



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

JOSÉ LUIZ ARAUJO SANTOS

**CCorGsDB: Um banco de dados de genes correlacionados com o ritmo
circadiano no sistema nervoso central de camundongos**

**MACEIÓ
2022**

JOSÉ LUIZ ARAUJO SANTOS

CCorGsDB: Um banco de dados de genes correlacionados com o ritmo circadiano no sistema nervoso central de camundongos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Orientador (a): Profº Dr. Tiago Gomes de Andrade

**MACEIÓ
2022**

Catálogo na Fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho Freitas Neto – CRB-4 – 1767

S237c Santos, José Luiz Araujo.

CcorGsDb : um banco de dados de genes correlacionados com o ritmo circadiano no sistema nervoso central de camundongos / José Luiz Araujo Santos. – 2022.

95 f. : il., grafs., tabs.

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, 2022.

Bibliografia: f. 87-95.

1. Ritmo circadiano. 2. Genes controlados pelo relógio. 3. Redes de co- expressão. 4. Tecido cerebral. 5. Banco de dados. 6. Bioinformática. I. Título.

DEDICATÓRIA

*“Dedico às políticas públicas de
inclusão e permanência nas
Universidades.”*

“Dedico à minha mãe e ao meu pai”.

EPÍGRAFE

“É como se minha vida fosse uma pintura inacabada. E, como artista dessa pintura, eu preciso preencher todas as lacunas, e torná-la bonita outra vez”.

Stefani J. A.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço às políticas públicas de inclusão e permanência nas universidades, como a interiorização, cotas, bolsas, etc, essas políticas ajudam a amenizar as desigualdades econômicas e o acesso ao conhecimento nesse país, sem estas não conseguiria entrar nem permanecer na UFAL durante meus 10 anos de ensino superior.

Agradeço à minha mãe, Valdenice Brito de Araujo e ao meu pai, José Luiz Martins, que mesmo privados de seus direitos básicos como o acesso à educação e uma escola, e com todas as dificuldades financeiras enfrentadas ao longo da vida, sempre priorizam e incentivaram meus estudos. Espero que outras pessoas, que assim quiserem, da minha e de outras famílias, possam ter acesso à educação de qualidade e um ambiente de aprendizagem acessível e com condições de permanência. Tenho esperança em um Brasil mais inclusivo e com oportunidades.

Agradeço às minhas irmãs, Maria da Conceição e Deisiane, pelo amor, conselhos, incentivo, e por compartilharem também dos meus sonhos.

Agradeço à amiga Luciana Costa e sua família por todo carinho, cada palavra de incentivo e por cada abraço sincero.

Agradeço a Danilo Teodozio, meu parceiro, pelo carinho e companheirismo nos últimos dois anos.

Agradeço a Gerlane e a Iolanda pela torcida e incentivo através de suas amizades através de muitos anos.

Agradeço ao Psicólogo Emanuel Belarmino por todas as conversas e terapias acolhedoras no último ano.

Agradeço aos amigos e amigas do vale: Felipe Jackson, Fernando Mizael, Dhoone Menezes, Thiago Dantas, Jonathan Garcia, Iara Melo, Patrícia, Romário, Douglas, Jorge Belém, Bruna Koike e João Tenório pelas conversas descontraídas e encontros divertidos.

Agradeço aos amigos e amigas do Centro de Medicina Circadiana: Aline Silva, Daniel Coimbra, Ellyda Costa, Jacyara Farias, Larissa Tenório, Maria Oliveira, Mayara Rodrigues, Vivian Marcela e Waléria Dantas.

Agradeço ao **Profº** Tiago Gomes de Andrade pelos ensinamentos, orientação e confiança para desenvolver este trabalho.

Agradeço ao Vinicius Tenório pela colaboração na construção das redes de co-expressão e pelo desenvolvimento do banco de dados on line.

Agradeço à Universidade Federal de Alagoas – UFAL, ao Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde – ICBS, a Faculdade de Medicina – FAMED, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde- PPGCS e a todos os servidores que fazem com que estas unidades funcionem, especialmente a Dona Luisa, que cuida e zela tão bem da FAMED, à Prof. Josineide com sua amizade, carinho e gargalhadas, aos coordenadores do PPGCS: Prof^a. Salete Smannioto e Profº Marcelo Duzzione e aos técnicos Mirian e Jonathan.

Agradeço às amigas do PPGCS: Ana Caroline, Natally e Nancy pelo apoio e incentivo.

Agradeço ao Laboratório de Biologia Celular e Molecular pelas parcerias de pesquisas como nosso laboratório, em especial ao Júnior, Pedro, Igor e ao Profº. Daniel Gitaí.

Agradeço à Capes, Cnpq, Fapeal e a UFAL pelos financiamentos de bolsas e projetos, sem isto jamais chegaria até aqui.

Agradeço à banca de qualificação e de defesa por ter aceitado o convite e pelas contribuições neste trabalho.

Agradeço a todos os professores e professoras, desde a Educação Básica até a Pós-graduação, todos e todas tiveram contribuições neste processo.

Por fim, agradeço à vida e a Deus pela oportunidade de viver e aprender.

Muito obrigado a todas e todos!

RESUMO

Os ritmos circadianos são controlados por um conjunto de genes centrais, chamados genes do relógio, que são expressos de forma ubíqua. Cada tecido, no entanto, tem uma alta especificidade no conjunto de genes controlados pelo relógio (CCGs) que participam do sistema de saídas. Normalmente, a identificação de CCGs é baseada em conjuntos de dados de séries temporais, que são caros, trabalhosos e, em alguns casos, impossíveis de realizar. Uma abordagem recente baseada em padrões de correlação de marcadores circadianos tem sido usada para capturar CCGs em conjuntos de dados sem informações temporais. No entanto, esse método de aprendizado de máquina ainda exige que as amostras sejam coletadas ao longo do ciclo circadiano. Além disso, nem todo gene com função circadiana tem um padrão oscilatório em nível de transcrição. Assim, outras estratégias para identificar CCGs com resolução espacial podem ser vantajosas. Neste estudo, identificamos potenciais CCGs no Sistema Nervoso Central de camundongos, incluindo 12 regiões específicas, usando a Análise de Rede de Co-Expressão de Genes Ponderados (WGCNA) de dados de expressão de hibridização *in situ* disponíveis no Allen Mouse Brain Atlas. Módulos significativos foram filtrados com base em suas correlações com marcadores circadianos. Conjuntos de dados de genes correlacionados com relógio (CCorGs), avaliados nessas regiões com experimentos de curso de tempo anteriores, são enriquecidos para genes com maior *rAMP*. Vários CCorGs são alvos de drogas com ação de curta duração no SNC e podem ser candidatos a estudos cronofarmacológicos. Até onde sabemos, este é o primeiro estudo de análise de co-expressão para procurar CCGs no SNC. A estratégia utilizada tem potencial para identificar genes importantes para ritmos circadianos em tecidos específicos, superando limitações metodológicas consideradas em outros estudos.

Palavras-Chave: Ritmos Circadianos. Genes Controlados pelo Relógio. Redes de Co-expressão. Tecidos Cerebrais. Banco de Dados Circadiano. Bioinformática.

ABSTRACT

Circadian rhythms are controlled by a set of core genes, called clock genes, which are ubiquitously expressed. Each tissue, however, has a high specificity in the set of clock-controlled genes (CCGs) that participate in related circadian outputs. Normally, the identification of CCGs is based on time series datasets, which are costly, laborious and in some instances impossible to perform. A recent approach based on correlation patterns of circadian markers has been used to capture CCGs in datasets without temporal information. However, this machine learning method still demands that the samples are collected throughout the circadian cycle. Moreover, not every gene with circadian function has an oscillatory pattern at transcript level. Thus, other strategies for identifying CCGs with spatial resolution could be advantageous. In this study, we identified potential CCGs in the mouse Central Nervous System, including 12 specific regions, using Weighted Gene Co-expression Network Analysis (WGCNA) of in situ hybridization expression data available at the Allen Mouse Brain Atlas. Significant modules were filtered based on their correlations with circadian markers. Clock Correlated Genes (CCorGs) datasets, evaluated in those regions with previous time course experiments, are enriched for genes with higher rAMP. Several CCorGs are targets of drugs with short time action on the CNS and may be candidates for chronopharmacological studies. To our knowledge, this is the first study of co-expression analysis to search for CCGs in the CNS. The strategy used has the potential to identify important genes for circadian rhythms in specific tissues, overcoming methodological limitations considered in other studies.

Keywords: Circadian Rhythms. Clock Controlled Genes. Co-expression Networks. Brain Tissues. Circadian Database. Bioinformatics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Osciladores circadianos endógenos e <i>Zeitgebers</i> externos.....	18
Figura 2. Os núcleos supraquiasmáticos (NSQs)	20
Figura 3. Osciladores circadianos periféricos do cérebro.....	22
Figura 4. Mecanismos moleculares dos ritmos circadianos em mamíferos	25
Figura 5. Mecanismos pós-transcricionais dos ritmos circadianos em mamíferos	26
Figura 6. Principais etapas do WGCNA.....	27
Figura 1 (Artigo). <i>Pipeline</i> com as principais etapas da pesquisa.....	47
Figura 2 (Artigo). Genes correlacionados com o relógio e por tecido específico.....	52
Figura 3 (Artigo). Validação in silico.....	53
Figura 4 (Artigo). Tops <i>CCorGs</i> por tecido.....	54
Figura 5 (Artigo). Enriquecimento funcional no Sistema Nervoso Central.....	57
Figura 1 Suplementar (Artigo). Principais etapas do processo de construção das redes de co-expressão do Sistema Nervoso Central.....	70
Figura 2 Suplementar (Artigo). Enriquecimento funcional no Tronco Encefálico.....	71
Figura 3 Suplementar (Artigo). Enriquecimento funcional no Cerebelo.....	72
Figura 4 Suplementar (Artigo). Enriquecimento funcional no Hipocampo.....	73
Figura 5 Suplementar (Artigo). Enriquecimento funcional no Hipotálamo.....	74
Figura 6 Suplementar (Artigo). Enriquecimento funcional no Isocortex.....	75
Figura 7 Suplementar (Artigo). Enriquecimento funcional na Medulla.....	76
Figura 8 Suplementar (Artigo). Enriquecimento funcional no Mesencéfalo	77
Figura 9 Suplementar (Artigo). Enriquecimento funcional nas Areas Olfatórias	78
Figura 10 Suplementar (Artigo). Enriquecimento funcional no Globo Pálido.....	79
Figura 11 Suplementar (Artigo). Enriquecimento funcional na Ponte.....	80
Figura 12 Suplementar (Artigo). Enriquecimento funcional no Corpo Estriado	81
Figura 13 Suplementar (Artigo). Enriquecimento funcional no Tálamo.....	82
Figura 14 Suplementar (Artigo). Mapa de calor com <i>CCorGs</i> alvos de drogas farmacológicas com meia vida de até 12h e ação no sistema nervoso central.....	83
Figura 15 Suplementar (Artigo). Mapa de calor com <i>CCorGs</i> alvos de distúrbios neurodegenerativos e comportamentais associados aos ritmos circadianos por tecido	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais genes circadianos controladores dos ritmos em mamíferos.....	23
Tabela 1 Suplementar (Artigo). Parâmetros utilizados para construção das redes de co-expressão e os principais resultados estatísticos	68
Tabela 2 Suplementar (Artigo). Frequências dos genes circadianos nos conjuntos de <i>CCorGs</i> por tecido do Sistema Nervoso Central de camundongos	68
Tabela 3 Suplementar (Artigo). Expressão circadiana dos <i>CCorGs</i> mais correlacionados por tecido de acordo com o CircaDB.....	69

LISTA DE ABREVIATURAS

ABA - Allen Brain Atlas
AMPK - Amp Kinase
Arntl - Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator Like
AVP - Arginina Vasopressina
Bhlhe40 - Basic Helix-Loop-Helix Family, Member E 40
Bhlhe41 - Basic Helix-Loop-Helix Family, Member E 41
Bmal1 - Brain And Muscle-Arnt-Like Protein-1
CAMK II - Palmodulin-Dependent Kinase
CCGs - Clock Controlled Genes
CCorGs - Clock Correlated Genes
Chip-Seq - Chromatin Immunoprecipitation Sequencing
Clock - Circadian Locomotor Output Cycles Kaput
CK2 - Casein Kinase 2
Ck1 ϵ - Casein Kinase 1, Épsilon
Ck1 δ - Casein Kinase 1, Delta
Cry 1 - Cryptochrome1
Cry2 - Cryptochrome 24
Fbxl3 - F-Box And Leucine Rich Repeat Protein 3
Fbxl21 - F-Box And Leucine Rich Repeat Protein 21
GRP - Peptídeo Liberador De Gastrina
HIS- Hibridização In Situ
Id – Identificação
IMS-PCR - Intra-Module Scanning-Polymerase Chain Reaction
MAPK - Mitogen-Activated Protein Kinase
Non Correlated - Non Clock Correlated Genes
Npas2 - Neuronal Pas Domain Protein 2
NSQ - Núcleo Supraquiasmático
Nr1d1 - Nuclear Receptor Subfamily 1, Group D, Member 1
Nr1d2 - Nuclear Receptor Subfamily 1, Group D, Member 2
Per 1 - Period1
Per 2 - Period2
Per 3 - Period3
PKA - Protein Kinase A
Pubmed - Biblioteca Nacional De Medicina Dos Estados Unidos
RNAi - Rna de Interferência
RNA m - Rna Mensageiro
Rora - Rar-Related Orphan Receptor Alpha
Rorb - Rar-Related Orphan Receptor Beta
Rorc - Rar-Related Orphanreceptor Gamma
RT-PCR - Real Time Polymerase Chain Reaction
rAmp – Amplitude Relativa
SCF - Skp1-Cullin-F-Box Protein
TRH - Trato Retino Hipotalâmico
VIP - Polipeptídeo Intestinal Vasoativo

Sumário

1	Introdução	14
2	Referencial Teórico.....	16
2.1	Ritmos Circadianos	16
2.2	Osciladores Endógenos	18
2.2.1	Oscilador Central	18
2.2.2	Osciladores Periféricos no Cérebro	21
2.3	Mecanismos Moleculares dos Ritmos Circadianos em Mamíferos.....	23
2.4	Genes Circadianos e CCGs	26
2.5	Estudos de Expressão Circadiana em Tecidos Específicas do Cérebro de Mamíferos.....	30
2.6	Análises de Ritmicidade em Estudos de Transcriptoma	33
2.7	Redes de Co-expressão Gênica.....	35
3	Hipótese	40
4	Justificativa	41
5	Objetivos.....	42
5.1	Objetivo Geral.....	42
5.2	Objetivos Específicos.....	42
6	Artigo	43
7	Introduction	44
8	Materials and Methods	46
8.1	Data Information	46
8.2	Weighted Gene Co-Expression Networks Construction.....	48
8.3	Identification of Significant Modules.....	48
8.4	Clock Correlated Genes (CCorGs).....	49
8.5	In Silico Validation	49
8.6	Functional Enrichment Analysis	50
8.8	CCorGsDB Implementation.....	50
8.9	Statistical Analysis.....	50
9	Results and Discussion.....	51
10	References and Notes.....	60
11	Supplementary Materials - Tables.....	68
12	Supplementary Materials – Figures.....	70
13	Conclusões.....	85
14	Perspectivas	86
15	Referências da Introdução e do Referencial Teórico.....	87

1 Introdução

Os ritmos circadianos são fenômenos biológicos que se repetem com frequência de aproximadamente 24 horas, sincronizados por pistas ambientais, principalmente o ciclo de claro e escuro. Em mamíferos os ritmos circadianos são controlados sistemicamente pelos núcleos supraquiasmáticos localizados na base do hipotálamo, conhecidos também como relógio ou marca-passo central. Outras estruturas, entretanto, no cérebro e em outros órgãos, também apresentam ritmos circadianos, como o hipocampo, corpo estriado, cerebelo, conhecidos como relógios periféricos (HASTINGS et al.,2003; MARQUES e BARRETO, 2003; KUELLER, Rikard, 2002). Ritmos circadianos também podem ser observados por meio de marcadores biológicos e comportamentais como a temperatura corporal central, bem como a secreção de melatonina e cortisol e sono-vigília (CZEISLER, Charles A. et al.,1999).

A nível molecular, esses fenômenos cíclicos são controlados por um conjunto de genes do cerne, denominados de genes relógio ou genes circadianos, derivados do termo inglês *clock genes*, altamente conservados e ubiquamente expressos em diferentes células e tecidos de diferentes espécie e por genes controlados pelo relógio circadiano (CCGs) (TAKAHASHI, Joseph S.,201). Mecanismos transcricionais, traducionais e pós-transcricionais/traducionais participam da geração de ritmos moleculares que se repercutem nos vários ritmos fisiológicos e comportamentais importantes para a homeostase dos ritmos (KOJIMA, Shihoko; SHINGLE, Danielle L.; GREEN, Carla B.,2011).

Em 1971, Ronald Konopka e Seymour Benzer a partir de experimentos de mutagênese em mosca da fruta (*Drosophila melanogaster*) descobriu o primeiro gene circadiano conhecido como *Per* (abreviação de "*period*") (KONOPKA, Ronald J.; BENZER, Seymour BUHR,1971). Anos depois, em 1984, Jeffery C. Hall e Michael Rosbash e Michael Young clonaram independentemente o gene *Per* e introduziram pesquisas que ajudaram no desvendamento dos mecanismos moleculares que controlam o ritmo circadiano até os dias atuais, lhes concedendo o Prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina de 2017 (BARGIELLO, Thaddeus A.; JACKSON, F. Rob; YOUNG, Michael W.,1984).

A quantidade de estudos com análises do transcriptoma circadiano, realizados por meio de técnicas como *ChIP-seq*, *RNA-seq*, *Microarray* e outras, aumentou de forma constante nos últimos 20 anos (HUGHES, Michael E. et al.,2017). Muitos desses estudos apontam que o número de CCGs é muito diferente entre os tecidos de camundongos, em alguns tecidos, mais de 10% de todo o transcriptoma é rítmico, enquanto apenas alguns por cento são rítmicos em

outros, podendo chegar até 50% se for considerarmos a soma de todos os tecidos e milhares muitos com importância cronofarmacológica. No entanto, quando se trata de tecidos cerebrais, poucos são os estudos que realizem análises do transcriptoma circadiano, tanto no cérebro de camundongos quanto em humanos (WU, Gang et al.,2020). Além disso, ainda não está claro como o sistema de temporização circadiano central produz mais genes com expressão circadiana em alguns tecidos do que em outros, tendo em vista que os mecanismos e relações dos genes circadianos são quase idênticos em cada tecido (LITTLETON, Evan S. et al.,2020).

