). Assim, os horários sociais podem resultar em um aumento no débito de sono durante a semana, o qual é compensado nos finais de semana, para os vespertinos e; um débito de sono nos finais de semana para os matutinos (WITTMANN et al., 2006). De fato, uma correlação negativa foi encontrada com a preferência circadiana corroborando com os achados da literatura (WITTMANN et al., 2006; LEVANDOVSKI et al., 2011). Entretanto, nenhuma diferença significativa foi encontrada entre as frequências genotípicas e alélicas de todos os polimorfismos estudados com o *jetlag* social. Além disso, nenhum efeito de interação foi observado para ambos os alelos e genótipos.

Os resultados encontrados nesse trabalho mostraram uma diferença consistente nos hábitos de sono (exceto na duração do sono nos finais de semana) e *jetlag* social, corroborando com dados da literatura, em que, indivíduos matutinos acordam/dormem mais cedo e possuem menor valor de *jetlag* social que os vespertinos. Uma associação foi encontrada com preferência circadiana apenas nos alelos do polimorfismo rs4753426 entre os grupos de matutinos e vespertinos extremos, mostrando que o alelo C foi associado significativamente com matutividade.

O efeito de interação entre os diferentes polimorfismos\*preferência diurna nos hábitos de sono, sugerem a importância de alguns dos polimorfismos estudados nos hábitos de sono. Além disso, as diferentes análises de interações entre os polimorfismos demonstraram a importância das combinações entre as variáveis dos polimorfismos em genes que fazem de parte das diferentes vias aferentes do NSQ, mas não desses SNPs individualmente, na contribuição do fenótipo circadiano - preferência diurna. Assim, como os ritmos circadianos são fundamentais para a manutenção das funções celulares, o entendimento dos mecanismos envolvidos em sua regulação pode ser de suma importância, visto que, alterações nos ritmos circadianos têm sido relacionadas a uma variedade de padrões fisiológicos e comportamentais normais ou alterados.

## 9- LIMITAÇÕES

As limitações desse trabalho estão relacionadas (1) ao uso de questionários auto avaliativos. Contudo, os questionários de MEQ e MCTQ têm sido amplamente utilizados e validados em diferentes países. Além disso, ambos os questionários têm sido significativamente correlacionados com o período endógeno ( $\tau$ ) (KANTERMANN et al., 2015). (2) As análises genéticas, onde foram genotipados apenas os indivíduos matutinos e vespertinos extremos, com um igual número de intermediários. Esse método tem sido utilizado anteriormente para estudos de associação com preferência diurna com o intuito de reduzir a variância da amostra e aumentar o poder da genotipagem individualmente (ROBILLIARD et al., 2002). (3) A amostra escolhida, estudantes universitários necessitam de longas horas de estudo o que resulta em uma má qualidade de sono e horários de sono inapropriados (KANG et al., 2007). (4) A faixa etária escolhida, indivíduos com idade entre 18-30. Contudo, esse tipo de abordagem é utilizado para eliminar da análise a influência da variável idade (DÍAZ-MORALES, 2007). Além disso, o questionário de matutividade e vespertividade (MEQ) foi validado inicialmente em uma amostra de jovens adultos (HORNE; OSTBERG, 1976). (5) A localização geográfica, visto que a latitude e a longitude são fatores que influenciam a preferência diurna (RANDLER; RAHAFAR, 2017). Flutuações diárias na intensidade de luz e temperatura e mudanças sazonais variam consideravelmente em diferentes latitudes (CIARLEGLIO et al., 2008). (6) Ao background genético, pois devido a variabilidade genética, a associação encontrada em uma determinada população pode não ser replicada em outra. (7) A quantidade reduzida de polimorfismo analisados, visto que, existem diferentes componentes atuando nas vias aferentes do NSQ, com seus genes apresentando múltiplas variações genéticas.

## 10- CONCLUSÕES

A ritmicidade circadiana endógena é uma propriedade quase universal dos organismos, sendo sincronizada por fatores ambientais tais como o ciclo claro/escuro. Os ritmos circadianos são regulados molecularmente por alças de retroalimentação autorregulatórias envolvendo diferentes genes e suas respectivas proteínas. Desde a descoberta do primeiro gene circadiano - *Clock*, vários estudos têm investigado a associação de genes circadianos com preferência diurna em diferentes populações. Contudo, pouquíssima atenção tem sido dada a estudos de associação envolvendo genes não circadianos relacionados com a modulação dos ritmos circadianos centrais e nas vias sensitivas a luz.

Este estudo teve como enfoque correlacionar polimorfismos em genes de transportadores (5-HTT) e receptores (NMDA, NPY2, MT2 e 5-HTR1A) que participam das cascatas de sinalização das principais vias aferentes do NSQ, responsável pela manutenção da relação de fase entre todos os osciladores do organismo, com preferência diurna. Observou-se que o alelo C do polimorfismo -1193C/T (no gene *MTNR1B*) esteve mais frequente em tipos matutinos extremos. Além dessa variante individual, combinações entre diferentes SNPs foram correlacionadas com matutividade ou vespertividade.

Embora o estudo de fenótipos multifatoriais impossibilite uma relação direta de causa e efeito, esses resultados deixam claro a evidencia de que alterações em genes não circadianos contribuem para a preferência diurna, sugerindo assim, que alterações nos níveis ou mudanças nessas proteínas podem resultar na modulação do ritmo circadiano endógeno, ou seja, no adiantamento/atraso na fase circadiana, sendo refletida através dos cronotipos. Adicionalmente, os achados de interação entre preferência diurna e esses polimorfismos nos hábitos de sono sugerem também o envolvimento dessas alterações nas vias eferentes dos ritmos circadianos.

O presente estudo torna-se importante, pois adiciona informações relacionadas ao mecanismo genético da regulação circadiana. Assim, o entendimento dessa regulação pode contribuir para o desenvolvimento de estratégias para o tratamento distúrbios fisiológicos e comportamentais ligados as alterações dos ritmos circadianos. Contudo, outros estudos com backgrounds genéticos e condições ambientais diferentes são necessários para a replicação desses achados.



## 11- PRINCIPAIS ACHADOS

- 1 Os cronotipos apresentaram diferença nos hábitos de sono (exceto na duração do sono nos finais de semana) e *jetlag* social, corroborando com dados da literatura;
- 2 Uma associação foi encontrada entre os alelos do polimorfismo rs4753426 no gene *MTNR1B* com preferência diurna nos grupos de matutinos e vespertinos extremos, com o alelo C mais frequente em matutinos;
- 3 Nenhuma associação foi encontrada entre os genótipos e alelos dos polimorfismos rs2020933/5-HTTLPR no gene *SLC6A4*; rs2234759 no gene *NPYR2*; rs1805247 no gene *GRIN2B* e rs6295 no gene *HTR1A* e preferência circadiana;
- 4 Um efeito da interação entre os polimorfismos do transportador da 5-HT (5-HTTLPR e rs2020933) e do receptor da 5-HT (rs6295) nas médias dos valores do MEQ foi encontrado, demonstrando que a adição do alelo T ou do alelo G na sequência (S/S; -/A; -;- /G) diminui a média do MEQ comparado com a combinação S/S; A/A;C/G;
- 5 O efeito da interação 5-HTTLPR<sub>(genótipo)</sub>\*preferência diurna' nos horários de ir dormir nos dias de trabalho, foi significativamente diferente em vespertinos com genótipo L/S comparados com os genótipos L/L e S/S;
- 6 Os resultados da interação 'preferência diurna\*rs2020933<sub>(alelo)</sub>' foram significativos para as médias dos horários de dormir/acordar e do ponto médio do sono nos dias de estudo e do horário de dormir nos finais de semana em relação aos alelos A e T no grupo de vespertinos;
- 7 Uma diferença na média da duração do sono nos dias de estudo foi encontrada para os alelos do polimorfismo rs2020933;
- 8 Um efeito de interação foi encontrado entre os alelos dos polimorfismos rs2234759, rs4753426 e rs6295 na preferência diurna, com a média dos valores do MEQ sendo maior na combinação alélica C-A-C;
- 9 Nenhuma diferença foi encontrada entre os polimorfismos rs2020933/5-HTTLPR no gene *SLC6A4*; rs2234759 no gene *NPYR2*; rs1805247 no gene *GRIN2B*; rs6295 no gene *HTR1A* associada ao *jetlag* social.