A melhor detecção de ritmicidade depende do algoritmo escolhido, dos desenhos experimentais e características dos dados, além disso, a normalização dos dados e a correção do efeito do lote são cruciais para remover vieses e artefatos técnicos para gerar melhores resultados (JIANG, Yuchao et al.,2018.). Os resultados de estudos com transcriptoma circadiano muitas vezes são inconsistentes, pois, em muitos estudos, não é claro quais genes tem papéis importantes para os ritmos, mesmo no caso de estudos que utilizam a mesma abordagem metodológica e avaliação no mesmo tecido, apresentam incompatibilidade entre os resultados (KOJIMA, Shihoko; GREEN, Carla B.,2014).

Desta forma, um(a) pesquisador(a) cronobiologista enfrenta muitas barreiras de análises de dados em qualquer estudo do transcriptoma circadiano, que incluem estratégia de amostragem, parâmetros estatísticos adotados, custos e objetivo da pesquisa, sequenciamento de nova geração e interpretação dos dados, algoritmo de detecção rítmica, anotação funcional e validação dos dados e amostras com series temporais (MEI, Wenwen et al.,2020).

Um método capaz para superar a falta de dados de séries temporais é através da análises de redes de co-expressão gênica pelo *Weighted Gene Correlation Network Analysis (WGCNA)*, o qual tem propriedades para investigar as relações gene a gene de uma forma não supervisionada e agrupando-os de forma coordenada em módulos, fornecendo uma estratégia de análise que ajuda a entender melhor os padrões de expressão gênica em diversas estruturas, inclusive em regiões do cérebro, que podem ser impulsionados por processos biológicos, celulares e moleculares semelhantes e distintos (NEGI e GUDA, 2017).

Nesta pesquisa, utilizamos dados de expressão gênica em larga escala de tecidos específicos do sistema nervoso central de camundongos disponíveis no portal *Allen Brain Atlas*, para construir redes de co-expressão gênica e identificar de genes que possuem oscilação ou função circadiana, por meio de análises de correlação de expressão com biomarcadores

circadianos, enriquecimento funcional e validação *in silico* com parâmetros circadianos, associações de genes candidatos com doenças e drogas do sistema nervoso central.

2 Referencial Teórico

2.1 Ritmos Circadianos

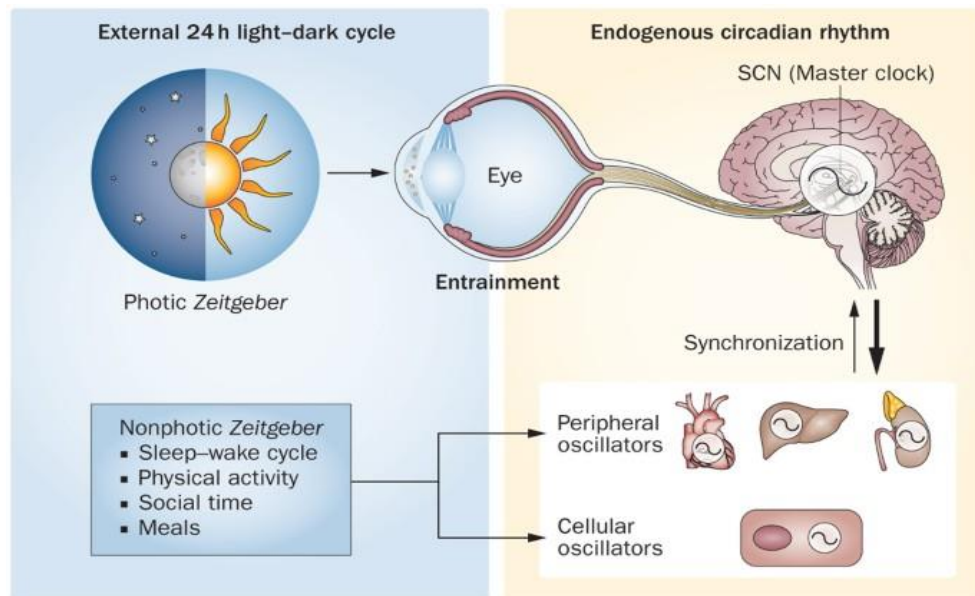
Ritmos biológicos são eventos que se repetem regularmente, estão associados a ciclos ambientais e sua determinação endógena é comprovada cientificamente (MARQUES e MENNA-BARRETO, 2003). Estes ritmos são encontrados em diferentes organismos vivos, sejam eles os mais simples, seres unicelulares, como cianobactérias, a multicelulares, como plantas e animais (LEMMER, Björn 2009; LOWREY; TAKAHASHI, 2004; BELL-PEDERSEN et al., 2005). Os ritmos circadianos sofrem arrastamento por sincronizadores ambientais externos, também chamados de *Zeitgebers* (termo de origem germânica que significa “doadores de tempo”), os fóticos, como exemplo temos o ciclo de claro e escuro, e por sincronizadores não-fóticos, como: temperatura, alimentação, atividade física e os ritmos sociais como trabalho e lazer (BUTTGEREIT, Frank et al. 2015). Como mencionado anteriormente, esses ritmos persistem na ausência destes fatores ambientais, comprovando a existência de ritmos biológicos no metabolismo e fisiologia gerados por um oscilador endógeno molecular em todas as células (MARQUES e MENNA-BARRETO, 2003; PEREIRA et al., 2009) (**Figura 1**).

Os ritmos biológicos apresentam diferentes padrões cíclicos e compreendem três categorias de ritmos que diferem em seus períodos e frequência: ritmos circadianos (do grego *circa*, que significa aproximado, e *dian* – dia), duram aproximadamente 24h, com variação de mais ou menos 4h. Exemplos de ritmos circadianos são: o ciclo sono/vigília em humanos, atividade e repouso em roedores, variações diárias da temperatura ambiental e também corpórea, comportamento alimentar, produção de hormônios e expressão gênica (HASTINGS et al., 2003; MARQUES e BARRETO, 2003; KULLER, Rikard, 2002). Os ritmos ultradianos possuem um período inferior à 20h, como exemplo, temos os ritmos fisiológicos como: o ciclo respiratório, batimentos cardíacos e pulsação sanguínea, os ritmos infradianos, que possuem período superior à 28h, têm como exemplos o ciclo menstrual das mulheres, hibernação, estivação, reprodução e movimentos migratórios de algumas espécies de animais (BOTBOL, Michel, et al., 2003).

Os ritmos circadianos nos vertebrados, especificamente em mamíferos, são sincronizados aos ritmos ambientais a partir de um sistema composto por três componentes: **primeiro** - formada por sinais ambientais; **segundo** – os sinais ambientais são captados, sincronizando a atividade do núcleo supraquiasmático (NSQs), também conhecido como o oscilador biológico endógeno ou marca-passo central, localizado na base do hipotálamo no cérebro de mamíferos (MARQUES e BARRETO 2003; BUHR e TAKAHASHI, 2013; LOWREY e TAKAHASHI, 2004; TOSINI, Gianluca et al., 2008). **Terceiro** - os sinais gerados pelos NSQs através das vias de sinalização neuronal e humoral, constituem a via eferente de saída (*output*), que regulam sistemicamente e ritmicamente os diversos processos bioquímicos, fisiológicos e comportamentais. (Lowrey e Takahashi, 2011), **(Figura 1)**.

Em mamíferos, os ritmos circadianos não são regulados somente pelo NSQs, mas também por uma rede com vários outros osciladores ou relógios biológicos periféricos, dentre eles: células, tecidos, estruturas, órgãos e expressão de genes, fora e dentro cérebro (DIBNER, Charna; SCHIBLER, Ueli; ALBRECHT, Urs, 2010). De fato, evidências mostram que os ritmos moleculares estão presentes até mesmo em células e tecidos individuais (LIU, Andrew C.; LEWIS, Warren G.; KAY, Steve A., 2007). Estes osciladores interagem e são sincronizados pelos NSQs, mas independem deste para gerar ritmos que controlam vários processos fisiológicos, como a homeostase da glicose no fígado, balanço energético, fluxo plasmático renal no rins, produção de urina, pressão arterial e frequência cardíaca no coração, transporte de moléculas, resposta imune inata e sinalização celular (MENDOZA, Jorge; CHALLET, Etienne, 2009, TOSINI, Gianluca, et al., 2008, HARBOUR, 2013), **(Figura 1)**.

Figura 1. Osciladores circadianos endógenos e *Zeitgebers* externos. As oscilações circadianas intrínsecas no cérebro e na periferia são sincronizadas por meio de sinais humorais e do sistema nervoso autônomo. O sistema circadiano sincroniza ativamente a sequência temporal das funções biológicas com o ambiente. O ciclo claro-escuro é o *Zeitgeber* (sincronizador) mais importante. Outras pistas potenciais de arrastamento ambiental derivam de ciclos de sono-vigília e atividades, horários de refeições e ritmos sociais, como trabalho e lazer. A sigla SCN, significa o termo em inglês *suprachiasmatic nucleus*.



Fonte: BUTTGEREIT, Frank et al, 2015.

2.2 Osciladores Endógenos

2.2.1 Oscilador Central

Em 1960, Curt Richter, com conhecimentos prévios, sabia que osciladores biológicos, considerados dispositivos do corpo, marcavam o tempo com relativa independência de condições e eventos externos, mas se perguntava o que eram esses osciladores e onde estavam localizados anatomicamente no corpo dos mamíferos (RICHTER, Curt, P.,1960). Anos depois, em 1972, Friedrich Stephan e Irving Zucker conduziram um experimento com o objetivo de avaliar o ritmo comportamental de atividade e repouso em grupos de ratos com lesões nas sub-regiões do hipotálamo: núcleos supraquiasmáticos e área pré-óptica medial. Seus resultados mostraram que o grupo de ratos com lesões nos núcleos supraquiasmáticos tinham o ritmo de atividade locomotora abolido. Sugerindo que essa sub-região do hipotálamo poderia conter marcapassos responsáveis pela geração de certos ritmos comportamentais (STEPHAN, Friedrich K.; ZUCKER, Irving.,1972).

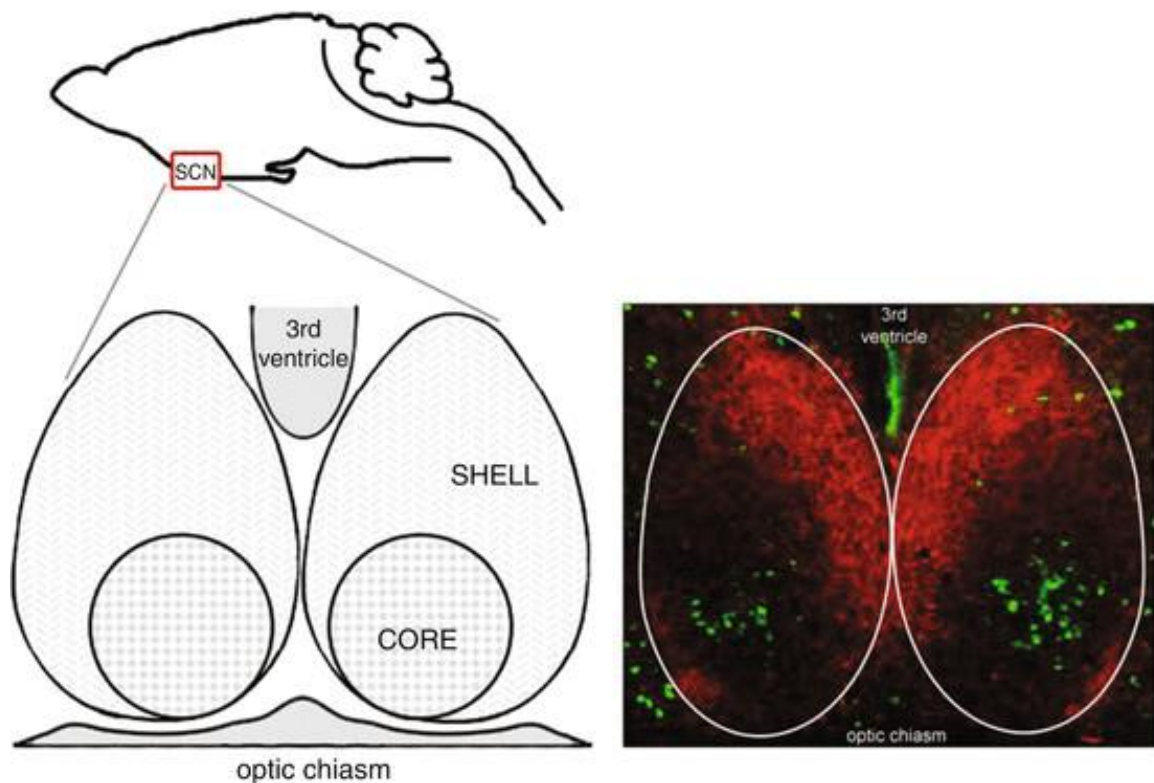
Outro estudo, no mesmo ano de 1972, mostrou que ratos com lesões nos NSQs perderam o ritmo circadiano do hormônio corticosterona na adrenal (MOORE, Robert Y.; EICHLER, Victor, 1972). Um estudo seguinte mostrou que lesões completas nos NSQs eliminam a ritmicidade circadiana da temperatura corporal e atividade locomotora em hamsters (REFINETTI, R.; KAUFMAN, C. M.; MENAKER, M., 1994). Além disso, a expressão circadiana de alguns genes é afetada quando os NSQs são lesionados ou removidos, como foi demonstrado no estudo de Hongian G. et al, 2016, no qual observou que houve alteração da expressão rítmica dos genes *Bmal1*, *Per1* e *Per2* em fígado, rim, baço, coração, músculo esquelético e medula adrenal de hamsters com NSQs lesionados (GUO, Hongian et al., 2006). Esses e diversos outros estudos comprovam que os NSQs regulam a secreção de hormônios e ritmo de atividade locomotora e estão no topo da organização hierárquica do sistema de temporização circadiana nos mamíferos (ALBRECHT, 2012).

Os NSQs são considerados os osciladores centrais em mamíferos, formado por um par de núcleos localizados no sistema nervoso central (SNC) de vertebrados, na porção anterior do hipotálamo sendo constituídos por, aproximadamente, 10.000 neurônios em camundongos, e 50.000 neurônios em humanos (MARQUES e BARRETO 2003; BUHR e TAKAHASHI, 2013). Subdivididos em duas regiões anatômicas: uma ventrolateral, chamada de *core*, e outra região dorsomedial e rostral, conhecida como *shell*. A região *core* está localizada acima do quiasma óptico. Ela recebe inervação direta do trato retino hipotalâmico (TRH) e caracteriza-se pela presença do neuropeptídeo Y, pelo polipeptídeo intestinal vasoativo (VIP) e o peptídeo liberador de gastrina (GRP) (WELSH, David K.; Takahashi, Joseph S.; KAY, Steve A., 2010), **(Figura 2)**.

Na região *shell* foram identificados a arginina vasopressina (AVP) e outros neuropeptídeos, como o met-enkefalina e a angiotensina II (ABRAHAMSON, Eric E.; MOORE, Robert Y., 2001; WELSH, David K.; Takahashi, Joseph S.; KAY, Steve A., 2010), **(Figura 1)**. A retina e o TRH representam a via aferente ou de entrada de sinais luminosos dos ritmos circadianos em mamíferos. (LOWREY e TAKAHASHI, 2004).

Figura 2. Desenho no plano sagital do cérebro de camundongos, destacado na caixinha vermelha os núcleos supraquiasmáticos (NSQs). Abaixo está um esquema ampliado do NSQs visto no plano coronal. A sub-região do ventral, *core*, é delineada pelo círculo e a área dorsal circundante é a sub-região *shell*. Entre os lados esquerdo e direito do NSQs está o terceiro ventrículo e, abaixo do NSQs, está o quiasma óptico. À direita, as sub-regiões *core* e *shell* podem ser distinguidas pelo conteúdo neuroquímico de suas células. A fotomicrografia mostra um NSQs de hamster. Técnicas imunocitoquímicas foram utilizadas para identificar os neuropeptídeos contidos nas células do NSQs. A coloração vermelha revela células AVP e delineia a sub-região *shell* do NSQs. As células contendo calbindina são coradas em verde e

identificam a sub-região *core*. Observe que há poucas células de calbindina na área de coloração de AVP, embora células dispersas de calbindina sejam vistas fora do NSQs. A sigla SCN deriva do termo em inglês *suprachiasmatic nucleus*.



Fonte: RAE e MEGAN, 2013.

A informação fótica é recebida pela retina por meio de células fotorreceptoras e são transmitidas para as células ganglionares da retina, que em seguida transmite a informação fótica para o cérebro via *TRH*, cujos axônios projetam-se até os NSQs enviando informações fóticas através do neurotransmissor glutamato, constituindo a via eferente ou de saída. (BROOKS, Elisabeth; CANAL, Maria M., 2013; MARQUES E BARRETO, 2003).

Os NSQs sincronizam outros osciladores em todo o cérebro e tecidos periféricos do corpo por meio de diversas vias, incluindo conexões neurais autonômicas e hormônios, que contribuem para sincronizar as células da maioria dos tecidos (WELSH, David K.; TAKAHASHI, Joseph S.; KAY, Steve A. 2010). Por exemplo, a regulação da expressão de genes circadianos no fígado é impulsionada, por sinais emanados dos NSQs (GUILDING, Clare; PIGGINS, Hugh D., 2007; DAMIOLA, Francesca et al., 2000; YAMAZAKI, Shin, et al., 2000).

2.2.2 Osciladores Periféricos no Cérebro

Os *NSQs* não são as únicas estruturas do cérebro que exibe oscilações diárias. Os núcleos no tálamo e hipotálamo, amígdala, hipocampo, corpo estriado e os bulbos olfatórios também mostram oscilações (GUILDING e PIGGINS, 2007). Os ritmos mais robustos, além dos observados nos *NSQs*, são encontrados também nos bulbos olfatórios e em tecidos que apresentam funções neuroendócrinas. Essas áreas do cérebro incluem o núcleo arqueado (*ARC*), o núcleo paraventricular (*PVN*) e a glândula pituitária (DIBNER, Charna; SCHIBLER, Ueli; ALBRECHT, Urs.,201).

Em 2004, o bulbo olfatório foi identificado como o primeiro relógio periférico no cérebro que possui oscilação circadiana independente dos *NSQs* em mamíferos. A taxa de neurônios disparados por células do bulbo olfatório cultivadas *in vitro* demonstrou oscilação circadiana por um período aproximado de 24 horas (GRANADOS-FUENTES, Daniel et al., 2004; HERZOG, Erik D.,2007). Regiões individuais do cérebro, tais como o hipotálamo, o corpo estriado e os córtices contêm sua própria oscilação circadiana, independentemente dos *NSQs* e suas células são capazes de gerar ritmos circadianos quando são isoladas dos organismos e cultivadas *in vitro* (ABE et al., 2002; HERZOG, Erik D.,2007). O cerebelo também foi descrito como um relógio periférico, pois é comprovada sua associação no controle do ritmo circadiano alimentar (MENDOZA, Jorge et al.,2010). Além disso, a taxa de disparo neuronal das células *Purkinje*, presentes no cerebelo, demonstrou oscilação durante aproximadamente três dias. (MORDEL, Jérôme et al.2013). A **(Figura 3)** mostra uma representação dos osciladores periféricos no cérebro de mamíferos e o oscilador central.

Figura 3. Visão geral dos osciladores cerebrais que garantem o controle dos ritmos circadianos. Os núcleos supraquiasmáticos (NSQs) captam a informação da luz, ativa direta e indiretamente através dos osciladores como o hipotálamo, corpo estriado, cerebelo e tronco encefálico. O ciclo de alimentação-jejum, por sua vez, aciona osciladores em órgãos periféricos que sinalizam de volta ao cérebro por meio de nutrientes, hormônios e sinais neuronais para regular a ingestão os ritmos circadianos. A sigla SCN deriva do termo em inglês *suprachiasmatic nucleus*.

Fonte: SEGERS, Anneleen; DEPOORTERE, Inge, 2021.

Foi demonstrado que os RNAm e as proteínas dos genes *Pers* são ritmicamente expressas em culturas de células neurais do hipocampo, corpo estriado, córtex piriforme e cerebelo de rato (ABE et al., 2002). *Dec1* e *Dec2* também possuem expressão circadiana comprovada em cultura de células do córtex frontal (ROSSNER, Moritz J. et al., 2008). *Npas2* é expresso em algumas regiões do cérebro como, no hipocampo, corpo estriado e córtex. Camundongos *knockout* para esse gene apresentaram alterações nos ritmos circadianos de atividade e repouso, e no ritmo alimentar. Estas alterações indicam que a expressão de *Npas2* nas regiões citadas está envolvida com o comportamento em camundongos (DUDLEY, Carol A. et al., 2003). Além disso, os genes *Per1*, *Per2*, *Per3*, *Cry1*, *Bmal1*, *Nr1d1* e *Dbp* possuem expressão circadiana

comprovada em cerebello de ratos (RATH, Martin F.; ROHDE, Kristian; MØLLER, Morten, 2012).

2.3 Mecanismos Moleculares dos Ritmos Circadianos em Mamíferos

O mecanismo molecular dos ritmos circadianos é constituído, fundamentalmente, por alças de retroalimentação transcricionais e traducionais, mantidas por um conjunto de genes altamente conservados filogeneticamente entre os animais, conhecidos como genes circadianos ou genes relógio, derivados do termo inglês *clock genes* (HASTINGS, Michael H.; REDDY, Akhilesh B.; MAYWOOD, Elizabeth S. A., 2003; Lowrey e Takahashi, 2004), e também por genes controlados pelo relógio, conhecidos como *CCGs* (*Clock Controlled Genes*) (TAKAHASHI, Joseph S., 2014).

Em mamíferos, o conjunto de genes circadianos mais importantes e estudados é formado por mais de 10 genes, dos quais os mais conhecidos estão listados na **Tabela 1**, abaixo.

Tabela 1. Principais genes circadianos controladores dos ritmos em mamíferos.

<i>Símbolo</i>	<i>Nome</i>	<i>Referência</i>
<i>Arntl</i>	Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator like	BUNGER, Maureen K. et al., 2000
<i>Bhlhe40</i> (<i>Dec1</i>)	Basic helix-loop-helix family, member e 40	HONMA et al., 2002
<i>Bhlhe41</i> (<i>Dec2</i>)	Basic helix-loop-helix family, member e 41	HONMA et al., 2002
<i>Bmal1</i>	<i>Brain and muscle-Arnt-like protein-1</i>	BUNGER, Maureen K. et al., 2000
<i>Clock</i>	<i>Circadian locomotor output cycles kaput</i>	VITATERNA, M. Hotz et al., 1994
<i>Cry 1</i>	<i>Cryptochrome 1</i>	GRIFFIN, Edmund A.; STAKNIS, David; WEITZ, Charles J., 1999
<i>Cry2</i>	<i>Cryptochrome 2</i>	VAN DER HORST et al., 1999
<i>Fbxl3</i>	F-box and leucine rich repeat protein 3	SIEPKA, Sandra M. et al. 2007
<i>Fbxl21</i>	F-box and leucine rich repeat protein 21	DARDENTE, Hugues et al. 2008
<i>Npas2</i>	Neuronal PAS domain protein 2	REICK, Martin et al., 2001
<i>Nr1d1</i> (<i>Rev-erba</i>)	<i>Nuclear receptor subfamily 1, group D, member 1</i>	PREITNER et al., 2002
<i>Nr1d2</i> (<i>Rev-erbβ</i>)	<i>Nuclear receptor subfamily 1, group D, member 2</i>	PREITNER et al., 2003
<i>Per 1</i>	<i>Period 1</i>	ZYLKA et al., 1998
<i>Per 2</i>	<i>Period 2</i>	MALER, Thomas et al., 1992
<i>Per 3</i>	<i>Period 3</i>	TAKUMI et al., 1998
<i>Rora</i>	RAR-related orphan receptor alpha	SATO et al., 2004
<i>Rorb</i>	RAR-related orphan receptor beta	SATO et al., 2004
<i>Rorc</i>	RAR-related orphanreceptor gamma	SATO et al., 2004

Fonte: Autor, 2021.

Os genes circadianos, assim como os CCGs, participam de mecanismos transcricionais e pós-transcricionais e alças de retroalimentação moleculares que regulam e mantêm os ritmos circadianos em homeostase (TAKAHASHI, Joseph S., 2017). A primeira alça de retroalimentação, positiva, inclui elementos membros da família de fatores de transcrição do tipo *basic helix-loop-helix*, como *Clock* e *Bmal1* (kO, Caroline H. e Takahashi, Joseph S., 2007).

As proteínas CLOCK e BMAL1 se associam, formando um heterodímero, que transloca do citosol para o núcleo celular e inicia a transcrição, ligando-se à região regulatória *E-box* (5'-CACGTG-3') de genes alvos como, *Per1*, *Per2*, *Cry1* e *Cry2*, e de vários CCGs, traduzindo-os em proteínas (DUNLAP, Jay C., 1999; PARTCH, Carrie L.; GREEN, Carla B.; TAKAHASHI, Joseph S., 2014; SHEARMAN, Lauren P. et al., 2000; TOSINI, Gianluca et al., 2008). Com o aumento dos níveis das proteínas PER1, PER2, CRY1 e CRY2, forma-se um novo complexo heterodímero PER/CRY, que irá inibir a transcrição das proteínas CLOCK e BMAL1, seu ativador, e consequentemente sua própria transcrição (TAKAHASHI, Joseph S. et al, 2008).

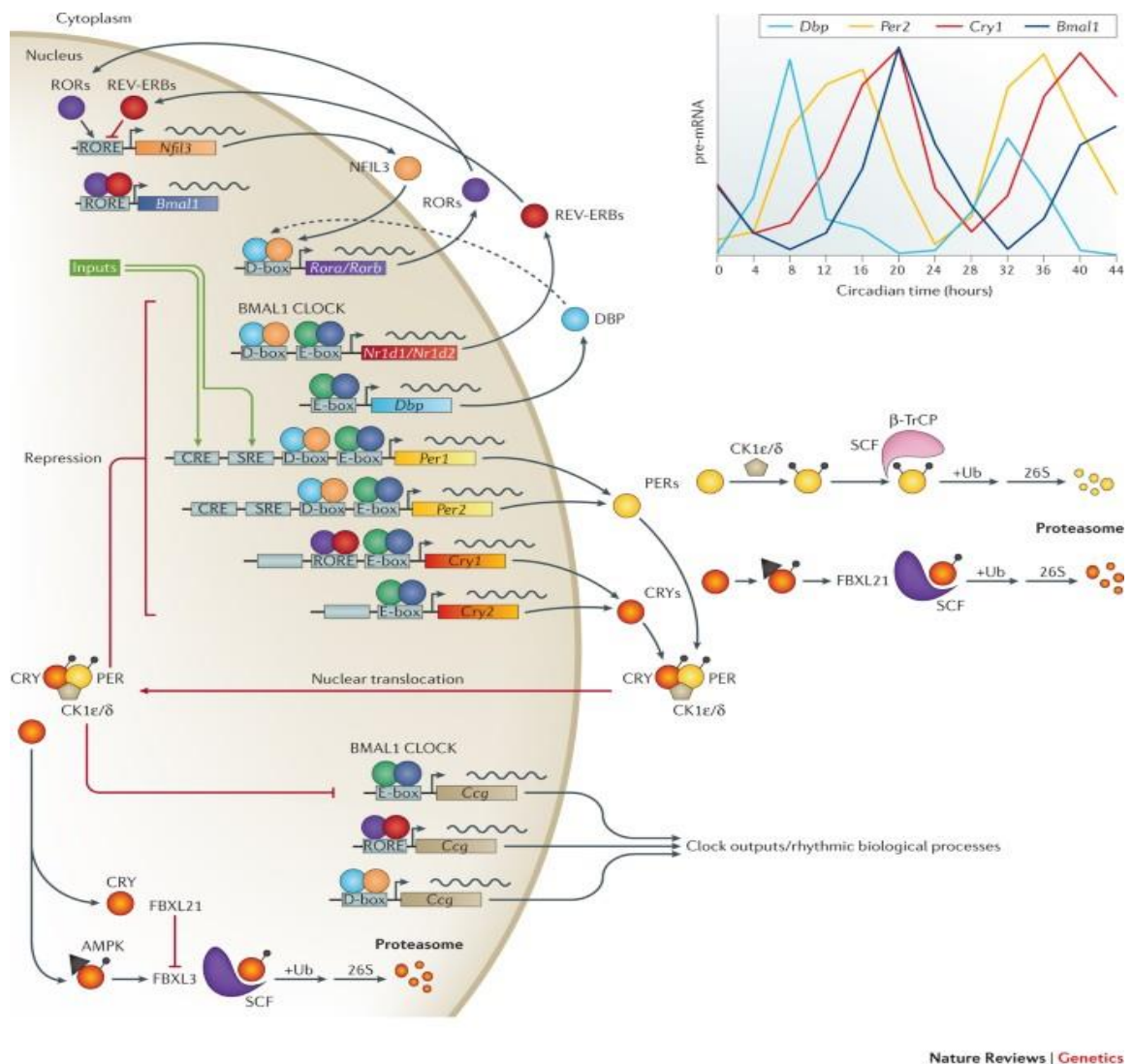
A atuação repressora das proteínas PER e CRY consiste, desta forma, na segunda alça de retroalimentação dos mecanismos moleculares do sistema circadiano, mas neste caso negativa, mantendo o equilíbrio da quantidade dessas moléculas entre o citoplasma e núcleo das células (ALBRECHT, Urs; EICHELE, Gregor, 2003) **(Figura 4)**.

Outra alça de retroalimentação é induzida também pelo heterodímero CLOCK/BMAL1, atuando na transcrição dos genes *Nr1d1* e 2 e *Rors*, que competem pela ligação ao mesmo sítio no promotor de *Bmal1*. Assim, RORs ativam a transcrição de *Bmal1*, enquanto NR1D1 e 2 reprimem o processo de transcrição de *Bmal1*, resultando na regulação dos diferentes processos biológicos rítmicos (AKASHI, Makoto; TAKUMI, Toru, 2005; TRIQUENEAUX, Gérard et al., 2004) **(Figura 4)**.

A nível pós-transcricional as proteínas FBXL3 (F-box and leucine rich repeat protein 3) (SIEPKA, Sandra M. et al. 2007) FBXL21 (F-box and leucine rich repeat protein 21) (DARDENTE, Hugues et al. 2008), juntamente com o complexo de ubiquitina ligase E3 SCF (*Skp1-Cullin-F-box protein*), da enzima β -TrCP e o complexo proteossomo 26S atuam degradando as proteínas PER e CRY. Outras proteínas como as quinases CK1 ϵ (casein kinase 1, ϵ), CK1 δ (casein kinase 1, δ) e a AMP kinase (AMPK) atuam fosforilando as proteínas PER e CRY (LOWREY e TAKAHASHI, 2004; TAKAHASHI et al., 2008; MOHAWK, Jennifer A.; GREEN, Carla B.; TAKAHASHI, Joseph S., 2012; TAKAHASHI, J.

S. 2015). Além destas, outras quinases envolvidas em vias de sinalização celular como a PKA (protein kinase A), CaMK II (calmodulin-dependent kinase) e a MAPK (mitogen-activated protein kinase) estão envolvidas na regulação da ativação da proteína CLOCK (WEBER, Frank et al., 2006), (**Figura 4**).

Figura 4. Alça de retroalimentação molecular transcricional e traducional do sistema circadiano em mamíferos. As setas azuis representam a alça de retroalimentação positiva e as vermelhas a alça de retroalimentação negativa. São descritas também vias de degradação e fosforilação de proteínas, a regulação dos CCGs (Genes Controlados pelo Relógio) como via de saída desse sistema, e a expressão circadiana a nível pré-mRNA de quatro principais genes circadianos (caixa à direita).



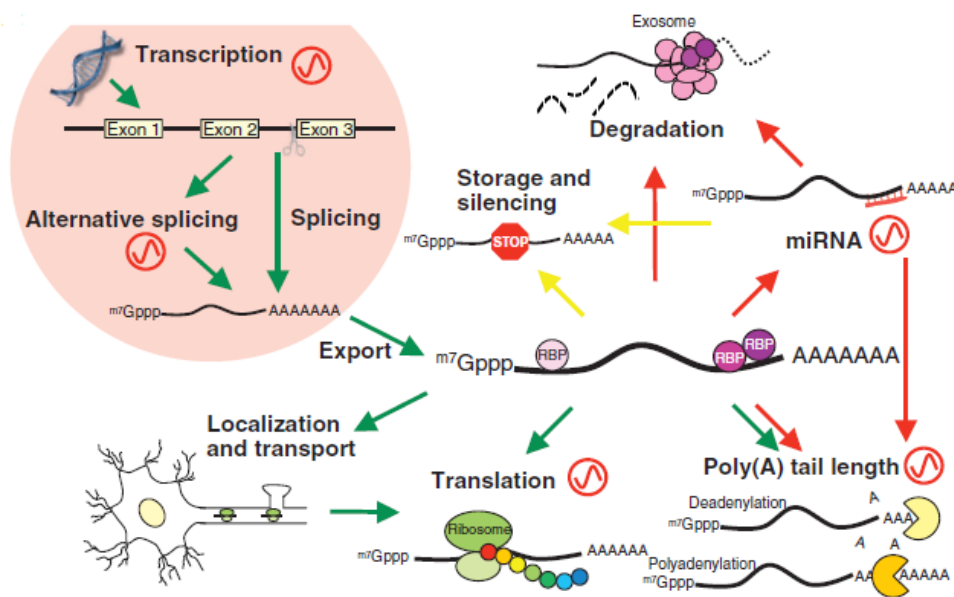
Fonte: TAKAHASHI, Joseph S, 2017.

Outros níveis de regulação gênica são importantes para o funcionamento do sistema circadiano, e envolvem processos como: fosforilação, splicing alternativo, degradação, tradução, ubiquitinação, sumoilação, regulação do comprimento da cauda poli (A), atuação

de microRNAs e vias de sinalização celular (KOJIMA, Shihoko; SHINGLE, Danielle L.; GREEN, Carla B.,2011; BECHTEL, William.,2016), (**Figura 5**).

Compreender a interação entre os mecanismos moleculares transcricionais e pós-transcricionais é importante para o entendimento do panorama geral da expressão de genes circadianos e seu envolvimento com os ritmos nos tecidos e células específicos (PARTCH, Carrie L.; GREEN, Carla B.; TAKAHASHI, Joseph S., 2014).

Figura 5. Mecanismos pós-transcricionais dos ritmos circadianos. Os processos destacados pelo símbolo (🕒) indicam que possuem regulação circadiana conhecida, como: transcrição, fosforilação, splicing, degradação, tradução, ubiquitinação, sumoilação, regulação do comprimento da cauda poli (A), atuação de microRNAs e vias de sinalização celular. As setas verdes, amarelas e vermelhas indicam vias que conduzem aos processos de tradução e silenciamento traducional e degradação de RNAm, respectivamente. Estão também envolvidas as RBP (RNA-binding proteins) proteínas de ligação em RNA, e os m7Gppp (7-methylguanosine cap) cap 7 metilguanossina.



Fonte: KOJIMA, Shihoko; SHINGLE, Danielle L.; GREEN, Carla B.,2011.

2.4 Genes do relógio e CCGs

Diferentes abordagens e métodos, nas últimas décadas, foram utilizadas para identificar genes circadianos e CCGs e o seu papel na regulação dos ritmos em mamíferos. A descoberta dos primeiros e principais genes circadianos, controladores dos ritmos em mamíferos, iniciou-se a partir de 1990. Em 1994, Martha Vitaterna e colaboradores, identificaram o primeiro gene envolvido com o sistema circadiano de mamíferos. Após realizarem uma análise de mutagênese em camundongos, observaram que os animais apresentavam mudanças no padrão temporal do comportamento de atividade e repouso, relacionando essas mudanças a mutações em um gene

localizado no cromossomo 5 de camundongos, equivalente ao cromossomo 4 em humanos, o qual foi denominado de *Clock* (nome que remete a tempo e temporização), e que hoje sabemos ser essencial na regulação dos ritmos circadianos em mamíferos (VITATERNA, M. Hotz et al.,1994).