## REFERÊNCIAS

- ABRAO, M. G. et al. Standardization of DNA extraction with NaCl from oral mucosa cells: application in PROP1 gene study. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 49, n. 6, p. 978-82, 2005.
- ADAMSSON, M.; LAIKE, T.; MORITA, T. Annual variation in daily light exposure and circadian change of melatonin and cortisol concentrations at a northern latitude with large seasonal differences in photoperiod length. **Journal of Physiological Anthropology**, v. 36, n. 1, p. 6, 2016.
- ADAN, A. et al. Circadian typology: a comprehensive review. **Chronobiology International**, v. 29, n. 9, p. 1153-75, 2012
- ALBERS, H. E.; FERRIS, C. F. Neuropeptide Y: role in light-dark cycle entrainment of hamster circadian rhythms. **Neuroscience letters**, v. 50, n. 1-3, p. 163-168, 1984.
- ALBERT, P. R. Transcriptional regulation of the 5-HT1A receptor: implications for mental illness. **Phil. Trans. R. Soc. B**, v. 367, n. 1601, p. 2402-2415, 2012.
- ALBRECHT, U.; EICHELE, G. The mammalian circadian clock. **Curr Opin Genet Dev**, v. 13, n. 3, p. 271-277, 2003.
- ALLEBRANDT, K. V; ROENNEBERG, T. The search for circadian clock components in humans: new perspectives for association studies. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 41, n. 8, p. 716-721, 2008.
- ANTLE, M. C.; SILVER, R. Orchestrating time: arrangements of the brain circadian clock. **Trends Neurosci**, v. 28, n. 3, p. 145-151, 2005.
- ANTONIJEVIC, I. A. et al. Neuropeptide Y promotes sleep and inhibits ACTH and cortisol release in young men. **Neuropharmacology**, v. 39, n. 8, p. 1474-1481, 2000.
- ARAÚJO, J. F.; MARQUES, N. Intermodulação de frequências dos ritmos biológicos. Cronobiologia: princípios e aplicações, **São Paulo: Edusp**, p. 99-117, 2003.
- 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, p.413-415. 2003.
- ARNING, L. et al. NPY2-receptor variation modulates iconic memory processes. **European Neuropsychopharmacology**, v. 24, n. 8, p. 1298-1302, 2014.
- ARRINGTON, M. E.; RUSAK, B. Lesions of the Thalamic Intergeniculate Leaflet Alter Hamster Circadian Rhythms. **Journal of Biological Rhythms**, v. 1, n. 4, p. 309-325, 1986.
- ASCHOFF, J. Circadian rhythms: influences of internal and external factors on the period measured in constant conditions. **Z Tierpsychol**, v. 49, n. 3, p. 225-249, 1979.

ASCHOFF, J. Estimates on the duration of sleep and wakefulness made in isolation. **Chronobiol Int**, v. 9, n. 1, p. 1-10, 1992

ASCHOFF, J. Handbook of behavioral neurobiology. Volume 4. Biological rhythms. Handbook of behavioral neurobiology. Volume 4. **Biological rhythms.**, 1981.

ASCHOFF, J. Masking and parametric effects of high-frequency light-dark cycles. **The Japanese journal of physiology**, v. 49, n. 1, p. 11–18, 1999.

BAEHR, E. K.; REVELLE, W.; EASTMAN, C. I. Individual differences in the phase and amplitude of the human circadian temperature rhythm: with an emphasis on morningness-eveningness. **Journal of sleep research**, v. 9, n. 2, p. 117–127, 2000.

BAKOTIC, M.; RADOSEVIC-VIDACEK, B.; KOSCEC BJELAJAC, A. Morningness-eveningness and daytime functioning in university students: the mediating role of sleep characteristics. **Journal of Sleep Research**, v. 26, n. 2, p. 210–218, 2016.

BARCLAY, N. L. et al. Diurnal preference and sleep quality: same genes? A study of young adult twins. **Chronobiology International**, v. 27, n. 2, p. 278–296, 2010.

BARCLAY, N. L. et al. Sleep quality and diurnal preference in a sample of young adults: associations with 5HTTLPR, PER3, and CLOCK 3111. **American Journal of Medical Genetics**, v. 156, n. 6, p. 681-690, 2011.

BARTOSZEWICZ, R. et al. Influence of short-term constant light on phase shift of mouse circadian locomotor activity rhythm induced by nist and antnist of serotonin. **Biological Rhythm Research**, v. 41, n. 4, p. 279–288, 2010.

BELL-PEDERSEN, D. et al. Circadian rhythms from multiple oscillators: lessons from diverse organisms. **Nature Review Genetics**, v. 6, n. 7, p. 544-556, 2005.

BENDOVIÁ, Z.; SLÁDEK, M.; SVOBODOVÁ, I. The expression of NR2B subunit of NMDA receptor in the suprachiasmatic nucleus of Wistar rats and its role in glutamate-induced CREB and ERK1/2 phosphorylation. **Neurochemistry International**, v. 61, n. 1, p. 43–47, 2012.

BJORVATN, B. et al. Sleep/waking effects of a selective 5-HT1A receptor nist given systemically as well as perfused in the dorsal raphe nucleus in rats. **Brain research**, v. 770, n. 1–2, p. 81–88, 1997.

BJORVATN, B.; URSIN, R. Changes in sleep and wakefulness following 5-HT1A ligands given systemically and locally in different brain regions. **Reviews in the neurosciences**, v. 9, n. 4, p. 265–73, 1998.

BORBÉLY, A. A.; ACHERMANN, P. Sleep homeostasis and models of sleep regulation. **Journal of biological rhythms**, v. 14, n. 6, p. 559-570, 1999.

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. 305-310, 2012.

BORISENKOV, M. F.; PERMIA, E. V.; KOSOVA, A. L. Chronotype, sleep length, and

school achievement of 11- to 23-year-old students in northern european russia. **Chronobiology International**, v. 27, n. 6, p. 1259–1270, 2010.

BREITHAUPT, H. et al. Tolerance to Shift of Sleep, as Related to the Individual's Circadian Phase Position. **Ergonomics**, v. 21, n. 10, p. 767–774, 1978.

BUIJS, F. N. et al. The circadian system: a regulatory feedback network of periphery and brain. **Physiology**, v. 31, n. 3, p. 170-181, 2016.

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

BURGESS, H. J.; EMENS, J. S. Circadian-Based Therapies for Circadian Rhythm Sleep-Wake Disorders. **Current sleep medicine reports**, v. 2, n. 3, p. 158-165, 2016.

BURGESS, H. J.; FOGG, L. F. Individual Differences in the Amount and Timing of Salivary Melatonin Secretion. **PLoS ONE**, v. 3, n. 8, p. e3055, 2008.

BURGESS, H. J.; REVELL, V. L.; EASTMAN, C. I. A three pulse phase response curve to three milligrams of melatonin in humans. **The Journal of physiology**, v. 586, n. 2, p. 639-647, 2008.

CAJOCHEN, C.; KRÄUCHI, K.; WIRZ-JUSTICE, A. Role of melatonin in the regulation of human circadian rhythms and sleep. **Journal of neuroendocrinology**, v. 15, n. 4, p. 432-437, 2003.

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

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. 293-297, 2005.

CARSKADON, M. A. et al. Short Sleep as an Environmental Exposure: A Preliminary Study Associating 5-HTTLPR Genotype to Self-Reported Sleep Duration and Depressed Mood in First-Year University Students. **SLEEP**, v. 35, n. 6, p. 791–796, 2012.

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, 2008.

CHALLET, E. et al. Roles of Suprachiasmatic Nuclei and Intergeniculate Leaflets in Mediating the Phase-Shifting Effects of a Serotonergic nist and Their Photic Modulation during Subjective Day. **Journal of Biological Rhythms**, v. 13, n. 5, p. 410–421, 1998.

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

CHEN, C. et al. Altered NMDA receptor trafficking contributes to sleep deprivation-induced hippocampal synaptic and cognitive impairments. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 340, n. 2, p. 435–440, 2006.

CHENU, F. et al. Role of melatonin, serotonin 2B, and serotonin 2C receptors in modulating the firing activity of rat dopamine neurons. **Journal of Psychopharmacology**, v. 28, n. 2, p. 162–167, 2014.

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, 2011.

COLECCHIA, E. F. et al. Phase-shifting effects of a serotonin nist in tau mutant hamsters. **Brain Research**, v. 730, n. 1–2, p. 227–231, 1996.

COLWELL, C. S. Linking neural activity and molecular oscillations in the SCN. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 12, n. 10, p. 553-569, 2011.

COLWELL, C. S. NMDA-evoked calcium transients and currents in the suprachiasmatic nucleus: gating by the circadian system. **The European journal of neuroscience**, v. 13, n. 7, p. 1420–1428, 2001.

COMINGS, D. E.; MACMURRAY, J. P. Molecular Heterosis: A Review. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 71, n. 1–2, p. 19–31, set. 2000.

CROWLEY, S. J.; CARSKADON, Mary A. Modifications to weekend recovery sleep delay circadian phase in older adolescents. **Chronobiology international**, v. 27, n. 7, p. 1469-1492, 2010.

CUTRERA, R. A.; OUAROOUR, A.; PÉVET, P. Effects of the 5-HT1a receptor nist 8-OH-DPAT and other non-photic stimuli on the circadian rhythm of wheel-running activity in hamsters under different constant conditions. **Neuroscience letters**, v. 172, n. 1–2, p. 27–30, 1994.

CZESAK, M. et al. Cell-Specific Repressor or Enhancer Activities of Deaf-1 at a Serotonin 1A Receptor Gene Polymorphism. **Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 6, p. 1864–1871, 2006.

DAAN, S.; ASCHOFF, J. The entrainment of circadian systems. In: **Circadian Clocks**. Springer US, p. 7-43, 2001.

DAAN, S.; PITTENDRIGH, C. Jürgen Aschoff, and the Natural Entrainment of Circadian Systems. **Journal of Biological Rhythms**, v. 15, n. 3, p. 195–207, 2000.

DARWIN, C. **On the origin of species by means of natural selection : preservation of favoured races in the struggle for life**. 1859.

DATTA, S. L.; PATTERSON, E. H.; SPOLEY, E. E. Excitation of the pedunculo pontine tegmental NMDA receptors induces wakefulness and cortical activation in the rat. **Journal of neuroscience research**, v. 66, n. 1, p. 109-116, 2001.

DAVID, Sean P. et al. A functional genetic variation of the serotonin (5-HT) transporter affects 5-HT1A receptor binding in humans. **Journal of Neuroscience**, v. 25, n. 10, p. 2586-2590, 2005.

DECOURSEY, Patricia J. LD ratios and the entrainment of circadian activity in a nocturnal and a diurnal rodent. **Journal of comparative physiology**, v. 78, n. 3, p. 221-235, 1972.

- DE NEVE, J. E. et al. Genes, Economics, and Happiness. **Journal of neuroscience, psychology, and economics**, v. 5, n. 4, 2012.
- DEUSCHLE, M. et al. Association between a serotonin transporter length polymorphism and priy insomnia. **Sleep**, v. 33, n. 3, p. 343–347, 2010.
- DÍAZ-MORALES, J. F. Morning and evening-types: Exploring their personality styles. **Personality and Individual Differences**, v. 43, n. 4, p. 769-778, 2007.
- DONALDSON, Z. R. et al. The functional serotonin 1a receptor promoter polymorphism, rs6295, is associated with psychiatric illness and differences in transcription. **Translational psychiatry**, v. 6, n. 3, p. e746, 2016.
- 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. 93–98, 1991.
- DUARTE, L. L. et al. Chronotype ontogeny related to gender. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 47, n. 4, p. 316–20, 2014.
- DUBOCOVICH, M. L. et al. Effect of MT1 melatonin receptor deletion on melatonin-mediated phase shift of circadian rhythms in the C57BL/6 mouse. **Journal of Pineal Research**, v. 39, n. 2, p. 113–120, 2005.
- DUBOCOVICH, M. L. et al. Selective MT2 melatonin receptor antagonists block melatonin-mediated phase advances of circadian rhythms. **The FASEB Journal**, v. 12, n. 12, p. 1211-1220, 1998.
- DUBOCOVICH, M. L. Melatonin receptors : Role on sleep and circadian rhythm regulation. v. 8, p. 34–42, 2007.
- DUBOCOVICH, M. L.; KOWSKA, M. Functional MT 1 and MT 2 Melatonin Receptors in Mammals. v. 27, n. 2, p. 101–110, 2005.
- 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. **health**, v. 26, p. 34, 1999.
- DUNLAP, J. C.; LOROS, J. J.; DeCOURSEY, P. J. **Chronobiology: Biological timekeeping**. Sinauer Associates, 2004.
- DYZMA, M. et al. Neuropeptide Y and sleep. **Sleep Medicine Reviews**, v. 14, n. 3, p. 161–165, 2010.
- EHLEN, J. C.; GROSSMAN, G. H.; GLASS, J. D. In vivo resetting of the hamster circadian clock by 5-HT7 receptors in the suprachiasmatic nucleus. **The Journal of neuroscience**, v. 21, n. 14, p. 5351–7, 2001.
- EVANS, D. S. et al. Habitual sleep/wake patterns in the Old Order Amish: heritability and association with non-genetic factors. **Sleep**, v. 34, n. 5, p. 661-669, 2011.

EYER-BERNSTEIN, E. L.; MORIN, L. P. Destruction of Serotonergic Neurons in the Median Raphe Nucleus Blocks Circadian Rhythm Phase Shifts to Triazolam but Not to Wheel Access. **Journal of Biological Rhythms**, v. 13, n. 6, p. 494–505, 1998.

FLOESSNER, T.; HUT, R. A. Basic Principles Underlying Biological Oscillations and Their Entrainment. **Biological Timekeeping: Clocks, Rhythms and Behaviour**. p.47–58, 2017

FOULKES, N. S.; WHITMORE, D.; SASSONE-CORSI, P. Rhythmic transcription: The molecular basis of circadian melatonin synthesis, **Biology of the Cell**, 1997.

FRANKEN, P.; CAO, V.; HELLER, H. C.; MILLER, J. D. The glutamate induced phase shift in the SCN slice: a two pulse study. **Brain research**, v. 818, n. 1, p. 34–40, 1999.

FUXE, KJELL et al. Central administration of neuropeptide Y induces hypotension bradypnea and EEG synchronization in the rat. **Acta Physiologica**, v. 118, n. 2, p. 189-192, 1983.

GAŁECKA, E. et al. Single nucleotide polymorphisms and mRNA expression for melatonin MT 2 receptor in depression. **Psychiatry research**, v. 189, n. 3, p. 472-474, 2011.

GANDHI, A. V. et al. Melatonin is required for the circadian regulation of sleep. **Neuron**, v. 85, n. 6, p. 1193-1199, 2015

GERDIN, M. J. et al. Melatonin desensitizes endogenous MT2 melatonin receptors in the rat suprachiasmatic nucleus: relevance for defining the periods of sensitivity of the mammalian circadian clock to melatonin. **The FASEB journal**, v. 18, n. 14, p. 1646-1656, 2004.

GILLETTE, M. U. Regulation of entrainment pathways by the suprachiasmatic circadian clock: sensitivities to second messengers. **Progress in brain research**, v. 111, p. 121-132, 1996.

GILLETTE, M. U.; ABBOTT, S. M.; ARNOLD, J. M. Biological Timekeeping. **Sleep Medicine Clinics**, v. 7, n. 3, p. 427–442, 2012.

GILLETTE, M. U.; MITCHELL, J. W. Signaling in the suprachiasmatic nucleus: selectively responsive and integrative. **Cell and tissue research**, v. 309, n. 1, p. 99-107, 2002.

GLASS, J. D. et al. Midbrain raphe modulation of nonphotic circadian clock resetting and 5-HT release in the mammalian suprachiasmatic nucleus. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 23, n. 20, p. 7451–60, 2003.

GLASS, J. D.; DINARDO, L. A.; EHLEN, J. C. Dorsal raphe nuclear stimulation of SCN serotonin release and circadian phase-resetting. **Brain Research**, v. 859, n. 2, p. 224–232, . 2000.

GLASS, J. D.; GUINN, J.; KAUR, G.; FRANCL, J. M. On the intrinsic regulation of neuropeptide Y release in the mammalian suprachiasmatic nucleus circadian clock. **European Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 6, p. 1117–1126, 2010

GOLOMBEK, D. A.; BIELLO, S. M.; RENDON, R. A.; HARRINGTON, M. E. Neuropeptide Y phase shifts the circadian clock in vitro via a Y2 receptor. **Neuroreport**, v. 7, n. 7, p. 1315–1319, 1996.

GOLOMBEK, D. A.; ROSENSTEIN, R. E. Physiology of Circadian Entrainment. **Physiological Reviews**, v. 90, n. 3, p. 1063–1102, 2010.

GREENBERG, B. D. et al. Genetic variation in the serotonin transporter promoter region affects serotonin uptake in human blood platelets. **American journal of medical genetics**, v. 88, n. 1, p. 83-87, 1999.

GRESSIER, F.; CALATI, R.; SERRETTI, A. 5-HTTLPR and gender differences in affective disorders: A systematic review. **Journal of Affective Disorders**, v. 190, p. 193–207, 2016.

GU, H. et al. The combined effects of the 5-HTTLPR and HTR1A rs6295 polymorphisms modulate decision making in schizophrenia patients. **Genes, Brain and Behavior**, v. 12, n. 1, p. 133-139, 2013.

HALBERG, F. et al. Physiologic 24-hour periodicity in human beings and mice, the lighting regimen and daily routine. In: Withrow R.B. (org). **Photoperiodism and related phenomena in plants and animals**, p.803-878, 1959.

HARRINGTON, M. E.; SCHAK, K. M. Neuropeptide Y phase advances the in vitro hamster circadian clock during the subjective day with no effect on phase during the subjective night. **Canadian journal of physiology and pharmacology**, v. 78, n. 2, p. 87–92, 2000.

HARTMANN, J. A. et al. The serotonin transporter 5-HTTLPR polymorphism in the association between sleep quality and affect. **European Neuropsychopharmacology**, v. 24, n. 7, p. 1086–1090, 2014.

HEILS, A.; MÖSSNER, R.; LESCH, K. P. The human serotonin transporter gene polymorphism-basic research and clinical implications. **Journal of neural transmission**, v. 104, n. 10, p. 1005-1014, 1997.

HEILS, Armin et al. Allelic variation of human serotonin transporter gene expression. **Journal of neurochemistry**, v. 66, n. 6, p. 2621-2624, 1996.

HELD, K. et al. Neuropeptide Y (NPY) shortens sleep latency but does not suppress ACTH and cortisol in depressed patients and normal controls. **Psychoneuroendocrinology**, v. 31, n. 1, p. 100–107, 2006

HILLIKER, N. A. et al. Sleepiness/alertness on a simulated night shift schedule and morningness-eveningness tendency. **Sleep**, v. 15, n. 5, p. 430–433, 1992

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

HU, Y. et al. GWAS of 89,283 individuals identifies genetic variants associated with self-reporting of being a morning person. **Nature Communications**, v. 7, p. 10448, 2016.

HUANG, Q. et al. Plasma neuropeptide Y levels in Chinese patients with primary insomnia. **Sleep and Breathing**, v. 19, n. 2, p. 617-622, 2015.