Em 1992, Maler e colaboradores avaliaram que sequências conservadas do gene *Per1* em drosófila eram também expressas nos *NSQs* de mamíferos (MALER, Thomas et al.,1992). Cinco anos depois, em 1997, complementando esse estudo, TEI e colaboradores 2007 confirmaram esse dado através da análise de pequenas sequências do gene por IMS-PCR (*intra-module scanning-polymerase chain reaction*), e confirmaram através da técnica de hibridização *in situ* (*HIS*) a expressão circadiana deste gene nos *NSQs* de camundongos (TEI, Hajime et al., 1997). Logo em seguida, em 1998, Takumi e colaboradores também demonstraram a expressão circadiana do gene *Per2* em *NSQs* de camundongos, através da técnica de *HIS* (TAKUMI, Toru et al., 1998). Nesse mesmo ano, Mark Zylka e colaboradores demonstraram a expressão circadiana de *Per3* também em *NSQs* de camundongos, completando a família de genes *Pers* (ZYLKA, Mark J. et al., 1998).

Em 1999, Van der Host e colaboradores, mostraram que as proteínas CRY1 e CRY2 são essenciais para a manutenção dos ritmos circadianos por meio de análises temporais de comportamento de atividade repouso em camundongos e da quantificação de RNA e proteínas pelas técnicas de *RT-PCR* e *Southern blot*. Eles encontraram que camundongos *knockout* para o gene *Cry2* apresentaram alongamento do período circadiano endógeno em condições de escuro constante, e que animais *knockout* para o gene *Cry1* apresentaram encurtamento de seus períodos circadianos endógenos. Quando os animais são *knockout* para ambos os genes, eles apresentam arritmia no ritmo de atividade e repouso (VAN DER HORST, Gijsbertus TJ et al.,1999).

Bmal1, outro importante gene relógio teve seu envolvimento comprovado com os ritmos circadianos no ano de 2000, através de análises comportamentais e de expressão gênica por *hibridização in situ*. Assim, BUNGER e colaboradores demonstraram que camundongos *knockout* para este gene, apresentaram arritmia no perfil comportamental de atividade e repouso em condições de escuro constante (BUNGER, Maureen K. et al.,2000).

Com o surgimentos de técnicas moleculares de análises em larga escala como: *RNA-seq*, *Microarray*, *ChiP-seq* e *screening* por *RNAi* (RNA de interferência), dentre outras, e da ciência ômica (ex: genômica, transcriptoma, proteoma), ofereceram também aos

cronobiologistas dados para identificar novos grandes conjuntos CCGs e proteínas circadianas em modelos animais e em humanos (BHARGAVA, Anuprabha; HERZEL, Hanspeter; ANANTHASUBRAMANIAM, Bharath, 2015; OJIMA, Shihoko; GREEN, Carla B.,2014; HOGENESCH, John B.; UEDA, Hiroki R.,2011). Por exemplo, um estudo em larga escala utilizando a técnica de *RNAi* revelou que a casein kinase 2 (CK2) está envolvida com o relógio circadiano de mamíferos, atuando na fosforilação da proteína PER2 (MAIER, Bert et al.,2000).

Análises de *ChiP-seq* de sete proteínas circadianas, BMAL1, CLOCK, NPAS2, CRY1, CRY2, PER1 e PER2, fatores de transcrição, identificaram que centenas de genes possuem sítios de ligação para essas proteínas individualmente e quando formam heterodímeros, podendo ter suas transcrições ativadas ou inativadas quando elas se ligam em seus sítios (KOIKE et al., 2013). FANG e colaboradores (2014) encontraram, também através de análises de *ChiP-seq*, que em algumas fases do dia, em fígado de camundongo *Knockout*, diversos genes que possuem sítios de ligação para o fator de transcrição circadiano NR1D1, tendo seus transcritos inibidos ou ativados após a deleção dessa proteína (FANG,2014). Um estudo de análise genômica identificou que a proteína RORa é um componente do relógio circadiano de mamíferos, atuando com um ativador do gene *Bmal1* (SATO, Trey K. et al.,2004).

MARET e colaboradores (2007) realizaram análises do perfil circadiano do transcriptoma no cérebro e fígado de camundongos submetidos a um protocolo de “privação de sono” (grupo experimental) e sem privação de sono (grupo controle). A privação de sono foi alcançada por métodos de manuseios, como bater na gaiola e introduzir novos objetos na gaiola assim que um comportamento de sono era observado. Como resultados mostraram que muitos transcritos deixaram de apresentar expressão circadiana nos animais com privação de sono, do total 2.032 transcritos que apresentaram expressão circadiana no grupo controle apenas 391 permaneceram rítmicos em camundongos “privados de sono” (MARET,2007).

HUGHES e colaboradores (2009) realizaram uma comparação do perfil harmônico circadiano de transcriptoma do fígado de camundongos, e de duas linhagens celulares (NIH3T3 e U2OS), e demonstraram através de dois métodos estatísticos (*Fisher's G-test* e *COSOPT*), considerando o FDR (*false discovery rate*) <0,05, que 3.667 transcritos no fígado possuem ritmo de expressão em torno de 24 horas, menos de 12 transcritos nas linhagens celulares, possuem ritmo de expressão em torno de 24 horas. Além disso, 260 transcritos apresentaram ritmos ultradianos em torno de 12 horas e 63 em torno de 8 horas, harmônicos dos transcritos que apresentaram 24 horas (HUGHES,2009).

Em níveis proteicos, estudos com análise de proteoma circadiano demonstraram que em fígado de camundongo 20% das proteínas apresentaram ritmicidade circadiana (REDDY, A. B. et al., 2006). Em outro estudo, 6 % de 3.000 proteínas avaliadas, apresentaram ritmicidade circadiana em fígado de camundongos (ROBLES, Maria S.; COX, Jürgen; MANN, Matthias.,2014). Ainda se tratando do perfil proteômico circadiano em fígados de camundongos, 5.000 proteínas foram analisadas, das quais 195 (~5%) apresentaram variação circadiana (MAUVOISIN et al., 2014). E por fim, uma análise com 2112 proteínas em NSQ de camundongos demonstrou que 20% apresentaram ritmicidade circadiana (CHIANG et al., 2014).

Estratégias ainda mais recentes aplicadas a dados em larga escala já publicados como: mineração de dados, análises de co-expressão e expressão diferencial, são formas de estratégias ricas e úteis para gerar novos conhecimentos (HAND, David J.; MANNILA, Heikki; SMYTH, Padhraic., 2001), utilizadas também em estudos cronobiológicos para descobrir novas moléculas funcionais rítmicas a partir de dados de expressão de genes em humanos, roedores e plantas (SUKUMARAN, Siddharth et al.2010; FILICHKIN, Sergei A. et al.2011; ALMON, Richard R. et al.2008; LOPES, Robson da Silva et al.2013).

O gene *Chrono*, por exemplo, foi identificado como um importante componente dos ritmos circadiano em mamíferos, através de uma abordagem computacional probabilística. Essa abordagem consistiu em integrar informações de bancos de dados heterogêneos com informações de larga escala de transcriptoma circadiano, expressão gênica em diferentes tecidos, filogenia de genes, vias de interações de proteínas e *RNAi*, para identificar genes circadianos candidatos que apresentaram evidências de envolvimento com os ritmos circadianos. Com base em um escore foram selecionados aproximadamente 1000 genes, nos quais os 25 primeiros genes mais ranqueados foram selecionados para validação *in vitro* e candidatos potenciais a fazer parte do sistema de temporização circadiana de mamíferos. Através de ensaios de *ChiP-seq*, dentre esses 25 genes, *Chrono* interagiu com as proteínas BMAL1, interrompendo sua atividade transcricional. Além disso, camundongos *Knockout* para o gene *Chrono* apresentaram ritmos prolongados de atividade locomotora, comprovando seu envolvimento com os ritmos circadianos (ANAFI,2014).

BHARGAVA e colaboradores (2015), selecionaram os 1.000 genes candidatos a reguladores dos ritmos circadianos, obtidos do estudo ANAFI e colaboradores (2014) e realizaram um estudo de mineração de dados com outros estudos circadianos de proteoma,

ChiP-seq e interação proteína-proteína, apontando onze genes candidatos que podem fazer parte do sistema molecular de temporização circadiana de mamíferos, e propondo que seis destes genes estão envolvidos também com vias metabólicas do câncer, mas que é necessário realizar investigações experimentais para confirmar essas associações (BHARGAVA,2015).

Todavia, as descobertas dos mecanismos moleculares dos ritmos circadianos começaram primeiro com observações em plantas, analisando o movimento de abrir e fechar das folhas de acordo com o ciclo ambiental de claro e escuro, datada no início do século 18 e demorou 200 anos para perceberem que esse movimento da folha é controlado por um sistema de temporização circadiano endógeno (HUANG, Rong-Chi.,2018).

Em 1971, Ronald Konopka e Seymour Benzer a partir de experimentos de mutagênese em que usaram agentes químicos para introduzir numerosas mutações aleatórias no DNA da mosca da fruta, *Drosophila melanogaster* e rastrear anomalias de ritmo, revelaram três mutantes circadianos: um com ritmo rápido, um com ritmo lento e outro arritmico (KONOPKA, Ronald J.; BENZER, Seymour BUHR,1971). Essas três mutações mapeadas para a mesma região cromossômica receberam o nome de *per* (abreviação de "período") devido ao alongamento ou encurtamento dos períodos dos ritmos comportamentais das moscas. Desta forma, esses resultados foram uma mudança de paradigma na medida em que mostraram que uma única mutação genética poderia modificar o comportamento ritmo circadiano de um animal e, além disso, isso pode ser herdado de forma hereditária para o comportamento da prole (Ethan D,2021).

Anos depois, em 1984, Jeffery C. Hall e Michael Rosbash da Universidade de Brandeis e Michael Young da Universidade de Rockefeller clonaram independentemente o gene *Per* (BARGIELLO, Thaddeus A.; JACKSON, F. Rob; YOUNG, Michael W.,1984). A clonagem desse gene introduziu pesquisas que ajudou no desvendamento dos mecanismos moleculares que controlam o ritmo circadiano nas décadas seguinte, além disso, concedendo a esses três pesquisadores o Prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina de 2017, demonstrando e evidenciando a importância desses estudos para a ciência atual e futura, e hoje sabemos que homólogos do gene *Per* são encontrados em diferentes espécies e seus alelos variantes estão associados a distúrbios do sono em humanos (Ethan D.,2021).

2.5 Estudos de Expressão Circadiana em Tecidos Específicas do Cérebro de Mamíferos

A quantidade de estudos com análises do transcriptoma circadiano, realizados por meio de técnicas como *ChiP-seq*, *RNA-seq*, *Microarray* e outras, aumentou de forma constante nos últimos 20 anos (HUGHES, Michael E. et al.,2017). Muitos desses estudos apontam que o número de CCGs é muito diferente entre os tecidos de camundongos, em alguns tecidos, mais de 10% de todo o transcriptoma é rítmico, enquanto apenas alguns por cento são rítmicos em outros, podendo chegar até 50% se for considerarmos a soma de todos os tecidos (LITTLETON, Evan S. et al.,2020). No entanto, quando se trata de tecidos cerebrais, poucos são os estudos que realizem análises do transcriptoma circadiano, tanto no cérebro de camundongos quanto em humanos (WU, Gang et al.,2020). Além disso, ainda não está claro como o sistema de temporização circadiano central produz mais genes com expressão circadiana em alguns tecidos do que em outros, tendo em vista que os mecanismos e relações dos genes circadianos são quase idênticos em cada tecido (LITTLETON, Evan S. et al.,2020).

John B. Hogenesch e seu grupo, em 2014, realizou uma análise do transcriptoma circadiano em doze diferentes tecidos de camundongos: pulmão, fígado, rim, coração, glândula adrenal, aorta, tecido adiposo branco e marrom, musculo esquelético e apenas três regiões do cérebro: cerebelo, tronco encefálico e hipotálamo, e utilizaram o algoritmo *JTK_CYCLE* para detectar oscilação circadiana. Seus resultados demonstraram que mais de 3000 genes têm expressão circadiana no fígado, correspondendo à 16% do seu transcriptoma e a região com o maior percentual de transcritos que oscilam, nas estruturas dos cérebros encontram que 4% do transcriptoma do tronco encefálico e cerebelo tem expressão circadiana e 3% no hipotálamo (ZHANG, et al.,2014). Esses dados também estão disponíveis em um banco de dados *on line* e totalmente gratuito, o CircaDB (<http://circadb.hogeneschlab.org/>).

Em 2018 o mesmo grupo do John B. Hogenesch criou a segunda parte do CircaDB com dados de ritmicidade em 13 tecidos específicos de humanos: fígado, pulmão, fibrilação atrial do coração, nervo tibial, aorta, tireoide, esôfago, artéria coronária e tibial, cólon, gordura visceral e subcutânea e glândula pituitária, porém, nenhum deles do cérebro. Aplicaram o algoritmo de ordenação cíclica por estrutura periódica (*CYCLOPS*), para reconstruir a ordem temporal das amostras na ausência de informações do horário do dia e detectar oscilação circadiana, nos dados de expressão gênica desses 13 tecidos de 632 doadores humanos disponibilizados no portal *on line Genotype-Tissue Expression (GTEx)*. Como resultados encontraram que 3747 tem expressão rítmica em pelo menos um dos 13 tecidos e que 54 genes, conhecidos como ubíquos, são rítmicos em 8 tecidos ou mais. Além disso, 1000 desses genes

codificam proteínas que transportam ou metabolizam drogas ou eles próprios são alvos de drogas com potenciais aplicações na medicina circadiana (RUBEN, Marc D. et al.,2018).

Outro estudo publicado em 2013, com humanos saudáveis, realizou uma análise do transcriptoma circadiano em seis estruturas cerebrais pós-morte: hipocampo, cerebelo, núcleo accumbens, amígdala, córtex pré-frontal dorsolateral e córtex cingulado anterior e para detectar oscilação consideraram a hora do óbito ajustando os valores de expressão dos genes a uma função senoidal com período de 24 horas. Os resultados revelaram que mais de 100 transcritos comuns entre as seis estruturas cerebrais avaliadas apresentaram expressão circadiana. No total, 3573 genes apresentaram expressão circadiana considerando a soma de todas as regiões, 922 no córtex pré-frontal dorsolateral, 659 no hipocampo, 566 no córtex cingulado anterior, 565 no núcleo accumbens, 444 no cerebelo e 417 na amígdala (LI, J. Z. et al.,2013).

Mure e colaboradores publicaram um atlas do transcriptoma circadiano de 64 diferentes tecidos, incluindo 22 regiões cerebrais, de jovens primatas babuínos, um parente próximo dos humanos. Os tecidos foram coletados a cada 2 horas durante um período de 24 horas, totalizando 12 pontos e os dados de expressão gênica obtidos dos pontos foram analisados pelo *MetaCycle*, um pacote do R que integra vários algoritmos para determinar a periodicidade e ritmicidade. Todos os 64 tecidos examinados mostraram genes rítmicos, mas houve uma diferença clara entre o quantitativo de genes rítmicos entre os tecidos devido a especificidade e heterogeneidade de cada um. 16.442 genes (65,5% de todos os genes expressos) eram rítmicos, com um período de ~24 horas em pelo menos um tecido e cerca de 4000 genes apresentaram expressão circadiana na maioria dos tecidos. No entanto, mesmo entre os tecidos com ~1000 genes rítmicos, menos de 1% dos genes rítmicos foram compartilhados (MURE, Ludovic S. et al.,2018).

Mesmo em insetos o conjunto de genes que apresentam expressão circadiana é específico para cada tecido, um estudo bem recente de 2021 mostra isso. Litovchenko e colaboradores investigaram o transcriptoma circadiano em amostras do cérebro, intestino, túbulos de Malpighi e tecido adiposo de moscas *D. melanogaster* coletadas a cada 2 horas, durante um período de 48 horas. Usaram o algoritmo *JTK CYCLE* para determinar a periodicidade e ritmicidade da expressão gênica e detectou 1757 genes ritmos nos quatro tecidos avaliados, com a maioria desses rítmicos de uma maneira específica do tecido. No total, considerando todos os tecidos, mais de 30% do transcriptoma de moscas *D. melanogaster* tem

expressão gênica circadiana, além disso, os resultados desse estudo revelam uma extensa dissincronia circadiana molecular entre tecidos (LITOVCHENKO, Maria et al.,2021).

Assim, como visto em camundongos, humanos, babuínos e até mesmo em moscas a transcrição rítmica dos genes é específica do tecido. É importante ainda ressaltar que mais de um terço do transcriptoma dessas espécies, a depender do tecido analisado, mostraram ritmos com ~24 horas na expressão. Isso implica dizer que a maioria dos CCGs é ritmicamente expressos em alguns tecidos, mas pode não ser em outros, sugerindo a esses genes uma provável especificidade em seus mecanismos de regulação transcricionais (MURE, Ludovic S. et al.,2018). No entanto, os genes circadianos são considerados ubiquamente expressos em vários tecidos (ZHANG, et al.,2014, RUBEN, Marc D. et al.,2018).

2.6 Análises de Ritmicidade em Estudos de Transcriptoma

Os avanços recentes em tecnologias ômicas, incluindo as técnicas de *microarrays* e sequenciamento de próxima geração oferecem dados para identificar novas moléculas funcionais envolvidas nos ritmos circadianos mamíferos em escala genômica, sejam genes circadianos ou CCGs, e estas tecnologias, levaram à proposta de metodologias diversificadas de análises desses dados adotadas em vários campos, incluindo a matemática, estatística, astrofísica etc. (MEI, Wenwen et al.,2020). O mais antigo dos métodos é o periodograma de *Lomb-Scargle*, paramétrico, eficaz no tratamento de dados perdidos e pode ser aplicado a conjuntos de dados com réplicas, amostras desiguais e dados ausentes (GLYNN, Earl F.; CHEN, Jie; MUSHEGIAN, Arcady R.,2006).

ARSER é um método paramétrico que emprega estimativa espectral autorregressiva para prever a periodicidade e aplica um modelo de regressão harmônica para ajustar a série temporal dos dados e com alta reprodutibilidade (YANG, Rendong; SU, Zhen.,2010). *JTK_CYCLE* é um método não paramétrico com alta precisão na detecção de oscilações periódicas e robustez para outliers (HUGHES, Michael E.; HOGENESCH, John B.; KORNACKER, Karl.,2010). *RAIN* é um método não paramétrico eficaz na detecção de formas de onda assimétricas, possui alta reprodutibilidade e, também, pode ser aplicado a conjuntos de dados com réplicas, amostras desiguais e dados ausentes (THABEN, Paul F.; WESTERMARK, Pål O.,2014). *eJTK_CYCLE* melhora *JTK_CYCLE* sendo mais eficaz na detecção de formas de onda assimétricas, é também um método não paramétrico (HUTCHISON, Alan L. et al.,2015).