HUEZO-DIAZ, P. et al. Moderation of antidepressant response by the serotonin transporter gene. **The British Journal of Psychiatry**, v. 195, n. 1, p. 30–38, 2009.



HUHMANN, K. L. et al. Neuropeptide Y phase shifts circadian rhythms in vivo via a Y2 receptor. **Neuroreport**, v. 7, n. 7, p. 1249-1252, 1996.

HUNT, A. E. et al. Activation of MT 2 melatonin receptors in rat suprachiasmatic nucleus phase advances the circadian clock. p. 110–118, 2001.

HUNT, S. C. et al. Polymorphisms in the NPY2R gene show significant associations with BMI that are additive to FTO, MC4R, and NPF2R1 gene effects. **Obesity (Silver Spring, Md.)**, v. 19, n. 11, p. 2241–2247, 2011.

HUR, Y.-M. Stability of genetic influence on morningness/eveningness: a cross-sectional examination of Sh Korean twins from preadolescence to young adulthood. **Journal of Sleep Research**, v. 16, n. 1, p. 17–23, 2007.

HURST, W. J.; MITCHELL, J. W.; GILLETTE, M. U. Synchronization and phase-resetting by glutamate of an immortalized SCN cell line. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 298, n. 1, p. 133–43, 2002.

JI, L. D. et al. Association of disease-predisposition polymorphisms of the melatonin receptors and sunshine duration in the global human populations. **Journal of Pineal Research**, v. 48, n. 2, p. 133–141, 2010.

JIANG, Z. G. et al. Pre- and postsynaptic actions of serotonin on rat suprachiasmatic nucleus neurons. **Brain research**, v. 866, n. 1–2, p. 247–56, 2000.

JOCKERS, R. et al. Melatonin receptors , heterodimerization , signal transduction and binding sites : what ' s new ? p. 1182–1195, 2008.

JOHANSSON, C. et al. Circadian clock-related polymorphisms in seasonal affective disorder and their relevance to diurnal preference. **Neuropsychopharmacology**, v.28, n.4, p.734-739, 2003.

JOHNSON, C. H. Forty Years of Prcs - What Have We Learned? **Chronobiology International**, v. 16, n. 6, p. 711–743, 1999.

JONES, S. E. et al. Genome-wide association analyses in 128,266 individuals identifies new morningness and sleep duration loci. **PLoS Genet**, v. 12, n. 8, p. e1006125, 2016.

KALMBACH, D. A. et al. Genetic basis of chronotype in humans: Insights from three landk GWAS. **Sleep**, 28 . 2016.

KAMAL, M. et al. Convergence of melatonin and serotonin (5-HT) signaling at MT2/5-HT2C receptor heteromers. **The Journal of biological chemistry**, v. 290, n. 18, p. 11537–11546, 2015.

KANDALEPAS, P. C.; MITCHELL, J. W.; GILLETTE, M. U. Melatonin signal transduction pathways require E-box-mediated transcription of Per1 and Per2 to Reset the SCN clock at dusk. **PLoS One**, v. 11, n. 6, p. e0157824, 2016.

KANG, J.-H.; CHEN, S.-C. Effects of an irregular bedtime schedule on sleep quality, daytime sleepiness, and fatigue among university students in Taiwan. **BMC Public Health**, v. 9, n. 1, p. 248, 2009.

KANTERMANN, T.; SUNG, H.; BURGESS, H. J. Comparing the Morningness-Eveningness Questionnaire and Munich ChronoType Questionnaire to the Dim Light Melatonin Onset. **Journal of Biological Rhythms**, v. 30, n. 5, p. 449–453, 2015.

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

KAUDERER, S.; RANDLER, C. Differences in time use among chronotypes in adolescents. **Biological Rhythm Research**, v. 44, n. 4, p. 601-608, 2013.

KEIJZER, H. et al. Why the dim light melatonin onset (DLMO) should be measured before treatment of patients with circadian rhythm sleep disorders. **Sleep Medicine Reviews**, v. 18, n. 4, p. 333–339, 2014.

KIM, J. H. et al. Association study of polymorphisms in N-methyl-d-aspartate receptor 2B subunits (GRIN2B) gene with Korean alcoholism. **Neuroscience Research**, v. 56, n. 2, p. 220–223, 2006.

KISHI, T. et al. Serotonin 1A receptor gene and major depressive disorder: an association study and meta-analysis. **Journal of Human Genetics**, v. 54, n. 11, p. 629–633, 2009.

KISHI, T. et al. The serotonin 1A receptor gene confer susceptibility to mood disorders: results from an extended meta-analysis of patients with major depression and bipolar disorder. **European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience**, v. 263, n. 2, p. 105–118, 2013.

KITAMURA, S. et al. Validity of the Japanese version of the Munich ChronoType Questionnaire. **Chronobiology International**, v. 31, n. 7, p. 845–850, 2014.

KLEI, L. et al. Heritability of morningness-eveningness and self-report sleep measures in a family-based sample of 521 hutterites. **Chronobiology international**, v. 22, n. 6, p. 1041-1054, 2005.

KLOSTER, E. et al. Association of age at onset in Huntington disease with functional promoter variations in NPY and NPY2R. **Journal of Molecular Medicine**, v. 92, n. 2, p. 177–184, 2014.

KOHLRAUSCH, F. B. et al. Association of GRIN2B gene polymorphism and Obsessive Compulsive disorder and symptom dimensions: A pilot study. **Psychiatry Research**, v. 243, p. 152–155, 2016.

KOIKE, B. D. V. et al. Screening for polymorphisms in the AANAT gene and their association with extreme diurnal preference. **Sleep Science**, v. 7, n. 2, p. 126–127, 2014.

KORNHAUSER, J. M. et al. Light entrainment and activation of signal transduction pathways in the SCN. **Progress in brain research**, v. 111, p. 133–146, 1996

KOSKENVUO, M. et al. Heritability of diurnal type: a nationwide study of 8753 adult twin pairs. **Journal of Sleep Research**, v. 16, n. 2, p. 156–162, 2007.

KÜHNLE, Tim. **Quantitative analysis of human chronotypes**. Tese de Doutorado. Lmu, 2006.

- LANE, J. M. et al. Genome-wide association analysis identifies el loci for chronotype in 100,420 individuals from the UK Biobank. **Nature Communications**, v. 7, p. 10889, 2016.
- LEGATES, T. A.; FERNANDEZ, D. C.; HATTAR, S. Light as a central modulator of circadian rhythms, sleep and affect. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 15, n. 7, p. 443-454, 2014
- LEHNKERING, H.; SIEGMUND, R. Influence of chronotype, season, and sex of subject on sleep behavior of young adults. **Chronobiology International**, v. 24, n. 5, p. 875-888, 2007.
- LEMONDE, S.; ROGAEVA, A.; ALBERT, P. R. Cell type-dependent recruitment of trichostatin A-sensitive repression of the human 5-HT1A receptor gene. **Journal of neurochemistry**, v. 88, n. 4, p. 857–68, 2004.
- LENA, I. et al. Variations in extracellular levels of dopamine, noradrenaline, glutamate, and aspartate across the sleep–wake cycle in the medial prefrontal cortex and nucleus accumbens of freely moving rats. **Journal of neuroscience research**, v. 81, n. 6, p. 891-899, 2005.
- LEVANDOVSKI, Rosa et al. Depression scores associate with chronotype and social jetlag in a rural population. **Chronobiology international**, v. 28, n. 9, p. 771-778, 2011.
- LI, Qian et al. Reduction in the density and expression, but not G-protein coupling, of serotonin receptors (5-HT1A) in 5-HT transporter knock-out mice: gender and brain region differences. **Journal of Neuroscience**, v. 20, n. 21, p. 7888-7895, 2000.
- LIU, C. et al. Molecular dissection of two distinct actions of melatonin on the suprachiasmatic circadian clock. **Neuron**, v. 19, n. 1, p. 91-102, 1997.
- LIU, J. et al. MT1 and MT2 Melatonin Receptors: A Therapeutic Perspective. **Annual review of pharmacology and toxicology**, v. 56, p. 361–383, 2016.
- LOWREY, P. L.; TAKAHASHI, J. S. Genetics of circadian rhythms in Mammalian model organisms. **Advances in genetics**, v. 74, p. 175–230, 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. 407-441, 2004.
- MARQUES, N.; MENNA-BARRETO, L. organizadores. **Cronobiologia: princípios e aplicações**. São Paulo, EDUSP, 3ª ed., p.440, 2003.
- MARTIN, J. et al. Mapping regulatory variants for the serotonin transporter gene based on allelic expression imbalance. **Molecular psychiatry**, v. 12, n. 5, p. 421-423, 2007.
- MASAL, E. et al. Effects of longitude, latitude and social factors on chronotype in Turkish students. **Personality and Individual Differences**, v. 86, p. 73–81, 2015.
- MCARTHUR, A. J.; HUNT, A. E.; GILLETTE, M. U. Melatonin Action and Signal Transduction in the Rat Suprachiasmatic Circadian Clock: Activation of Protein Kinase C at Dusk and Dawn. **Endocrinology**, v. 138, n. 2, p. 627–634, 1997.
- MEDANIC, M.; GILLETTE, M. U. Serotonin regulates the phase of the rat suprachiasmatic

circadian pacemaker in vitro only during the subjective day. **The Journal of physiology**, v. 450, p. 629–42, 1992.

MENDOZA-VIVEROS, L. et al. Molecular modulators of the circadian clock: lessons from flies and mice. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 74, n. 6, p. 1035–1059, 2017.

MEYER-BERNSTEIN, E. L.; MORIN, L. P. Differential serotonergic innervation of the suprachiasmatic nucleus and the intergeniculate leaflet and its role in circadian rhythm modulation. **The Journal of neuroscience**, v. 16, n. 6, p. 2097–2111, 1996

MIGUEL, M. et al. Detecting chronotype differences associated to latitude: a comparison between Horne--Östberg and Munich Chronotype questionnaires. **Annals of Human Biology**, v. 41, n. 2, p. 107–110, 2014.

MILLAN, M. et al. Signaling at G-protein-coupled serotonin receptors: recent advances and future research directions. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 29, n. 9, p. 454–464, 2008.

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.

MINTZ, E. M. et al. Serotonergic regulation of circadian rhythms in Syrian hamsters. **Neuroscience**, v. 79, n. 2, p. 563–569, 1997.

MINTZ, E. M.; ALBERS, H. E. Microinjection of NMDA into the SCN region mimics the phase shifting effect of light in hamsters. **Brain research**, v. 758, n. 1–2, p. 245–249, 1997

MINTZ, E. M. et al. Activation of NMDA receptors in the suprachiasmatic nucleus produces light-like phase shifts of the circadian clock in vivo. **The Journal of neuroscience**, v. 19, n. 12, p. 5124–5130, 1999.

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. 101–104, 2005.

MISTLBERGER, R. E.; ANTLE, M. C.; GLASS, J. D.; MILLER, J. D. Behavioral and Serotonergic Regulation of Circadian Rhythms. **Biological Rhythm Research**, v. 31, n. 3, p. 240–283, 2000.

Mitchell, N.D.; Baker, G.B. An update on the role of glutamate in the pathophysiology of depression. **Acta Psychiatr Scand**, 2009.

MOHAWK, J. A.; GREEN, C. B.; TAKAHASHI, J. S. Central and peripheral circadian clocks in mammals. **Annual review of neuroscience**, v. 35, p. 445–462, 2012.

MONGRAIN, V.; CARRIER, J.; DUMONT, M. Difference in sleep regulation between morning and evening circadian types as indexed by antero-posterior analyses of the sleep EEG. **European Journal of Neuroscience**, v. 23, n. 2, p. 497–504, 2006.

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. 113-116, 2006.

MONTI, J. M. Serotonin control of sleep-wake behavior. **Sleep medicine reviews**, v. 15, n. 4, p. 269-281, 2011.

MONTI, J. M.; JANTOS, H. Effects of the serotonin 5-HT 2A/2C receptor agonist DOI and of the selective 5-HT 2A or 5-HT 2C receptor antagonists EMD 281014 and SB-243213, respectively, on sleep and waking in the rat. **European journal of pharmacology**, v. 553, n. 1, p. 163-170, 2006.

MONTI, J.; PANDI-PERUMAL, S. R.; SINTON, C. M. (Ed.). **Neurochemistry of sleep and wakefulness**. Cambridge University Press, 2008.

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, 1986.

MORI, F. et al. Genetic variants of the NMDA receptor influence cortical excitability and plasticity in humans. **Journal of Neurophysiology**, v. 106, n. 4, p. 1637–1643, 2011.

MORIN, L. P. Neuroanatomy of the extended circadian rhythm system. **Experimental neurology**, v. 243, p. 4–20, 2013.

MORIN, L. P. SCN Organization Reconsidered. **Journal of Biological Rhythms**, v. 22, n. 1, p. 3–13, 2007.

MORIN, L. P.; BLANCHARD, J.; MOORE, R. Y. Intergeniculate leaflet and suprachiasmatic nucleus organization and connections in the golden hamster. **Visual neuroscience**, v. 8, n. 3, p. 219–30, 1992

MURILLO-RODRÍGUEZ, E. et al. Basic sleep mechanisms: an integrative review. **Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 1, p. 38-54, 2012.

MUSCAT, L.; MORIN, L. P. Intergeniculate leaflet: Contributions to photic and non-photoc responsiveness of the hamster circadian system. **Neuroscience**, v. 140, n. 1, p. 305–320, 2006.

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 shern hemispheres. **Chronobiology International**, v. 28, n. 8, p. 727-30, 2011.

OJEDA, D. A. et al. Common functional polymorphisms in SLC6A4 and COMT genes are associated with circadian phenotypes in a South American sample. **Neurological Sciences**, v. 35, n. 1, p. 41-47, 2014.

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. **Chronobiology International**, v.28, n.9, p. 764-70, 2011

PACE-SCHOTT, E. F.; HOBSON, J. A. The neurobiology of sleep: genetics, cellular physiology and subcortical networks. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 3, n. 8, p. 591-605, 2002.

PAGE, T. L. Masking in Invertebrates. **Chronobiology International**, v. 6, n. 1, p. 3–11, 1989.

PAINE, S. J.; GANDER, P. H. Differences in circadian phase and weekday/weekend sleep patterns in a sample of middle-aged morning types and evening types. **Chronobiology international**, v. 33, n. 8, p. 1009–1017, 2016.

PAINE, S. J.; GANDER, P. H.; TRAVIER, N. The Epidemiology of Morningness/Eveningness: Influence of Age, Gender, Ethnicity, and Socioeconomic Factors in Adults (30-49 Years). **Journal of Biological Rhythms**, v. 21, n. 1, p. 68–76, 2006.

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. 143-154, 1997.

PARTCH, C. L.; GREEN, C. B.; TAKAHASHI, J. S. Molecular architecture of the mammalian circadian clock. **Trends in Cell Biology**, v. 24, n. 2, p. 90–99, 2014.

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. 73-76, 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.

PENNARTZ, C.M.A.; HAMSTRA, R.; GEURTSSEN, A.M.S. Enhanced NMDA receptor activity in retinal inputs to the rat suprachiasmatic nucleus during the subjective night. **J. Physiol**, v. 532, p. 181–194, 2001.

PERREAU-LENZ, S. et al. Suprachiasmatic control of melatonin synthesis in rats: Inhibitory and stimulatory mechanisms. **European Journal of Neuroscience**, v. 17, n. 2, p. 221–228, 2003.

PÉVET, P. Melatonin receptors as therapeutic targets in the suprachiasmatic nucleus. v. 8222, n. April, 2016.

PFEFFER, M. et al. The Endogenous Melatonin ( MT ) Signal Facilitates Reentrainment of the Circadian System to Light-Induced Phase Advances by Acting Upon MT2 Receptors. v. 29, n. 4, p. 415–429, 2012.

PICKARD, G. E.; RALPH, M. R.; MENAKER, M. The intergeniculate leaflet partially mediates effects of light on circadian rhythms. **Journal of biological rhythms**, v. 2, n. 1, p. 35–56, 1987

PITTENDRIGH, C. S. Circadian rhythms and the circadian organization of living systems. **Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology**, v. 25, p. 159–84, 1960.

PITTENDRIGH, C. S. ON Temperature independence in the clock system controlling emergence time in drosophila. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 40, n. 10, p. 1018–29, 1954

PORTAS, C. M. et al. Microdialysis perfusion of 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin (8-OH-DPAT) in the dorsal raphe nucleus reases serotonin release and increases rapid eye movement sleep in the freely moving cat. **The Journal of neuroscience**, v. 16, n. 8, p. 2820–2828, 1996.

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

PROSSER, R. A. Serotonergic Actions and Interactions on the SCN Circadian Pacemaker: In Vitro Investigations. **Biological Rhythm Research**, v. 31, n. 3, p. 315–339, 2000.

PROSSER, R. A. Serotonin phase-shifts the mouse suprachiasmatic circadian clock in vitro. **Brain Research**, v. 966, n. 1, p. 110–115, 2003.

RANDLER, C. Age and Gender Differences in Morningness–Eveningness During Adolescence. **The Journal of Genetic Psychology**, v. 172, n. 3, p. 302–308, 2011.

RANDLER, C. et al. Latitude affects Morningness-Eveningness: evidence for the environment hypothesis based on a systematic review. **Scientific Reports**, v. 7, p. 39976, 2017.

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. 1017–1028, 2008.

RANDLER, C. Sleep, sleep timing and chronotype in animal behaviour. **Animal Behaviour**, v. 94, p. 161–166, 2014.

RANDLER, C.; SCHAAL, S. Morningness–eveningness, habitual sleep-wake variables and cortisol level. **Biological Psychology**, v. 85, n. 1, p. 14–18, 2010.

RANDLER, C.; TRUC, Y. Adaptation of the Composite Scale of Morningness for Parent Report and Results from Kindergarten Children. **Swiss Journal of Psychology**, v. 73, n. 1, p. 35–39, 2014.

REA, M. A.; GLASS, J. D.; COLWELL, C. S. Serotonin modulates photic responses in the hamster suprachiasmatic nuclei. **Journal of Neuroscience**, v. 14, n. 6, p. 3635–3642, 1994.

REGHUNANDANAN, V.; REGHUNANDANAN, R. Neurotransmitters of the suprachiasmatic nuclei. **Journal of circadian rhythms**, v. 4, p. 2, 2006.