Com base nos sucessos dos métodos acima mencionados, o *MetaCycle* é outro método paramétrico usado principalmente para detectar sinais rítmicos de dados de série temporal em grande escala. Dependendo dos recursos de cada dado de série temporal, o *MetaCycle* incorpora *ARSER*, *JTK_CYCLE* e *Lomb-Scargle* adequadamente para detecção de sinais periódicos e pode gerar resultados de análise integrados, se necessário (WU, Gang et al.,2016). O método mais recente, *BIO_CYCLE*, é uma rede neural profunda treinada em dados de séries temporais circadianas e não circadianas para detecção ou não de ritmicidade (AGOSTINELLI, Forest et al.,2016).

Cada vez mais dados ômicos circadianos estão sendo disponibilizado por meio de estudos e bancos de dados existentes para diferentes tipos de espécies e órgãos, tecidos e células específicas, de humanos (RUBEN, Marc D. et al.,2018), babuínos (MURE, Ludovic S. et al.,2018), camundongos (ZHANG, Ray et al.,2014), ratos (MAVROUDIS, Panteleimon D. et al.,2018) e moscas (LITOVCHENKO, Maria et al.,2021). Vários estudos já avaliaram o desempenho de diferentes métodos na detecção de ritmo, mostrando discrepâncias entre eles, e que seus desempenhos dependem de vários fatores, como: variabilidade técnica, biológica e heterogeneidade do tecido, o que pode distorcer os resultados se não forem devidamente analisados (MEI, Wenwen et al.,2020). Por exemplo, a variabilidade entre sujeitos em perfis rítmicos, especialmente para sujeitos humanos, é uma fonte não desprezível de variação genética que precisa ser ajustada (WU, Gang et al.,2016).

A melhor detecção de ritmicidade depende do algoritmo escolhido, dos desenhos experimentais e características dos dados, além disso, a normalização dos dados e a correção do efeito do lote são cruciais para remover vieses e artefatos técnicos para gerar melhores resultados (JIANG, Yuchao et al.,2018.). Os resultados de estudos com transcriptoma circadiano muitas vezes são inconsistentes, pois, em muitos estudos, não é claro quais genes tem papéis importantes para os ritmos, mesmo no caso de estudos que utilizam a mesma abordagem metodológica e avaliação no mesmo tecido, apresentam incompatibilidade entre os resultados e essas inconsistências também abrangem outros estudos com análises em larga escala como *RNA-seq*, proteoma, *Microarray* e *Nascent-seq* (KOJIMA, Shihoko; GREEN, Carla B,2014).

Porém, como citado acima, podem ser derivadas do tipo de algoritmo e parâmetros estatísticos utilizados para detectar ritmicidade, visto que há diversos com essa função, como *JTK_CYCLE*, *ARSER*, *Metacycle*, *Lomb-Scargle*, *FDR* (*false discovery rate*), *p-value*, *q-value*

etc., e pela normalização de tecido, que pode interferir, por exemplo, na detecção rítmica de genes que apresentam baixas amplitudes de expressão.

A densidade da amostragem é uma decisão chave em qualquer experimento de série temporal (HUGHES, Michael E. et al.,2017; WU, Gang et al.,2020). A densidade é determinada pela resolução da amostragem (por exemplo, a cada 2 h) e janela (por exemplo, 2 dias), ambas impactam marcadamente a capacidade de detectar características rítmicas dos dados (WU, Gang et al.,2020). Por exemplo, um estudo analisando o transcriptoma circadiano em fígado de camundongo a cada 1 h por 2 dias (48 amostras), detectaram ritmos em mais de 5.000 genes e $FDR < 0,05$ (Hughes et al.,2009; WU, Gang et al.,2020). No entanto, se subdividirmos esse mesmo conjunto de dados a cada 4 h por 2 dias (12 amostras), o número de genes rítmicos cai para apenas 17, por isso, uma resolução de amostragem mais alta, pode reduzir drasticamente as taxas de falsos negativos (e positivos), além disso, a resolução da amostragem também afeta a capacidade de estimar com precisão parâmetros rítmicos como fase, pico e amplitude (WU, Gang et al.,2020).

Um algoritmo recente chamado de CYCLOPS (ordenação cíclica por estrutura periódica), baseada em padrões de correlação de marcadores circadianos, tem sido usada para capturar CCGs em grandes conjuntos de dados sem informação temporal. O CYCLOPS usa descritores globais de expressão gênica, conservação evolutiva e aprendizado de máquina para ordenar dados não classificados dentro de um ciclo periódico (ANAFI, Ron C. et al., 2017). No entanto, o CYCLOPS requer dados de todo o ciclo periódico para formar uma elipse e o algoritmos de aprendizagem de máquina supervisionado como Zeitziger requer uma biblioteca de treinamento de amostras com tempo circadiano conhecido (HUGHEY, Jacob J.; HASTIE, Trevor; BUTTE, Atul J.,2016).

Desta forma, um(a) pesquisador(a) cronobiologista enfrenta muitas barreiras de análises de dados em qualquer estudo do transcriptoma circadiano, que incluem estratégia de amostragem, parâmetros estatísticos adotados, custos e objetivo da pesquisa, sequenciamento de nova geração e interpretação dos dados, algoritmo de detecção rítmica, anotação funcional e validação dos dados ((MEI, Wenwen et al.,2020).

2.7 Redes de Co-expressão Gênica

O uso das novas tecnologias moleculares de análises em larga escala como: *microarray*, *Chip-Seq* e *RNA-seq*, resultou em um rápido crescimento de dados biológicos relacionados à

expressão gênica, aumentando assim a demanda por métodos estatísticos, computacionais e ferramentas que possibilitem uma melhor análise desses dados de transcriptoma (KAKATI, Tulika et al. 2019). Entre esses métodos computacionais, as redes de co-expressão de genes é amplamente usada, às quais permitem a integração, identificação, agrupamento em módulos e a exploração simultânea de milhares de dados de expressão gênica funcionalmente correlacionados entre si e também a um grupo de amostras ou fenótipos biológicos de interesse nas diversas condições experimentais, tipos de tecidos e células, além de inferir funções gênicas e associações gene-doença (SERIN, Elise AR et al, 2016, VAN DAM, Sipko et al.2018).

As redes de co-expressão são baseadas em coeficientes de correlação (*Pearson*, *Spearman*) as medidas de correlação têm valores entre -1 (correlação negativa perfeita) e 1 (correlação positiva perfeita), podendo ser não assinadas (*unsigned*, termo inglês), quando o sinal da correlação é absoluto, desconsiderando se ele é positivo ou negativo, isso significa que dois genes correlacionados negativamente serão considerados como co-expressos, isso faz com que genes correlacionados negativamente se agrupem. Como é provável que esses genes também sejam co-expressos positivamente com um conjunto de genes completamente diferente, esses genes também se agrupam no mesmo módulo e interrompem a estrutura da rede misturando as duas direções, e também, genes negativamente correlacionados geralmente pertencem a categorias biológicas diferentes, por isso, as redes de co-expressão construídas considerando o sinal de correlação positivo e negativo, às chamadas redes assinadas (*signed*, termo inglês), são mais utilizadas e recomendadas (VAN DAM, Sipko et al.2018).

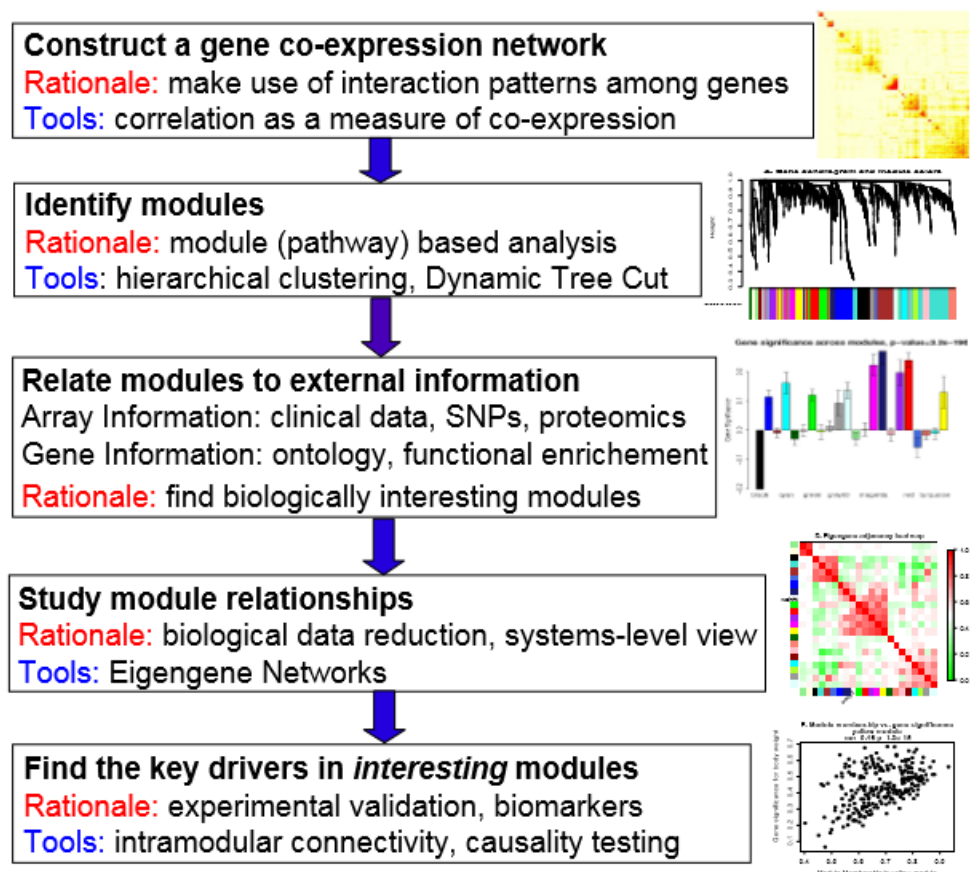
Além disso, as redes de co-expressão podem ser ponderadas e não ponderadas. Em uma rede ponderada (*weighted*, termo inglês), todos os genes estão conectados entre si, e essas conexões têm valores de peso contínuos entre 0 e 1 que indicam a força da correlação entre os genes, produzindo resultados mais robustos do que as redes não ponderadas, além de serem as mais utilizadas nas análises de co-expressão. Em uma rede não ponderada (*un-weighted*, termo inglês), a interação entre pares de genes é binária, ou seja, 0 ou 1, e os genes estão conectados ou não (VAN DAM, Sipko et al.2018).

Vários métodos de análises de rede de co-expressão foram desenvolvidos para agrupar grupos de genes em módulos (*clusters*) altamente correlacionados, dentre esses métodos, temos o *THD-Module Extractor* (KAKATI, Tulika; KASHYAP, Hirak; BHATTACHARYYA, Dhruva K.,2016), *DiffCoEx* (TESSON, Bruno M.; BREITLING, Rainer; JANSEN, Ritsert

C.,2010), *CoXpress* (WATSON, Michael.,2006), *MODA* (LI, Dong et al.,2016) e *WGCNA* (LANGFELDER, Peter; HORVATH, Steve.,2008).

O método amplamente usado para essas análises é o *Weighted Gene Correlation Network Analysis (WGCNA)*, um pacote do *software R*, que inclui funções para construção de redes ponderadas; detecção de módulo, cada módulo recebe uma cor única e o número de genes atribuídos a um módulo varia; relação dos módulos com fenótipos biológicos; seleção de gene; cálculos de propriedades topológicas; análises de expressão diferencial; simulação de dados; visualização e interface com softwares externos, **(Figura 6)** (LANGFELDER, Peter; HORVATH, Steve.,2008).

Figura 6. Visão geral das principais etapas do *WGCNA*. Primeiro é construída a rede de Co- expressão, em seguida: identificação dos módulos, relação dos módulos com fenótipos biológicos, seleção de módulos biologicamente significativo e seleção de genes candidatos para validação.



Fonte: LANGFELDER, Peter; HORVATH, Steve.,2008.

Cada rede de co-expressão possui várias propriedades que podem ser analisadas, incluindo a conectividade intramolecular, conectividade total, *module membership (MM)*, que identifica a importância do gene dentro do módulo, ou seja, a correlação que um gene estabelece

com os outros, e *gene significance (GS)* que avalia a força da correlação entre os genes em cada módulo e os traços biológicos associados, e a identificação de genes com um alto grau de conectividade dentro de um módulo, os chamados *hub genes* (FARHADIAN, Mohammad et al., 2021). Escolher parâmetros adequados para construir as redes de co-expressão de genes melhora o desempenho das análises e extração de módulos biologicamente significativos (ABBASSI-DALOI, Tooba et al, 2020)

Um estudo utilizando análises de redes de co-expressão gênica ponderada e o método WGCNA identificou regiões cerebrais e genes potencialmente envolvidos com as vias moleculares da fisiopatologia da enxaqueca, um distúrbio neurovascular cerebral incapacitante comum. Este estudo integrou dados de expressão gênica de diferentes tecidos e células de cérebros humanos normais adultos associados à enxaqueca, disponíveis no portal *Allen Human Brain Atlas* e no *GWAS*, com análises de enriquecimento funcional através do DAVID (Banco de Dados para Anotação funcional, Visualização e Descoberta Integrada de genes (DENNIS et al. 2003). Os resultados das redes demonstraram 05 módulos biologicamente significativos e 2116 candidatos ao envolvimento na fisiopatologia da enxaqueca, com vias enriquecidas na neurotransmissão, catabolismo de proteínas e mitocôndrias no córtex; regulação da transcrição no córtex e cerebelo; e oligodendrócitos e mitocôndrias, que desempenham um papel causal nesse distúrbio e merecem ser investigados com mais detalhes por estudos (funcionais) em pacientes e experimentais em modelos animais e 06 áreas cerebrais: córtex cerebral e cerebelar, cerebelo, hipocampo, regiões subcorticais e hipotálamo, também envolvidas com esse distúrbio neurovascular (EISING, E. et al. 2016).

Em 2017, foi publicada na revista *Nature* uma pesquisa que realizou o estudo do perfil global de expressão de genes em regiões específicas dos cérebros de humanos saudáveis e o seu envolvimento com distúrbios neurológicos, através de análises redes de co-expressão gênica ponderada utilizando o método WGCNA e aprendizagem de máquina. Para a construção da rede ponderada de co-expressão gênica foram utilizados dados de expressão de um conjunto de 6.984 genes de 190 estruturas cerebrais e para se certificarem de que os genes co-expressos presentes em cada módulo transmitem informações biologicamente relevantes, realizaram análises de enriquecimento funcional através do *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)*, um banco de dados de conhecimento para a análises sistemáticas de funções gênicas, ligando informações genômicas com informações funcionais (KANEHISA et al. 2000). A análise resultou em 19 módulos de genes altamente co-expressos e centenas de genes com funções

associadas a vias de sinalização do receptor de dopamina, morte celular, regulação de apoptose, vias de sinalização de quimiocinas e de neurotrofinas, desenvolvimento e morfogênese neuronal, regulação da neurogênese, resposta imune e micróglia, em diversas regiões do cérebro, com o estriado, hipocampo, amígdala, hipotálamo, cerebelo, dentre outras. As análises de redes de co-expressão, juntamente com as análises de aprendizagem de máquina, tornaram esse estudo o primeiro a utilizar de perfis de expressão gênica globais em tecido cerebral humano saudável para prever genes implicados em doenças e vários distúrbios neurológicos (NEGI e GUDA, 2017).

Desta forma, as redes de Co-expressão Gênica investigam as relações gene a gene de uma forma não supervisionada e agrupando-os de forma coordenada em módulos, fornecendo uma estratégia de análise que ajuda a entender melhor os padrões de expressão gênica em diversas estruturas, inclusive em regiões do cérebro, que podem ser impulsionados por processos biológicos, celulares e moleculares semelhantes e distintos (NEGI e GUDA, 2017).

Além disso, é um método de triagem de genes aplicado com sucesso em vários contextos biológicos, em estudos genéticos com plantas, fungos e bactérias em humanos, com câncer, diabetes, doenças cardiovasculares, alzheimer, esquizofrenia, etc, facilitando a identificação de biomarcadores candidatos e alvos terapêuticos, e fornecendo uma visão abrangente da regulação de processos biológicos importantes de um genoma, transcriptoma ou proteoma (LANGFELDER, Peter; HORVATH, Steve.,2008; RIQUELME MEDINA, Ignacio; LUBOVAC-PILAV, Zelmina.,2016; FELTRIN, Arthur Sant'Anna et al.2019; NIU, Xiaowei et al.,2019; XU, Hao-jie et al.,2021).

3 Hipótese

As Redes de co-expressão Gênica investigam as relações gene a gene de uma forma não supervisionada e agrupando-os de forma coordenada em módulos, fornecendo uma estratégia de análise que ajuda a entender melhor os padrões de expressão gênica em diversas estruturas, inclusive em regiões do cérebro, que podem ser impulsionados por processos biológicos, celulares e moleculares semelhantes e distintos (NEGI e GUDA, 2017). Desta forma, análises de redes de co-expressão pode capturar correlações com biomarcadores circadianos independente de séries temporais, apontando para genes candidatos com funções oscilatórias desconhecidas.

4 Justificativa

A identificação de novos genes envolvidos com os ritmos circadianos e alvos cronofarmacológicos ainda é uma necessidade de pesquisa, tendo em vista a alta complexidade e os diferentes níveis de regulação do sistema molecular em mamíferos e a importância de se estudar o tempo biológico e seu papel na determinação da resposta aos medicamentos. O número de estudos de transcriptoma circadiano aumentou de forma constante nos últimos 20 anos, no entanto, mas estudos com o transcriptoma circadiano no cérebro são poucos (WU, Gang et al., 2020). Além disso, em 2017 o Prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina foi dado aos pesquisadores norte-americanos *Jeffrey C. Hall, Michael Rosbash e Michael W. Young* devido às suas descobertas sobre os mecanismos moleculares que controlam os ritmos circadianos, demonstrando e evidenciando a importância de estudos com os ritmos para a ciência atual e futura.