RICHTER, C.P. **Biological Clocks in Medicine and Psychiatry**. Charles C Thomas, Springfield, Illinois, p. 108, 1965

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

RIVERA-BERMÚDEZ, M. A. et al. Immortalized cells from the rat suprachiasmatic nucleus express functional melatonin receptors. **Brain research**, v. 1002, n. 1–2, p. 21–27, 2004.

ROBILLIARD, D. L. et al. The 3111 Clock gene polymorphism is not associated with sleep and circadian rhythmicity in phenotypically characterized human subjects. **Journal of sleep research**, v. 11, n. 4, p. 305–12, 2002.

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

ROENNEBERG, T. et al. Social Jetlag and Obesity. **Current Biology**, v. 22, n. 10, p. 939–943, 2012.

ROENNEBERG, T.; MERROW, M. Entrainment of the Human Circadian Clock. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, v. 72, n. 1, p. 293–299, 2007.

ROENNEBERG, T.; MERROW, M. The network of time: understanding the molecular circadian system. **Current biology : CB**, v. 13, n. 5, p. R198-207, 2003.

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

ROEPKE, S. E.; DUFFY, J. F. Differential impact of chronotype on weekday and weekend sleep timing and duration. **Nature and science of sleep**, v. 2010, n. 2, p. 213–220, 2010.

ROSENWASSER, A.; TUREK, F. Neurobiology of circadian rhythm regulation. **Sleep medicine clinics**, v. 10, n. 4, p. 403-412, 2015.

ROSSER, R. A.; MILLER, J. D.; HELLER, H. C. A serotonin nist phase-shifts the circadian clock in the suprachiasmatic nuclei in vitro. **Brain research**, v. 534, n. 1–2, p. 336–339, 1990.

RUSSO, P. M. et al. Sleep habits and circadian preference in Italian children and adolescents. **Journal of sleep research**, v. 16, n. 2, p. 163-169, 2007.

SANI, M. et al. Daily activity patterns of 2316 men and women from five countries differing in socioeconomic development. **Chronobiol. Int.** 32, 650–656, 2015.

SATO, N. et al. Association between neuropeptide Y receptor 2 polymorphism and the smoking behavior of elderly Japanese. **Journal of Human Genetics**, v. 55, n. 11, p. 755–760, 2010.

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, 2004



SATOH, K. et al. Two pedigrees of familial advanced sleep phase syndrome in Japan. **Sleep**, v. 26, n. 4, p. 416-417, 2003.

SCHILD, A. H. E. et al. Genetic association studies between SNPs and suicidal behavior: A meta-analytical field synopsis. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 46, p. 36–42, 2013.

SCHMIDT, C. et al. Homeostatic sleep pressure and responses to sustained attention in the suprachiasmatic area. **Science**, v. 324, n. 5926, p. 516-519, 2009

SCHUHLER, S. et al. Entrainment of locomotor activity rhythm in pinealectomized adult Syrian hamsters by daily melatonin infusion. **Behavioural brain research**, v. 133, n. 2, p. 343-350, 2002.

SCHWARTZ, Jonathan RL; ROTH, Thomas. Neurophysiology of sleep and wakefulness: basic science and clinical implications. **Current neuropharmacology**, v. 6, n. 4, p. 367-378, 2008.

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

SEIFRITZ, E. et al. The 5-HT<sub>1A</sub> nist ipsapirone enhances EEG slow wave activity in human sleep and produces a power spectrum similar to 5-HT<sub>2</sub> blockade. **Neuroscience letters**, v. 209, n. 1, p. 41–44, 1996.

SERRETTI, A. et al. The C(–1019)G polymorphism of the 5-HT<sub>1A</sub> gene promoter and antidepressant response in mood disorders: preliminary findings. **The International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 7, n. 4, p. 453–460, 2004.

SHIGEYOSHI, Y.; TAGUCHI, K.; YAMAMOTO, S.; 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, 1997.

SHIRAKAWA, T.; MOORE, R. Y. Glutamate shifts the phase of the circadian neuronal firing rhythm in the rat suprachiasmatic nucleus in vitro. **Neuroscience letters**, v. 178, n. 1, p. 47–50, 1994.

SIDDIQ, A. et al. Single nucleotide polymorphisms in the neuropeptide Y<sub>2</sub> receptor (NPY<sub>2R</sub>) gene and association with severe obesity in French white subjects. **Diabetologia**, v. 50, n. 3, p. 574–584, 2007.

SILVER, R. et al. A diffusible coupling signal from the transplanted suprachiasmatic nucleus controlling circadian locomotor rhythms. **Nature**, v. 382, n. 6594, p. 810–813, 1996.

SILVER, R.; RAINBOW, M. The Suprachiasmatic Nucleus and the Circadian Timekeeping System of the Body. **Neuroscience in the 21st Century**. p.1847–1888, 2013

SKOCBAT, T.; HAIMOV, I.; LAVIE, P. Melatonin-the key to the gate of sleep. **Annals of medicine**, v. 30, n. 1, p. 109-114, 1998.

SLOTTEN, H. A. et al. Daily infusion of melatonin entrains circadian activity rhythms in the diurnal rodent *Arvicanthis ansorgei*. **Behavioural brain research**, v. 133, n. 1, p. 11-19, 2002.

- SMITH, B. N. et al. Serotonergic Modulation of Retinal Input to the Mouse Suprachiasmatic Nucleus Mediated by 5-HT<sub>1B</sub> and 5-HT<sub>7</sub> Receptors. **Journal of Biological Rhythms**, v. 16, n. 1, p. 25–38, 2001
- SMITH, V. M. et al. Altered photic and non-photoc phase shifts in 5-HT<sub>1A</sub> receptor knock mice. **Neuroscience**, v. 157, n. 3, p. 513–523, 2008.
- SOLÉ, X. et al. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. **Bioinformatics**, v. 22, n. 15, p. 1928-1929, 2006.
- SOLLARS, P.; PICKARD, G. E. The neurobiology of circadian rhythms. **Psychiatric Clinics of North America**, v. 38, n. 4, p. 645-665, 2015.
- SPROUSE, J. et al. 8-OH-DPAT as a 5-HT<sub>7</sub> nist: phase shifts of the circadian biological clock through increases in cAMP production. **Neuropharmacology**, v. 46, n. 1, p. 52–62, 2004.
- STARKEY, S. J. et al. Modulation of the rat suprachiasmatic circadian clock by melatonin in vitro. **Neuroreport**, v. 6, n. 14, p. 1947–1951, 1995.
- STEIGER, A. Sleep and endocrinology. **Journal of internal medicine**, v. 254, n. 1, p. 13-22, 2003.
- STONE, W. S.; WALKER, D. L.; GOLD, P. E. Sleep deficits in rats after NMDA receptor blockade. **Physiology & behavior**, v. 52, n. 3, p. 609–612, 1992.
- STROBEL, A. et al. Allelic variation in 5-HT<sub>1A</sub> receptor expression is associated with anxiety- and depression-related personality traits. **Journal of Neural Transmission**, v. 110, n. 12, p. 1445–1453, 2003.
- STRUG, L. J. et al. Panic disorder is associated with the serotonin transporter gene (SLC6A4) but not the promoter region (5-HTTLPR). **Molecular Psychiatry**, v. 15, n. 2, p. 166–176, 2010.
- TAILLARD, J.; PHILIP, P.; BIOULAC, B. Morningness/eveningness and the need for sleep. **Journal of sleep research**, v. 8, n. 4, p. 291-295, 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, 2008.
- TIN, J. et al. Mapping regulatory variants for the serotonin transporter gene based on allelic expression imbalance. **Molecular Psychiatry**, v. 12, n. 5, p. 421–422, 2007
- TISSIER, M.-H. et al. Effects of ipsapirone, a 5-HT<sub>1A</sub> nist, on sleep/wakefulness cycles: probable post-synaptic action. **Journal of Sleep Research**, v. 2, n. 2, p. 103–109, 1993.
- TOH, K. L. et al. An hPer2 phosphorylation site mutation in familial advanced sleep phase syndrome. **Science**, v. 291, n. 5506, p. 1040-1043, 2001.
- TOMITA, J. et al. The NMDA Receptor Promotes Sleep in the Fruit Fly, *Drosophila melanogaster*. **PLoS one**, v. 10, n. 5, p. e0128101, 2015.

TONETTI, L. et al. Season of Birth and Sleep-Timing Preferences in Adolescents. **Chronobiology International**, v. 28, n. 6, p. 536–540, 2011.

TOOMEY, R. et al. A twin-study of genetic contributions to morningness–eveningness and depression. **Chronobiology international**, v. 32, n. 3, p. 303-309, 2015.

TUCCI, L. et al. N-methyl-d-aspartate receptor NR2B subunit gene GRIN2B in schizophrenia and bipolar disorder: Polymorphisms and mRNA levels. **Schizophrenia Research**, v. 84, n. 2–3, p. 214–221, 2006

TATSUKI, F.; SUNAGAWA, G.; SHI, S.; SUSAKI, E. YUKINAGA, H. et. al. Involvement of Ca<sup>2+</sup>-Dependent Hyperpolarization in Sleep Duration in Mammals. **Neuron**, v. 90, n.1, p: 70-85, 2016.

UKAI, H.; UEDA, H. R. Systems biology of mammalian circadian clocks. **Annu Rev Physiol**, v. 72, p. 579-603, 2010.

URSIN, R. Serotonin and sleep. **Sleep medicine reviews**, v. 6, n. 1, p. 55-67, 2002.

VANSELOW, K. et al. Differential effects of PER2 phosphorylation: molecular basis for the human familial advanced sleep phase syndrome (FASPS). **Genes & development**, v. 20, n. 19, p. 2660-2672, 2006.

VINK, J. M. et al. Genetic analysis of morningness and eveningness. **Chronobiology International**, v. 18, n. 5, p. 809–822, 2001.

VON SCHANTZ, M. et al. Distribution and heritability of diurnal preference (chronotype) in a rural Brazilian family-based cohort, the Baependi study. **Scientific reports**, v. 5, p. 9214, 2015.

WANG, H.-J. et al. No Association of Sequence Variants in the Neuropeptide Y2 Receptor ( *NPY2R* ) Gene with Early Onset Obesity in Germans. **Hormone and Metabolic Research**, v. 39, n. 11, p. 840–844, 2007.

WASSERMAN, D. et al. The serotonin 1A receptor C(-1019)G polymorphism in relation to suicide attempt. **Behavioral and Brain Functions**, v. 2, n. 1, p. 14, 2006.

WEAVER, D. R.; EMERY, P. **Circadian Timekeeping. Fundamental Neuroscience.** Elsevier, p. 819–845, 2013

WEICKERT, C. S. et al. Molecular evidence of N-methyl-D-aspartate receptor hypofunction in schizophrenia. **Molecular Psychiatry**, v. 18, n. 11, p. 1185–1192, 2013.

WELSH, D. K.; TAKAHASHI, J. S.; KAY, S. A. Suprachiasmatic Nucleus: Cell Autonomy and Network Properties. **Annual Review of Physiology**, v. 72, n. 1, p. 551–577, 2010

WESENSTEN, N. J. et al. Daytime sleep and performance following a zolpidem and melatonin cocktail. **Sleep**, v. 28, n. 1, p. 93-103, 2005.

WEVER, R. A. Influence of physical workload on free running circadian rhythms of man. **Pflugers Arch**, v. 381, n. 2, p. 119-26, 1979.

WILSON, S. J. et al. The use of sleep measures to compare a new 5HT1A agonist with buspirone in humans. **Journal of Psychopharmacology**, v. 19, n. 6, p. 609-613, 2005.

WITTMANN, M. et al. Social Jetlag: Misalignment of Biological and Social Time. **Chronobiology International**, v. 23, n. 1–2, p. 497–509, 2006.

WRAY, N. R. et al. Accurate, Large-Scale Genotyping of 5HTTLPR and Flanking Single Nucleotide Polymorphisms in an Association Study of Depression, Anxiety, and Personality Measures. **Biological psychiatry**, v. 66, n. 5, p. 468–76, 2009.

XU, T. et al. Effects of exogenous melatonin on sleep: a Meta-analysis. **Chinese Journal of Clinical Healthcare**, v. 5, p. 002, 2008.

XU, Y. et al. Functional consequences of a CKI $\delta$  mutation causing familial advanced sleep phase syndrome. **Nature**, v. 434, n. 7033, p. 640-644, 2005

YANG, P. et al. The Association of rs4753426 Polymorphism in the Melatonin Receptor 1B (MTNR1B) Gene and Susceptibility to Adolescent Idiopathic Scoliosis: A Systematic Review and Meta-analysis. **Pain physician**, v. 18, n. 5, p. 419–31, 2015.

YANG, P. et al. The association of rs4753426 polymorphism in the melatonin receptor 1B (MTNR1B) gene and susceptibility to adolescent idiopathic scoliosis: a systematic review and meta-analysis. **Pain Phys**, v. 18, n. 5, p. 419-31, 2015

YANNIELLI, P. C.; HARRINGTON, M. E. Neuropeptide Y in the mammalian circadian system: effects on light-induced circadian responses. **Peptides**, v. 22, n. 3, p. 547–56, 2001.

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.

ZHAN, Y. et al. Association between the rs4753426 polymorphism in MTNR1B with fasting plasma glucose level and pancreatic  $\beta$ -cell function in gestational diabetes mellitus. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 3, p. 8778–8785, 2015.

ZHANG, K. et al. The combined effects of the 5-HTTLPR and 5-HTR1A genes modulates the relationship between negative life events and major depressive disorder in a Chinese population. **Journal of affective disorders**, v. 114, n. 1, p. 224-231, 2009.

ZHAO, Q. et al. Positive association between GRIN2B gene and bipolar disorder in the Chinese Han Population. **Psychiatry Research**, v. 185, n. 1–2, p. 290–292, 2011.

ZIMMERMANN, L. K. The influence of chronotype in the daily lives of young children. **Chronobiology International**, v. 33, n. 3, p. 268–279, 2016.

ZINI, I. et al. Actions of centrally administered neuropeptide Y on EEG activity in different rat strains and in different phases of their circadian cycle. **Acta Physiologica**, v. 122, n. 1, p. 71-78, 1984.

ZISAPEL, N. Melatonin and sleep. **Open Neuroendocrinol J**, v. 3, p. 85-95, 2010.

## **ANEXOS**

**ANEXO 1 - Folha de dados cadastrais utilizada na pesquisa****DADOS CADASTRAIS****IDENTIFICAÇÃO**

Nome Completo \_\_\_\_\_

Data de Nascimento \_\_\_\_\_ Sexo \_\_\_\_\_ Idade \_\_\_\_\_

Nível de Escolaridade \_\_\_\_\_ Etnia \_\_\_\_\_

**LOCAL DE NASCIMENTO**

Cidade \_\_\_\_\_ UF \_\_\_\_\_ País \_\_\_\_\_

**ENDEREÇO**

Rua/Av. \_\_\_\_\_ Nº \_\_\_\_\_

Bairro \_\_\_\_\_ Cidade \_\_\_\_\_ UF \_\_\_\_\_

País \_\_\_\_\_ CEP \_\_\_\_\_

Telefone \_\_\_\_\_ Email \_\_\_\_\_

**INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES**

1. Você tem ou já foi diagnosticado com alguma doença psiquiátrica/mental?

Sim \_\_\_\_\_ Não \_\_\_\_\_ Qual? \_\_\_\_\_

2. Você possui algum parente que tem ou já tenha sido diagnosticado com alguma doença psiquiátrica/mental?

Sim \_\_\_\_\_ Não \_\_\_\_\_ Qual? \_\_\_\_\_

3. Você faz uso regular de algum medicamento?

Sim \_\_\_\_\_ Não \_\_\_\_\_ Qual? \_\_\_\_\_

4. Você faz uso regular de bebidas alcoólicas?

Sim \_\_\_\_\_ Não \_\_\_\_\_ Com que frequência? \_\_\_\_\_

5. Você faz uso de fumo/cigarro?

Sim \_\_\_\_\_ Não \_\_\_\_\_ Com que frequência? \_\_\_\_\_

6. Você estuda?

Sim \_\_\_\_\_ Não \_\_\_\_\_ Que horário? \_\_\_\_\_

7. Você trabalha?

Sim \_\_\_\_\_ Não \_\_\_\_\_ Que horário? \_\_\_\_\_

8. Em que estação do ano você se sente melhor?

Primavera \_\_\_\_\_ Verão \_\_\_\_\_ Outono \_\_\_\_\_ Inverno \_\_\_\_\_

9. Você sente desconforto com o horário de verão?

Sim \_\_\_\_\_ Não \_\_\_\_\_

**ANEXO 2 – Questionário de Matutividade e Vespertividade de Horne-Ostberg****Questionário Horne-Ostberg (Tipos Matutinos – Vespertinos)**

1. Considerando apenas seu bem-estar pessoal e com liberdade total de planejar seu dia, a que horas você se levantaria?
  - 5  Entre 5:00 e 6:30hs.
  - 4  Entre 6:30 e 8:00hs.
  - 3  Entre 8:00 e 9:30hs.
  - 2  Entre as 9:30 e 11:00hs
  - 1  Entre as 11:00 e as 12:00hs.
  
2. Considerando apenas seu bem-estar pessoal e com liberdade total de planejar sua noite, a que horas você se deitaria?
  - 5  20-21hs
  - 4  21-22:30hs.
  - 3  22:30-00:30hs.
  - 2  00:30-1:30hs.
  - 1  1:30-3:00hs.
  
3. Até que ponto você depende do despertador para acordar de manhã?
  - 4  Nada dependente
  - 3  Não muito dependente
  - 2  Razoavelmente dependente
  - 1  Muito dependente
  
4. Você acha fácil acordar de manhã?
  - 1  Nada fácil.
  - 2  Não muito fácil.
  - 3  Razoavelmente fácil.
  - 4  Muito fácil.
  
5. Você se sente alerta durante a primeira meia hora depois de acordar?
  - 1  Nada alerta.
  - 2  Não muito alerta.
  - 3  Razoavelmente alerta.
  - 4  Muito alerta.
  
6. Como é seu apetite durante a primeira meia hora depois de acordar?
  - 1  Muito ruim.
  - 2  Não muito ruim.
  - 3  Razoavelmente bom.
  - 4  Muito bom.