5 Objetivos

5.1 Objetivo Geral

Identificar genes correlacionados com ritmo circadiano no Sistema Nervoso Central de mamíferos.

5.2 Objetivos Específicos

- Construir redes de co-expressão a partir de dados de expressão gênica de 12 tecidos do SNC de camundongos;
- Identificar *CCorGs* em 12 tecidos do SNC de camundongos;
- Determinar as vias enriquecidas dos genes correlacionados e suas funções associadas a processos biológicos, funções moleculares e componentes celulares;
- Identificar distúrbios neurodegenerativos e comportamentais associados aos *CCorGs*;
- Identificar *CCorGs* que são alvos de drogas farmacológicas com ação no SNC;
- Avaliar *in Silico* o enriquecimento de *CCorGs* para propriedades circadianas;
- Criar um Banco de Dados de acesso livre na internet.

6 Artigo:

CCorGsDB: A database for clock correlated genes in the mouse central nervous system

Abstract

Circadian rhythms are controlled by a set of core genes, called clock genes, which are ubiquitously expressed. Each tissue, however, has a high specificity in the set of clock-controlled genes (CCGs) that participate in related circadian outputs. Normally, the identification of CCGs is based on time series datasets, which are costly, laborious and in some instances impossible to perform. A recent approach based on correlation patterns of circadian markers has been used to capture CCGs in datasets without temporal information. However, this machine learning method still demands that the samples are collected throughout the circadian cycle. Moreover, not every gene with circadian function has an oscillatory pattern at transcript level. Thus, other strategies for identifying CCGs with spatial resolution could be advantageous. In this study, we identified potential CCGs in the mouse Central Nervous System, including 12 specific regions, using Weighted Gene Co-expression Network Analysis (WGCNA) of in situ hybridization expression data available at the Allen Mouse Brain Atlas. Significant modules were filtered based on their correlations with circadian markers. Clock Correlated Genes (CCorGs) datasets, evaluated in those regions with previous time course experiments, are enriched for genes with higher rAMP. Several CCorGs are targets of drugs with short time action on the CNS and may be candidates for chronopharmacological studies. To our knowledge, this is the first study of co-expression analysis to search for CCGs in the CNS. The strategy used has the potential to identify important genes for circadian rhythms in specific tissues, overcoming methodological limitations considered in other studies.

Keywords: Circadian Rhythms. Clock Controlled Genes. Co-expression Networks. Brain Tissues. Circadian Database. Bioinformatics.

7 Introduction

Circadian (around 24h) rhythms are endogenous universal phenomena expressed in a variety of biological processes and behaviors, such as replication, transcription, cell division, hormone secretion, inflammation, neuroplasticity, sleep, cognition and mood [1]. In mammals, the molecular basis for these rhythms consists of transcriptional and translational feedback loops, maintained by *clock genes* and *CCGs* (*Clock Controlled Genes*) that mediate the effects of molecular clocks on downstream rhythms in physiology and behavior [2]. A conservative estimate indicates that up to 50% of the transcriptome is rhythmically expressed, considering multiple tissues [3]. Many of the CCGs are drug targets and therefore may have therapeutic implications considering time effect [4].

Circadian rhythms are systemically orchestrated by the suprachiasmatic nucleus (SCN) located in the anteroventral hypothalamus of the brain, which is entrained mainly by photic inputs from the environment [5]. However, many brain regions have been shown to express circadian rhythms independently of the SCN, including, cerebellum, thalamus, amygdala, adrenal gland, hippocampus, striatum and olfactory bulbs [6]. Moreover, several neuropsychiatric disorders have circadian disruptions as potential physiopathological mechanisms [7]. Therefore, identifying clock genes and CCGs in different brain regions is important for understanding how circadian clock governs brain function and impacts neuropsychiatric disorders [8].

Most of the known clock genes are ubiquitously expressed in a way that virtually every cell has a circadian clock [9]. However, the set of CCGs may vary significantly between tissues [10]. This tissue specificity imposes a challenge in the search for new CCGs in multicellular organisms because the standard approach requires multiple samplings in a time course experiment, which is expensive and laborious [11]. Despite the existing transcriptome studies and databases for genes with circadian expression, just a few regions from the central nervous system (CNS) have been studied [12]. In rodent models, there is available circadian transcriptome data for SCN [13], brainstem, cerebellum, hypothalamus [3], hippocampus [14], pituitary gland [15], dorsal vagal complex and the central nucleus of the amygdala [16], with different sampling time resolutions.

In humans, circadian transcriptome analysis based on time-of-death were performed in hippocampus, cerebellum, nucleus accumbens, amygdala, dorsolateral prefrontal cortex, anterior cingulate cortex [17] and prefrontal cortex [18]. Twenty-two brain regions from baboon were also analyzed in a time course experiment [19].

These datasets allowed the identification of several cycling genes in those regions. However, not every gene with circadian function has an oscillatory pattern at transcript level. Clock mRNA and protein, for example, is constitutively expressed in the mouse SCN [20] but is a core component of the circadian clock [21]. Moreover, other levels of regulation are important for the proper functioning of the circadian clock, including post-transcriptional and post-translational mechanisms [22]. It is estimated that up to 20% of proteins in the mouse liver are cycling, although nearly half of these do not exhibit circadian mRNA expression [23].

A recent approach called CYCLOPS (cyclic ordering by periodic structure), based on correlation patterns of circadian markers has been used to capture CCGs in datasets without temporal information [24]. CYCLOPS uses global descriptors of gene expression, evolutionary conservation and machine learning to order unsorted data within a periodic cycle. However, CYCLOPS requires data from the entire periodic cycle to form an ellipse and supervised learning such as Zeitzeiger [25] requires a training library of samples with known circadian time.

One approach for inferring gene function and gene-disease associations is co-expression network analysis [26]. Poorly characterized genes that are co-expressed with well-described genes can have their function inferred by the similarity in their expression pattern [27]. Correspondingly, genes whose expression are highly correlated with clock genes may have an oscillatory pattern or integrate a network of clock regulation and activity. Therefore, co-expression network analysis may capture correlations with the circadian clock independent of cycling patterns.

In this work we built a database of *Clock Correlated Genes (CCorGs)* in specific regions of the mouse central nervous system (CNS) using weighted gene co-expression network analysis (WGCNA) filtered by circadian biomarkers. We validated the database for three brain regions using available datasets with high temporal resolutions. We also performed functional enrichment analysis and identified associated neuropsychiatric diseases and drugs with potential chronopharmacological applications in the CNS. In the absence of time course datasets in a particular region of the CNS, the database is an alternative to find candidates for time-biased studies in pre-clinical models. Moreover, the correlation network approach has the potential to identify important genes for the circadian clock that do not present an oscillatory pattern at transcript level.

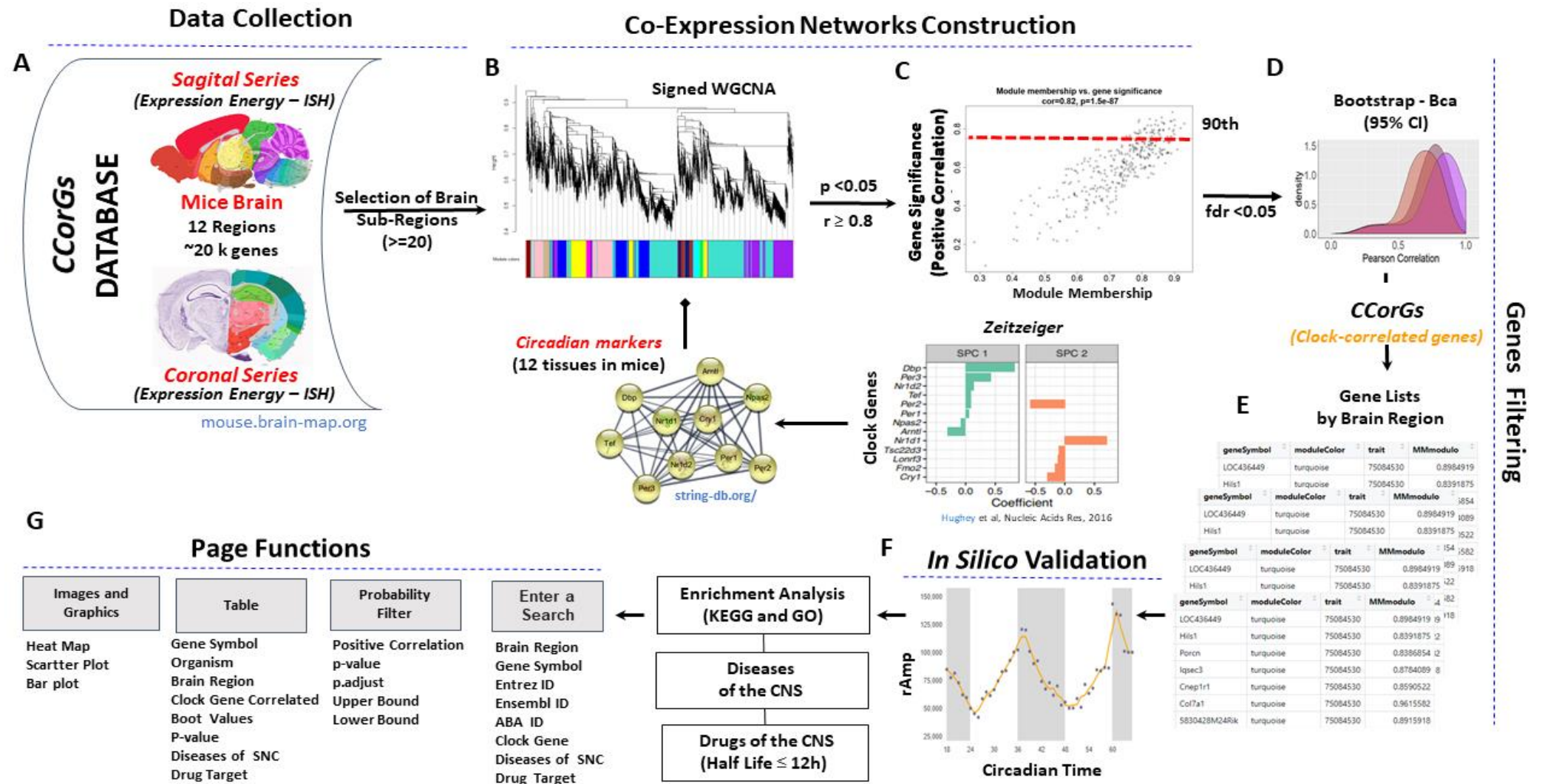
8 Materials and Methods

8.1 Data Information

All data were obtained from the Allen Mouse Brain Atlas database (<http://mouse.brain-map.org/>) [28], downloaded between 2017 to 2021. We collected the in-situ hybridization expression data (expression energy) of 19,933 genes (15,804 protein coding) in thirteen mouse CNS tissues: brain stem, cerebellum, cortical subplate, hippocampus, hypothalamus, isocortex, medulla, midbrain, olfactory areas, pallidum, pons, striatum and thalamus, in both sagittal and coronal anatomical series, using the ABADData R package [29]. For each gene, in each tissue, expression data were collected from at least 20 common subregions among the total set of genes. Within this set, each gene can have more than one expression data per sub-region, as they correspond to one or more experimental replicas according to the anatomical plan and different gene sequences. The cortical subplate were excluded from the analysis, as their set of genes had expression data in only twelve subregions, not meeting the minimum criteria established in this study.

The overall pipeline is described in **(Figure 1)**.

Figure 1. Pipeline with the main stages of the research and construction of the database. **A.** Expression data were obtained from ABA for 12 CNS tissues containing at least 20 subregions; **B.** Co-expression networks constructed by WGCNA and significant modules were selected based on high correlations ($r > 0.8$) with circadian clock markers; **C.** Genes within the 90th percentile of significant modules and with a $\text{fdr} < 0.05$ were selected as *CCorGs*; **D.** Pearson correlations were bootstrapped for inferring Confidence Interval; **E.** *CCorGs* gene lists by brain region; **F.** *CCorGs* gene lists were validated for circadian clock enrichment based on available high time resolution brain transcriptomes. **G.** Database design and page functions.



8.2. Weighted Gene Co-Expression Networks Construction

Co-expression networks were built using ‘WGCNA’ (*Weighted Gene Correlation Network Analysis*) package [30]. Twelve signed-type weighted gene co-expression networks were constructed, one for each tissue, and an additional network for a dataset integrating all tissues, described here as Central Nervous System (CNS) network. The hierarchical clustering by average link was implemented to detect outliers. Pearson’s correlations between each gene pair were calculated to build an adjacency matrix using the “cor” function. A soft-threshold power for each co-expression network was calculated to achieve approximate scale-free topology (**Supplementary Table S1**). Then, the topological overlap measure (TOM) and corresponding dissimilarity (1-TOM) was calculated using an adjacency matrix. 1-TOM was used as a distance for gene hierarchical clusters, and then *Dynamic Tree Cut algorithm* and *blockwiseModules* function were used to identify the modules, defined as clusters of highly interconnected genes according to their similarity of expression profiles. [31]. In all networks, the minimum number of genes per module was 30 and a limit of 0.25 delimited in the “cutheight” argument was used to determine the height at which the branches should be cut. In each module we identified the *module eigengene (ME)* by “*moduleEigengenes*” function, considered as a representative of the gene expression profile summary in a module and the first principal component of a given module [32].

8.3 Identification of significant modules

To find relevant gene modules in each co-expression network, we created module–trait relationships based on the correlation between module eigengenes and circadian clock traits. We considered traits the expression from ten genes recognized as the best biomarkers for circadian rhythms in 12 mouse tissues based on a machine learning algorithm: Arntl, Cry1, Dbp, Npas2, Nr1d1, Nr1d2, Per1, Per2, Per3 and Tef [25]. Eight of these are known to be core components of the molecular clock: Arntl (Bmal1), Cry1, Per1, Per2, Per3, Nr1d1 (Rev-erb α), Nr1d2 (Rev-erb β) and Npas2 [2]. Dbp and Tef are transcription factors mediating the circadian expression of many downstream genes [33]. Considering that each circadian gene can have one or more experimental replicas in ABA, twenty-two traits were used in total for each co-expression network construction. Correlation coefficient $r \geq 0.8$ and $p.value < 0.05$ were set as the criteria for significant correlation between MEs and the circadian clock biomarkers.

8.4 Clock Correlated Genes (CCorGs)

After determining the biologically significant modules, we calculated the *gene significance* (GS), the pearson's correlation coefficient between the gene and the circadian clock biomarkers [25]. Clock Correlated Genes (CCorGs) were filtered based on the 90th (percentile) of GS positive (FDR<0.05) correlation values in significant modules. Then, we bootstrap the correlations in 1000 simulations using the “boot” package to estimate the 95% confidence interval. Genes not correlated with the circadian clock, defined as ‘non correlated’, were filtered from non-significant modules and non-significant GS correlation ($p>0.05$) with low r values (ranging between -0.05 and +0.05), and used for statistical analysis as a reference group.

8.5 In Silico Validation

We evaluated the difference in relative amplitude (rAmp) values between CCorGs and their corresponding non correlated groups in three mouse encephalon tissues, brainstem, cerebellum and hypothalamus, with available high time resolution circadian transcriptome datasets [3], as a strategy to validate CCorGs as candidate circadian genes. The data from these tissues, collected within 2-hour interval sampling throughout 48h, were analyzed using the MetaCycle R package to obtain the rAmp of each gene and to discriminate oscillatory genes (JTK_CYCLE algorithm) [34]. We used the Mann-Whitney test to evaluate both the difference in rAMP between CCorGs and noncorrelated groups and the difference between Pearson correlation values in the 5th and 95th percentiles of the rAMP distribution in each region. Cohen's d test was used to calculate the effect size. The frequency of cycling and non-cycling genes in each group were compared using Fisher exact test. Some CCorGs (180 in brain stem, 251 in cerebellum and 78 in hypothalamus) were not present in the circadian transcriptome datasets and, therefore, the validation analysis was performed with the remaining genes.

Additionally, we used the Fisher exact test to evaluate the possible enrichment for clock genes in CCorGs based on a list of 23 genes (Arntl, Arntl2, Clock, Cry1, Cry2, Csnk1a1, Csnk1d, Csnk1e, Dbp, Fbxl3, Fbxl21, Hlf, Npas2, Nr1d1, Nr1d2, Per1, Per2, Per3, Rora, Rorb, Rorc and Tef) which are important molecular components for the circadian clock and presenting circadian expression in more than one tissue, according to CircaDB (<http://circadb.hogeneschlab.org/>) [35]. We considered a 95% Confidence Interval and an alpha of 0.05 as cutoff for statistical significance.

8.6 Functional Enrichment Analysis

The *CCorGS* were used for pathway enrichment analysis using Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) [36] and GO enrichment analysis, including biological processes (BP), cellular component (CC), and molecular function (MF) terms [37]. The analyses were carried out using the ClusterProfiler R package [38], and by the functions: “enrichGO” and “enrichKEGG”. Statically enriched pathways were chosen based on $p_{\text{adjust}} \text{ (Bonferroni)} < .05$. GO plot and ggplot2 R packages were used for data visualization.

8.7 Identification of associated neuropsychiatric disorders and potential drugs for chronopharmacological studies

Neuropsychiatric disorders, cognitive and behavioral traits associated with *CCorGs* were identified based on the Disgenet database [39], using disgenet2r R package [40]. Pharmacological drugs with a half-life of up to 12 hours acting on the central nervous system were collected from the DrugBank database (<https://go.drugbank.com/>) [41].

8.8 CCorGsDB Implementation

The database was implemented using PHP [42], Javascript [43], HTML [44], JQuery [45], MySQL [46], Plotly.js [47], Bootstrap [48], and Ajax [49], and is available as a public domain website at <https://famed.ufal.br/grupopesquisa/cmc/ccorgs/index.php>. Dynamic filtering of the available datasets is provided based on Gene Symbol, Brain Region, Disease of CNS, Drug and Clock Gene and ordered by p value, p_{adjust} , Positive Correlation, Upper Bound and Lower Bound. Downloadable results for each search include images in PNG format, and an excel table reported statistics.

8.9 Statistical Analysis

Statistical analysis, preparation, selection and obtaining of expression data, and graphics, were assembled by computer programming codes registered in scripts and executed through the R Software (<https://www.r-project.org/>) version 3.6 .3. Pearson’s coefficient was used for the correlation analyses. Comparison between groups was performed using the non-parametric Wilcoxon-Mann-Whitney test and Fisher’s test. Cohen’s d test was used to calculate the effect size. Value of $p < 0.05$, adjusted $p < 0.05$ and $FDR < 0.05$ were considered to indicate a statistically significant difference.

9 Results and Discussion

We built a database of genes correlated with the circadian clock (*CCorGsDB*) in the mouse CNS, including 12 specific regions. The database contains information from the co-expression analysis of 15,951 recovered *CCorGs* considering all tissues. In addition, it gathers information from associated neurodegenerative and behavioral disorders and psychotropic drugs with a half-life of up to 12 hours that have the corresponding *CCorGs* as targets. We implemented *CCorGsDB* as an online platform to offer users, free of charge, a friendly web interface for research, graphical visualization and interpretation of data (<https://famed.ufal.br/grupopesquisa/cmc/ccorgs/index.php>).

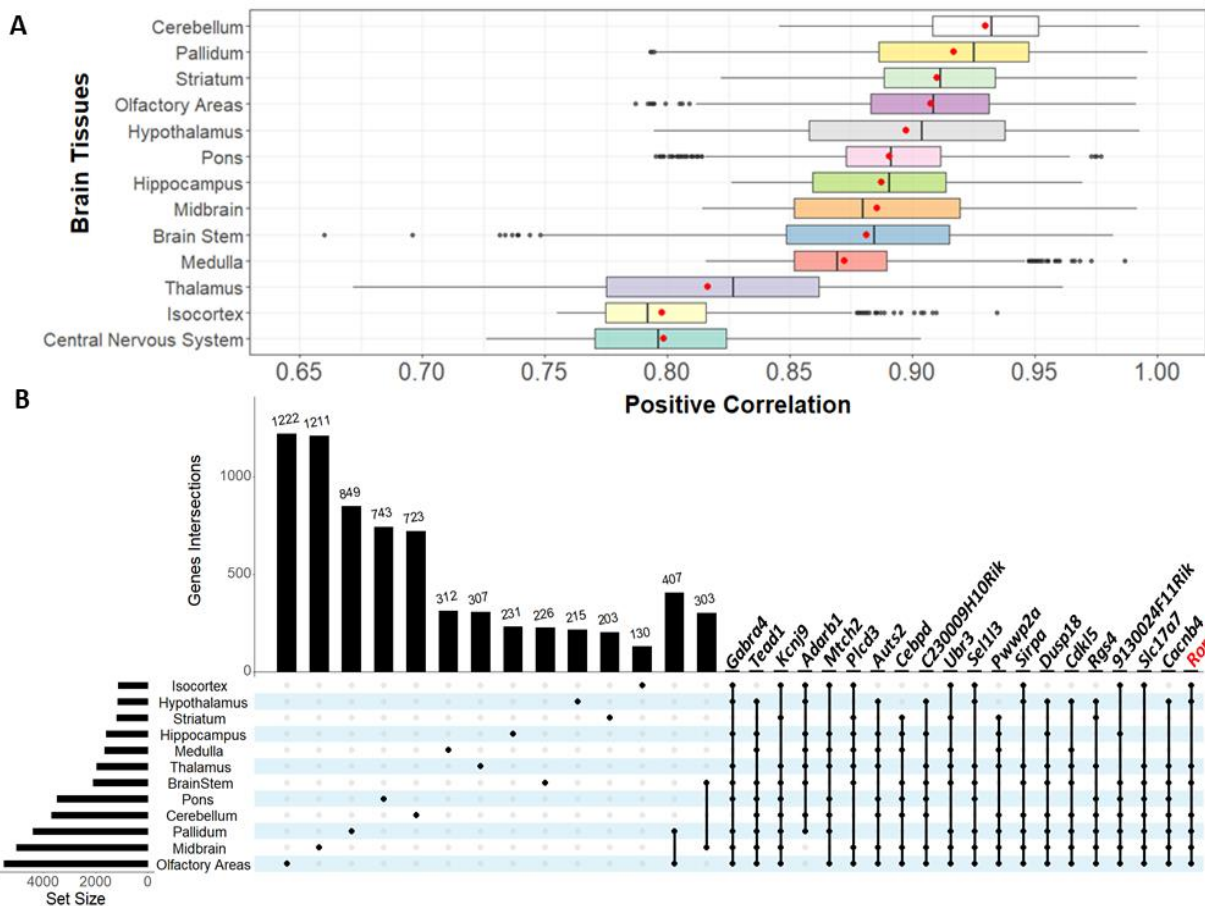
To identify *CCorGs*, we initially constructed twelve signed weighted co-expression networks of 19,933 genes with available expression data from different mouse CNS tissues: brainstem, cerebellum, hippocampus, hypothalamus, isocortex, medulla, midbrain, olfactory areas, pallidum, pons, striatum and thalamus. Additionally, we integrated the expression data from all tissues to compose a single CNS network. (**Supplementary Figure 1A-D**). Genes from those modules presenting strong correlations ($r \geq 0.8$, $p < 0.05$) with the expression of ten exemplary clock genes (*Arntl*, *Cry1*, *Dbp*, *Npas2*, *Nr1d1*, *Nr1d2*, *Per1*, *Per2*, *Per3* and *Tef*), and that fall in the 90th (percentile) of gene significance (GS) and Module Membership (MM), were selected as *CCorGs*. **Figure 2A** presents the distribution of correlation values for *CCorGs* in the CNS and specific regions. The olfactory areas network has the largest amount of *CCorGs* (5489) and of which 13 are clock genes (*Arntl*, *Arntl2*, *Clock*, *Csnk1a1*, *Csnk1d*, *Dbp*, *Hlf*, *Nr1d1*, *Nr1d2*, *Per1*, *Per3*, *Rora*, *Rorb*). The *CCorGs* in all tissues showed middle to high Pearson correlations, with a minimum value of $r = 0.659$ in brain stem and a maximum $r = 0.996$ in pallidum (**Supplementary Table 1**). The region with the highest median correlation value was cerebellum ($r = 0.93$) and the region with the lowest median correlation was the isocortex ($r = 0.79$) (**Figure 2A and Supplementary Table 1**).

The proportion of recovered clock genes amongst the *CCorGs* was higher than observed for the mouse transcriptome in 12 out of 13 networks, and statistically significant in 7 (brain stem, central nervous system, isocortex, olfactory areas, pallidum, striatum and thalamus) (Fisher's exact test, $p < 0.05$) (**Figure 2 and Supplementary Table 2**).

Most *CCorGs* were tissue-specific (**Figure 2B**). The largest set of *CCorGs* shared between two tissues was 407 between the olfactory areas and pallidum, followed by 303 *CCorGs* between brainstem and midbrain. *Gabra4*, *Tead1* and *Kcnj9* were recovered in nine tissues, while *Adarb1*, *Mtch2*, *Plcd3*, *Auts2*, *Cebpd*, *C230009H10Rik*, *Ubr3*, *Sel1l3*, *Pwpp2a*,

Sirpa, Dusp18, Cdkl5, Rgs4, 9130024F11Rik, Slc17a7, Cacnb4 and Rora were found in eight tissues. Kcnj9 is an ion channel protein controlling circadian rhythms in suprachiasmatic nucleus excitability [50]. Ubr3 is predicted to enable the activity of the ubiquitin ligase protein that is encoded by the Ube3A gene, an integral component of the molecular circadian clock through the regulation of the transcription factor BMAL1 [51]. Rora is a core clock component required for normal Bmal1 expression [52] and cycles robustly in some mouse tissues [3].

Figure 2. Clock Correlated Genes by specify-tissue. **A**- Distribution of Pearson correlation values for CCorGs in each tissue: brainstem; cerebellum; hippocampus; hypothalamus; isocortex; medulla; midbrain; olfactory areas; pallidum; pons; striatum; thalamus and central nervous system. The mean is indicated by the red dot. **B** - Gene sets intersections of CCorGs between CNS regions. We constrained the 02 largest intersections between two tissues and 20 genes present in the highest number of tissues.

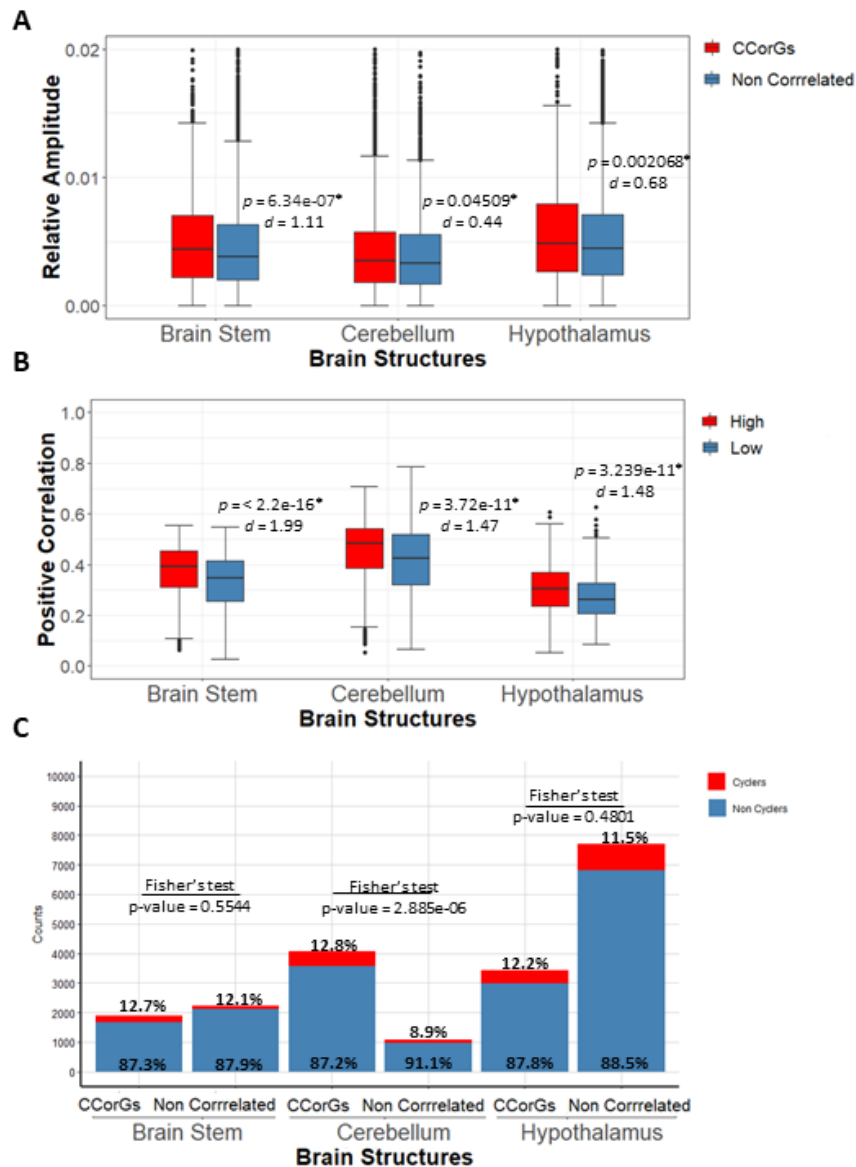


In order, to validate the database we further analyzed three regions (brainstem, cerebellum and hypothalamus) previously investigated in a high-resolution time course transcriptome experiment [3]. The rAMP from CCorGs groups were significantly higher for the three tissues compared to selected groups of *non correlated* genes (*Mann-Whitney test*, brainstem, $p = 6.34e-07$, $d = 1.11$; cerebellum, $p = 0.04509$, $d = 0.44$, hypothalamus, $p = 0.002068$, $d = 0.68$) (**Figure 3A**). Correspondingly, genes in the 95th percentile of rAMP distribution presented higher Pearson correlations compared to the genes in the lowest 5th

rAMP percentile (*Mann-Whitney test*, brainstem, $p < 2.2e-16$, $d = 1.99$; cerebellum, $p = 3.72e-11$, $d = 1.47$; hypothalamus, $p = 3.239e-11$, $d = 1.48$) (**Figure 3B**). This indicates that the CCorGs datasets are enriched for oscillating genes with higher amplitudes.

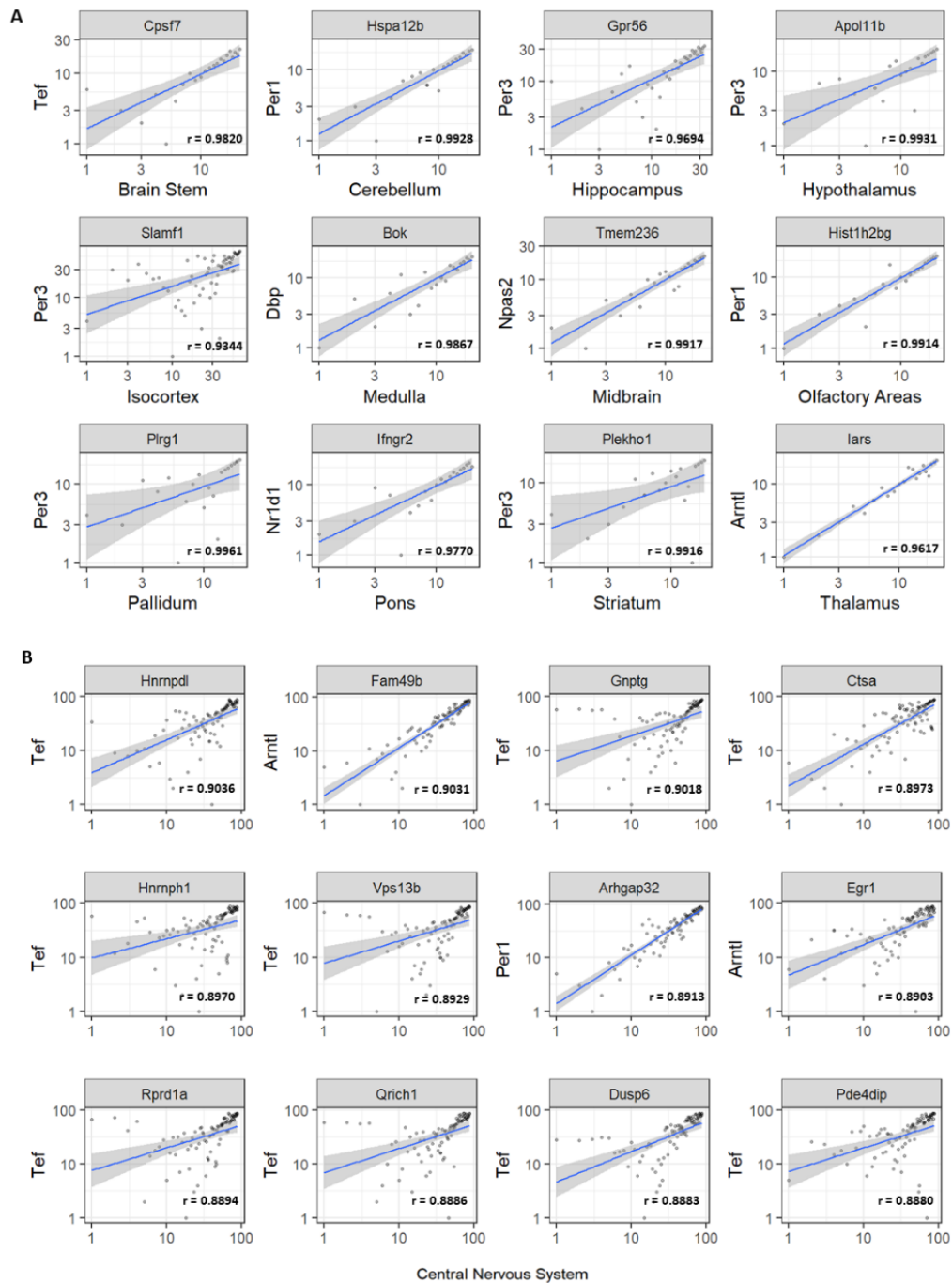
We also compared the proportion of cyclers to non-cyclers genes based on the Metacycle p value < 0.05 cutoff. We found a statistical difference (JTK p. value < 0.05) only in cerebellum (Fisher = $2.885e-06$), where 441 genes (12.8%) oscillate in the set of CCorGs while 208 genes (8.9%) oscillate in the *non correlated* set (**Figure 3C**).

Figure 3. In Silico validation of CCorGs. **A**- Box plot with difference and effect size (d) of relative amplitude (rAMP) values observed between CCorGs and non correlated genes in data from the circadian transcriptome of the brainstem, cerebellum, and hypothalamus. **B** - Box plot with the difference in positive correlation values observed between sets of genes with high rAMP and low rAMP cerebellum, hypothalamus and brainstem. **C** - Bar plot with Fisher's test comparing the frequencies of oscillating and non-oscillating genes in CCorGs and non correlated groups in brain stem, cerebellum and hypothalamus.



Amongst the top correlated genes in each region (**Figure 4A**), six (Gpr56, Apol11b, Bok, Plrg1, Ifngr2 and Iars) have circadian expression in at least one tissue according to CircaDB (JTK Q-value <0.05) [35]. From the top 12 *CCorGs* in the integrated CNS list, eleven (Hnmpdl, Fam49b, Gnptg, Ctsa, Hnmp1, Vps13b, Arhgap32, Egr1, Rprd1a, Qrich1 and Dusp6) have circadian expression in at least one tissue (JTK Q-value <0.05), (**Figure 4B and Supplementary Table 3**).

Figure 4. *CCorGs* with the highest correlation by tissue. A - Top *CCorGs* and their respective clock genes correlated in the mouse brainstem, cerebellum; hippocampus; hypothalamus; isocortex; medulla; midbrain; olfactory areas, pallidum, pons, striatum and thalamus. B - Top 12 *CCorGs* and their respective correlated clock genes in the CNS.



Egr1 is an early growth response gene, widely studied in circadian research, whose expression in neurons of mouse suprachiasmatic nuclei is induced by light [53]. EGR1 regulates the transcription and amplitude of several clock genes, including Bmal1, Per1, Per2, Rev-erba and Rev-erb β [54]. Gpr176 gene is a member of its family as an SCN-enriched orphan GPCR that sets the pace of circadian behavior and is expressed in a circadian manner by SCN neurons [55]. Hnnpdl showed oscillating expression patterns in more than six different mouse tissues [56] and has direct interactions with the circadian transcription factor CREB1 [57].