7. Durante a primeira meia hora depois de acordar você se sente cansado?

- 1  Muito cansado.
- 2  Não muito cansado.
- 3  Razoavelmente em forma.
- 4  Em plena forma.

8. Se você não tem compromisso no dia seguinte e comparando com sua hora habitual, a que horas você gostaria de ir deitar?

- 4  Nunca mais tarde.
- 3  Menos de 1 hora mais tarde.
- 2  Entre 1 a 2 horas mais tarde.
- 1  Mais do que 2 horas mais tarde.

9. Você decidiu fazer exercícios físicos. Um amigo sugeriu o horário das 7:00 às 8:00 horas da manhã, duas vezes por semana. Considerando apenas seu bem-estar pessoal, o que você acha de fazer exercícios nesse horário?

- 4  Estaria em boa forma.
- 3  Estaria razoavelmente em forma.
- 2  Acharia isso difícil.
- 1  Acharia muito difícil.

10. A que horas da noite você se sente cansado e com vontade de dormir?

- 5  20:00-21:00hs.
- 4  21:00-22:30hs.
- 3  22:30-00:30hs.
- 2  1:00-2:00hs.
- 1  2:00-3:00hs.

11. Você quer estar no máximo de sua forma para fazer um teste que dura duas horas e que você sabe que é mentalmente cansativo. Considerando apenas o seu bem-estar pessoal, qual desses horários você escolheria para fazer o teste?

- 6  Das 8:00 às 10:00hs.
- 4  Das 11:00 às 13:00hs.
- 2  Das 15:00 às 17:00hs.
- 1  Das 19:00 às 21:00hs.

12. Se você fosse deitar às 23:00 horas, em que nível de cansaço você se sentiria?

- 0  Nada cansado.
- 2  Um pouco cansado.
- 3  Razoavelmente cansado.
- 5  Muito cansado.

13. Por alguma razão você foi dormir várias horas mais tarde do que é de seu costume. Se no dia seguinte você não tiver hora certa para acordar, o que aconteceria com você?

- 4  Acordaria na hora normal, sem sono
- 3  Acordaria na hora normal, com sono.
- 2  Acordaria na hora normal e dormiria novamente.
- 1  Acordaria mais tarde do que o costume.

14. Se você tiver que ficar acordado das 4:00 às 6:00 horas da manhã para realizar uma tarefa e não tiver compromissos no dia seguinte, o que você faria?

- 1  Só dormiria depois de fazer a tarefa.
- 2  Tiraria uma soneca antes da tarefa e dormiria depois.
- 3  Dormiria bastante antes e tiraria uma soneca depois.
- 4  Só dormiria antes de fazer a tarefa.

15. Se você tiver que fazer duas horas de exercício físico pesado e considerando apenas o seu bem-estar pessoal, qual destes horários você escolheria?

- 4  Das 8:00 às 10:00hs.
- 3  Das 11:00 às 13:00hs.
- 2  Das 15:00 às 17:00hs.
- 1  Das 19:00 às 21:00hs.

16. Você decidiu fazer exercícios físicos. Um amigo sugeriu o horário das 22:00 às 23:00 horas, duas vezes por semana. Considerando apenas seu bem-estar pessoal, o que você acha de fazer exercícios nesse horário?

- 1  Estaria em boa forma.
- 2  Estaria razoavelmente em forma.
- 3  Acharia isso difícil.
- 4  Acharia isso muito difícil.

17. Suponha que você possa escolher o seu próprio horário de trabalho e que você deva trabalhar cinco horas seguidas por dia. Imagine que seja um serviço interessante e que você ganhe por produção. Qual o horário que você escolheria? Marque as cinco horas consecutivas.

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----

Considere o quadrante marcado mais à direita para escolher entre as seguintes opções:

- 1  Entre 0:00-3:00hs.
- 5  Entre 3:00-7:00hs
- 4  7:00hs.
- 3  Entre 8:00-13:00hs.
- 2  Ente 13:00-17:00hs.
- 1  Entre 17:00-0:00.

18. A que horas do dia você atinge seu melhor momento de bem-estar?

- 1  Entre 0:00 e 4:00hs.
- 5  Entre 4:00 e 7:00hs.
- 4  Entre 7:00 e 9:00hs.
- 3  Entre 9:00 e 16:00hs.
- 2  Entre 16:00 e 21:00hs.
- 1  Entre 21:00hs e 0:00hs.

19. Fala-se em pessoas matutinas e vespertinas (as primeiras gostam de acordar cedo e dormir cedo, as segundas de acordar tarde e dormir tarde). Com qual desses tipos você se identifica?

- 6  Tipo matutino.
- 4  Mais matutino que vespertino.
- 2  Mais vespertino que matutino.
- 0  Tipo vespertino.

### ANEXO 3 - Questionário de Cronotipo de Munique

**Instruções:** O questionário a seguir se refere ao seu comportamento de sono e vigília. Por favor, responda as seguintes questões baseado no seu comportamento nas últimas semanas. Todos os campos são obrigatórios

Você tem um horário regular de estudo/trabalho (mesmo que seja dona de casa etc.)?


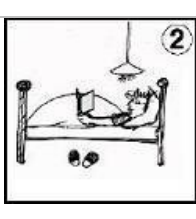

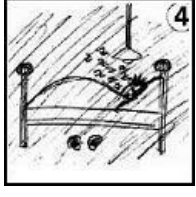
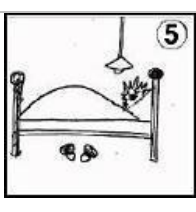
- Sim       Não


Quantos dias por semana são caracterizados como dias de trabalho para você?

\_\_\_\_\_

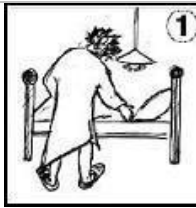
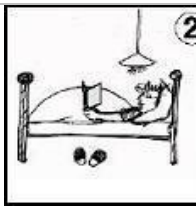
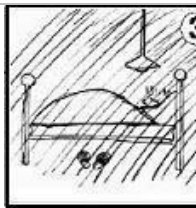
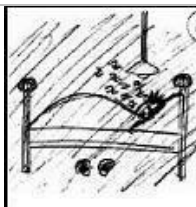
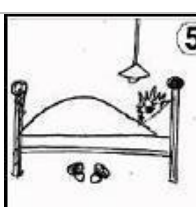

**Instruções:** Use a escala das 24 horas, por exemplo, 23:00 em vez de 11:00!!!

Dias de trabalho/estudo

	<p>Vou para a cama às <input type="text"/> : <input type="text"/> horas.</p>
	<p>Algumas pessoas permanecem algum tempo ativas (ex: lendo) antes de decidir dormir!</p>
	<p>Eu estou pronto(a) para ir dormir às <input type="text"/> : <input type="text"/> horas.</p>
	<p>Eu necessito de <input type="text"/> minutos para adormecer.</p>
	<p>Acordo às <input type="text"/> : <input type="text"/> horas.</p> <p><input type="radio"/> com o despertador</p> <p><input type="radio"/> sem o despertador</p>

	Passados <input type="text"/> minutos, levanto-me.
---	--

Dias fora dos dias de trabalho/estudo

	Vou para a cama às <input type="text"/> : <input type="text"/> horas.
	Algumas pessoas permanecem algum tempo ativas (ex: lendo) antes de decidir dormir!
	Eu estou pronto(a) para ir dormir às <input type="text"/> : <input type="text"/> horas.
	Necessito de <input type="text"/> minutos para adormecer.
	Acordo às <input type="text"/> : <input type="text"/> horas. <input type="radio"/> com o despertador <input type="radio"/> sem o despertador
	Passados <input type="text"/> minutos, levanto-me.
Por favor deixe um comentário se você atualmente não puder escolher livremente os seus horários de dormir (por exemplo: por causa de animais domésticos, etc.):	

**ANEXO 4 – Parecer Consubstanciado do CEP**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Investigação de Potenciais Moduladores Genéticos do Ritmo Circadiano em Humanos

**Pesquisador:** Aline Cristine Pereira e Silva

**Área Temática:** Genética Humana: (Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP);

**Versão:** 4

**CAAE:** 38930914.0.0000.5013

**Instituição Proponente:** Universidade Federal de Alagoas

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 1.033.322

**Data da Relatoria:** 23/04/2015

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Estudo de importância para a área de estudo

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Os termos analisados foram:

Informações Básicas do Projeto, Folha de Rosto, Declarações diversas, PROTOCOLO DE DESENVOLVIMENTO SOBRE ARMAZENAMENTO DE MATERIAL BIOLÓGICO HUMANO;

Documento comprobatório Termo de responsabilidade da Instituição - UFAL, Projeto Detalhado Projeto doutorado

Os termos apresentados atendem ao solicitado pela Resolução 466/12.

PENDÊNCIA ANTERIOR TCLE: Apresentar dois TCLE separados, sendo um para o consentimento da execução da pesquisa e outro para o consentimento da coleta e armazenamento do material biológico; RESPOSTA À PENDÊNCIA: Solicitação atendida.

**Recomendações:**

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

O projeto de pesquisa analisado está aprovado por estar em conformidade com as especificações das Resoluções: 466/12 e 441/11.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

MACEIO, 23 de Abril de 2015

---

**Assinado por:**  
**Deise Juliana Francisco (Coordenador)**