Functional enrichment analysis with *CCorGs* identified circadian clock pathways, represented by the terms “circadian entrainment”, “circadian rhythmic” or “rhythmic process”, in the CNS (**Table 1 and Figure 5 A-B**), brain stem, isocortex, midbrain, olfactory areas and striatum (**Supplementary Figure 2-13**).

Other known clock controlled pathways were also enriched, such as RNA splicing [58], learning or memory and cognition [59] in CNS and olfactory areas, mRNA binding and transcription cofactor activity [60] in brain stem, pons and hippocampus, postsynaptic density [61] in cerebellum, hippocampus, midbrain, olfactory areas and thalamus, dendritic and neuronal spine [62] in brain stem, midbrain and striatum, insulin secretion [63] in cerebellum and midbrain and insulin resistance [64] in CNS. Many enriched pathways were tissue-specific, some of which are of therapeutic importance in the CNS, such as: calcium transport, transport vesicle, transmembrane transporter complex, potassium, and ion channels [4] **Supplementary Figure 2-13**).

The dependence of pharmacokinetics on dosing time has been described in 17 drugs to treat various diseases in humans in the United States and Japan [65]. Also, it is known that for drugs with rapid pharmacokinetics (PK), circadian time can influence the efficacy, toxicity or the relationship between the therapeutic [66].

We identified many *CCorGs* that are targets of 109 pharmacological drugs with a half-life of up to 12 hours and acting on the CNS. Most (686 genes) of *CCorGs* are targets of apomorphine, atropine, butamben, caffeine, ergoloid mesylate, ergotamine, etomidate, flurazepam, galantamine, ibuprofen, meperidine, methamphetamine, procaine, propofol, risperidone, triazolam, valproic acid and zolpidem, **Supplementary Figure 14**). Studying these *CCorGs* can be useful to choose the most appropriate time of day to administer a drug and thus increase its therapeutic effects in the treatment of diseases of the CNS and for improvement on patients health [67].

Some of the drugs associated with *CCorGs* are involved with circadian rhythms. We found many butamben targets that are members of the family of calcium channel blockers

(Cacna2d3; Cacna1d; Cacna2d2; Cacnb4; Cacna2d1; Cacna1g; Cacna1b; Cacna1a; Cacnb3; Cacna1h; Cacnb2) which inhibit the influx of Ca^{2+} into cells producing muscle relaxation and that are rhythmically expressed [4].

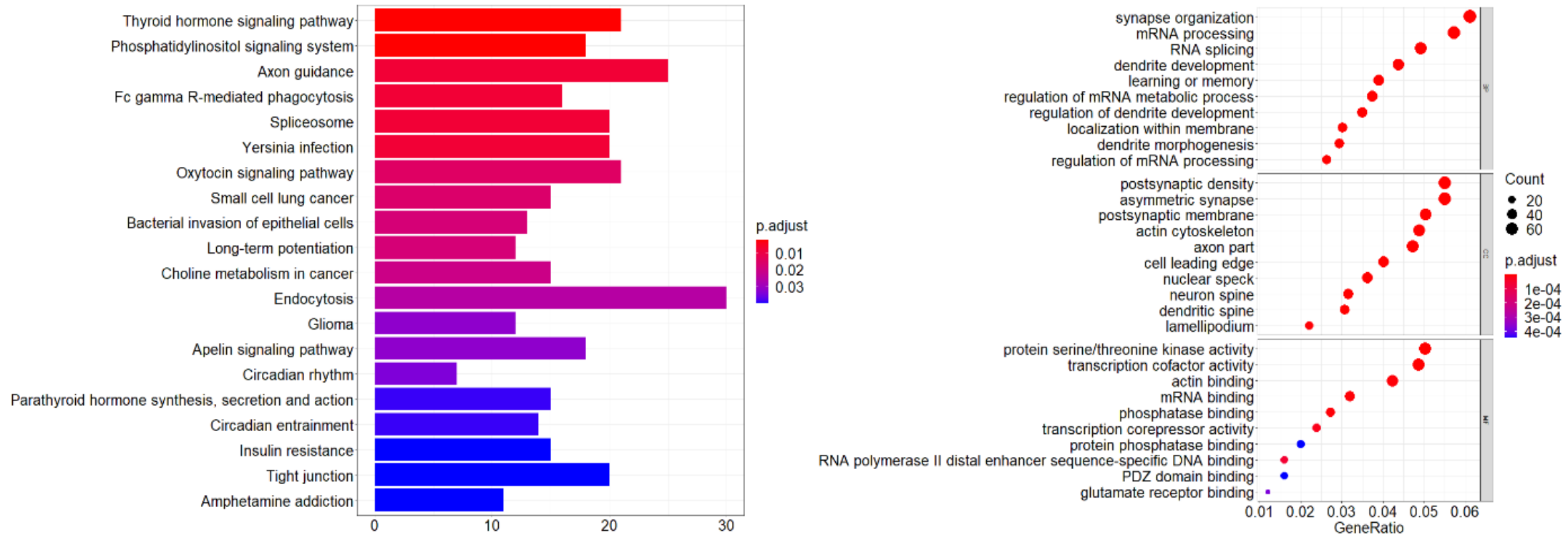
Serotonin receptors (Htr3a; Htr3b; Htr2b; Htr1f; Htr4; Htr3b) have also been found amongst the *CCorGs* targets of ergoloid mesylate, an important phase regulator hormone of circadian rhythms [68]. The 5-HT_{1B} receptor on the retinohypothalamic tract, the activation of which attenuates photic input to the SCN thereby reducing phase response to light [69].

The phosphodiesterase (PDE) genes identified as *CCorGs* (Pde4a, Pde1b, Pde4b, Pde3a, Pde11a, Pde6b, Pde7b, Pde8b, Pde9b) are caffeine targets [70]. The protein PDE4 a specific phosphodiesterase for cAMP, one of the intracellular mediators which activates *Per1* transcription. On the other hand, PDE4 inhibition affected the profile of *Per1* expression in SCN [71] and PDE4B2 protein plays a negative feedback role in adrenergic/cAMP signaling in the pineal gland, which have functions through the hormone melatonin to influence a broad range of circadian and circannual functions [72]. Caffeine delays the human endogenous circadian clock by antagonizing receptors for the endogenous sleep factor adenosine in the brain [73].

Studies have demonstrated that the pharmacokinetics and pharmacodynamics of apomorphine [74], atropine [75], flurazepam [76], ibuprofen [77], meperidine [78], methamphetamine [79] and melatonin [80] vary according to the circadian time of drug administration. Our results also pointed to melatonin targets even in smaller ratio. The endogenous melatonin rhythm exhibits a close association with the endogenous circadian component of the sleep-prone rhythm making this hormone an internal "facilitator" of sleep in humans and therefore useful in treating insomnia and resetting circadian rhythms [81]. The administration of melatonin is able to induce sleep when the homeostatic drive to sleep is insufficient; to inhibit the drive for wakefulness emanating from the circadian pacemaker; and induce phase shifts in the circadian clock such that the circadian phase of increased sleep propensity occurs at a new, desired time [82].

Propofol is a widely used intravenous anesthetic that decreases the expression of *Per1* and *Per2* clock genes in the SCN of rats exposed to constant darkness [83]. Risperidone is an atypical antipsychotic that is active at multiple dopamine and serotonin receptor subtypes [84]. Dopamine D₂ and dopamine D₃ receptors are expressed in brain regions critical for metabolic regulation and appetite that support the circadian rhythms [85], in arcuate nucleus [86], caudate/putamen [87], nucleus accumbens ventral tegmental area [88] and substantia nigra [89]. Risperidone resets the circadian clock in the pygmy field mouse in a phase-dependent manner [90].

Figure 5. Functional enrichment analysis of pathways from the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) and Gene Ontology (GO) from the CCorGs in the central nervous system. (A) Barplot with functional enrichment of KEGG terms. Genes found in circadian related pathways were: “Circadian rhythm” (Arntl, Bhlhe40, Btrc, Cry2, Per1, Per2, Prkag2) and “Circadian entrainment” (Cacna1d, Cacna1h, Calm1, Camk2b, Gng12, Grin2b, Gnai1, Gria1, Grin1, Itpr1, Per1, Per2, Plcb1, Prkcb). (B) Dot plot with the functional enrichment of the GO terms and the functions associated with biological processes (BP), molecular functions (MF) and cellular components (CC), $p_{\text{adjust}} < 0.05$.



Valproic acid (VPA) is an anticonvulsant used to treat bipolar disorder, a psychiatric disease associated with disturbances in circadian rhythmicity and shifts the rhythmic expression of *Period2::Luciferase* in tissue cultured from suprachiasmatic nuclei and skin fibroblasts [91]. High levels of dopamine contribute to mania and lengthen the period of circadian rhythms, thus, in the presence of high dopamine levels, VPA adjusts circadian rhythms to a normal period, shortens the period of circadian rhythms in manic patients [92].

The triazolam drug has impairs effects on brain activity during episodic memory encoding [93]. Encoding and consolidation of memories require the stimulation of dopamine receptors as part of a hippocampal–striatal–prefrontal loop that orchestrates the formation of new memories [94]. When administered 0.5 mg 3 hours before bedtime significantly improved circadian adaptation in treatment of jet lag syndrome [95]. Also, for the treatment of jet lag syndrome 10 mg of the zolpidem drug taken at bedtime for 3 nights increased sleep duration, decreased nocturnal awakenings and improved sleep quality [96].

The role of the circadian system in neurodegenerative diseases is not fully understood and has attracted growing interest from the scientific community [97]. Circadian rhythm disturbances, especially the sleep-wake cycle, are more severe in people with related neurodegenerative diseases, including alzheimer's disease, dementia, parkinson's disease and others [98] and in mental disorders such as depression and anxiety [99]. Many CCGs have been associated with various disorders linked to circadian rhythms. In fact, based on the Disgenet database [37], we found hundreds of CCorGs related to neurodegenerative and behavioral brain disorders in different tissues. The highest ratios were associated with anxiety: 230 CCorGs (Gene Ratio = 0.2108) in pons; 304 in brain stem (Gene Ratio = 0.1954) and 294 in hippocampus (Gene Ratio = 0.1948), followed by Alzheimer Disease with 225 targets CCorGs in isocortex (Gene Ratio = 0.1898), 492 in striatum (Gene Ratio = 0.1704) and 605 in pallidum (Gene Ratio = 0.1689) (**Supplementary Figure 15**).

Post-transcriptional mechanisms are responsible for a high complexity in circadian expression, whereas an oscillatory pattern at protein level may emerge from a gene with a stable mRNA over time [100]. In fact, it is estimated that 20% of the liver proteome is not circadian expressed at the transcript level [23]. Moreover, a gene exerting a circadian function does not necessarily imply a temporal variation in gene expression at transcript or protein level, as observed for CLOCK [20].

To our knowledge, this is the first study of co-expression analysis to search for CCGs in the CNS. The strategy used has the potential to identify important genes for circadian rhythms

in specific tissues of the mammalian CNS, overcoming methodological limitations considered in other studies.

However, the similarity of expression profile with circadian genes, which already have circadian expression experimentally proven and/or involvement with circadian rhythms, by itself, does not guarantee that these correlated genes also have the same functions. Therefore, new gene expression studies and functional assays are needed to experimentally confirm the involvement of candidate genes with the mammalian circadian timing system. We hope that this database is surpassed soon by new datasets with high spatiotemporal resolution that give more direct observations on the circadian dynamics in gene expression in the mammalian CNS.

10 References and Notes

1. BOTBOL, Michel et al. Biological and psychological rhythms: An integrative approach to rhythm disturbances in autistic disorder. **Journal of Physiology-Paris**, v. 107, n. 4, p. 298-309, 2013.
2. COX, Kimberly H.; TAKAHASHI, Joseph S. Circadian clock genes and the transcriptional architecture of the clock mechanism. **Journal of molecular endocrinology**, v. 63, n. 4, p. R93-R102, 2019.
3. ZHANG, R. et al. A circadian gene expression atlas in mammals : Implications for biology and medicine. n. 642, 2014.
4. RUBEN, Marc D. et al. A database of tissue-specific rhythmically expressed human genes has potential applications in circadian medicine. **Science Translational Medicine**, v. 10, n. 458, 2018.
5. LU, Qingqing; KIM, Jin Young. Mammalian circadian networks mediated by the suprachiasmatic nucleus. **The FEBS Journal**, 2021.
6. ALBRECHT, Urs. Timing to perfection: the biology of central and peripheral circadian clocks. **Neuron**, v. 74, n. 2, p. 246-260, 2012.
7. VOIGT, Robin M.; FORSYTH, Christopher B.; KESHAVARZIAN, Ali. Circadian disruption: potential implications in inflammatory and metabolic diseases associated with alcohol. **Alcohol research: current reviews**, v. 35, n. 1, p. 87, 2013.
8. LOGAN, Ryan W.; MCCLUNG, Colleen A. Rhythms of life: circadian disruption and brain disorders across the lifespan. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 20, n. 1, p. 49-65, 2019.
9. MOHAWK, Jennifer A.; GREEN, Carla B.; TAKAHASHI, Joseph S. Central and peripheral circadian clocks in mammals. **Annual review of neuroscience**, v. 35, p. 445-462, 2012.
10. KORENČIČ, Anja et al. Timing of circadian genes in mammalian tissues. **Scientific reports**, v. 4, n. 1, p. 1-9, 2014.
11. MEI, Wenwen et al. Genome-wide circadian rhythm detection methods: systematic evaluations and practical guidelines. **Briefings in Bioinformatics**, v. 22, n. 3, p. bbaa135, 2021.
12. WU, Gang et al. Genome-wide studies of time of day in the brain: Design and analysis. **Brain Science Advances**, v. 6, n. 2, p. 92-105, 2020.
13. PANDA, Satchidananda et al. Coordinated transcription of key pathways in the mouse by the circadian clock. **Cell**, v. 109, n. 3, p. 307-320, 2002.

14. DEBSKI, K. J. et al. The circadian dynamics of the hippocampal transcriptome and proteome is altered in experimental temporal lobe epilepsy. **Science advances**, v. 6, n. 41, p. eaat5979, 2020.
15. HUGHES, M. et al. High-resolution time course analysis of gene expression from pituitary. In: **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2007. p. 381-386.
16. STAEHLE, Mary M. et al. Diurnal Patterns of Gene Expression in the Dorsal Vagal Complex and the Central Nucleus of the Amygdala–Non-rhythm-generating Brain Regions. **Frontiers in Neuroscience**, v. 14, p. 375, 2020.
17. LI, J. Z. et al. Circadian patterns of gene expression in the human brain and disruption in major depressive disorder. 2013.
18. CHEN, Cho-Yi et al. Effects of aging on circadian patterns of gene expression in the human prefrontal cortex. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 1, p. 206-211, 2016.
19. MURE, Ludovic S. et al. Diurnal transcriptome atlas of a primate across major neural and peripheral tissues. **Science**, v. 359, n. 6381, 2018.
20. MAYWOOD, E. S.; O'BRIEN, J. A.; HASTINGS, M. H. Expression of mCLOCK and other circadian clock-relevant proteins in the mouse suprachiasmatic nuclei. **Journal of neuroendocrinology**, v. 15, n. 4, p. 329-334, 2003.
21. TAKAHASHI, J. S. Molecular components of the circadian clock in mammals. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 17, n. S1, p. 6-11, 2015.
22. KOJIMA, Shihoko; SHINGLE, Danielle L.; GREEN, Carla B. Post-transcriptional control of circadian rhythms. **Journal of cell science**, v. 124, n. 3, p. 311-320, 2011.
23. REDDY, A. B. et al. Circadian orchestration of the hepatic proteome. **Curr Biol**, v. 16, n. 11, p. 1107-15, Jun 6. 2006.
24. ANAFI, Ron C. et al. CYCLOPS reveals human transcriptional rhythms in health and disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 20, p. 5312-5317, 2017.
25. HUGHEY, Jacob J.; HASTIE, Trevor; BUTTE, Atul J. ZeitZeiger: supervised learning for high-dimensional data from an oscillatory system. **Nucleic acids research**, v. 44, n. 8, p. e80-e80, 2016.
26. SERIN, Elise AR et al. Learning from co-expression networks: possibilities and challenges. **Frontiers in plant science**, v. 7, p. 444, 2016.
27. VAN DAM, Sipko et al. Gene co-expression analysis for functional classification and gene–disease predictions. **Briefings in bioinformatics**, v. 19, n. 4, p. 575-592, 2018.

28. Allen Institute for Brain Science (2004). Allen Mouse Brain Atlas [dataset]. Available from mouse.brain-map.org. Allen Institute for Brain Science (2011).
29. GROTE, Steffi et al. ABAEnrichment: an R package to test for gene set expression enrichment in the adult and developing human brain. **Bioinformatics**, v. 32, n. 20, p. 3201-3203, 2016.
30. LANGFELDER, Peter; HORVATH, Steve. WGCNA: an R package for weighted correlation network analysis. **BMC bioinformatics**, v. 9, n. 1, p. 1-13, 2008.
31. LANGFELDER, Peter; ZHANG, Bin; HORVATH, Steve. Defining clusters from a hierarchical cluster tree: the Dynamic Tree Cut package for R. **Bioinformatics**, v. 24, n. 5, p. 719-720, 2008.
32. ZHANG, Bin; HORVATH, Steve. A general framework for weighted gene co-expression network analysis. **Statistical applications in genetics and molecular biology**, v. 4, n. 1, 2005.
33. BOZEK, Katarzyna et al. Regulation of clock-controlled genes in mammals. **PloS one**, v. 4, n. 3, p. e4882, 2009.
34. WU, Gang et al. MetaCycle: an integrated R package to evaluate periodicity in large scale data. **Bioinformatics**, v. 32, n. 21, p. 3351-3353, 2016.
35. PIZARRO, Angel et al. CircaDB: a database of mammalian circadian gene expression profiles. **Nucleic acids research**, v. 41, n. D1, p. D1009-D1013, 2012.
36. KANEHISA, Minoru; GOTO, Susumu. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. **Nucleic acids research**, v. 28, n. 1, p. 27-30, 2000.
37. ASHBURNER, Michael et al. Gene ontology: tool for the unification of biology. **Nature genetics**, v. 25, n. 1, p. 25-29, 2000.
38. WU, Tianzhi et al. clusterProfiler 4.0: A universal enrichment tool for interpreting omics data. **The Innovation**, v. 2, n. 3, p. 100141, 2021.
39. PIÑERO, Janet et al. DisGeNET: a discovery platform for the dynamical exploration of human diseases and their genes. **Database**, v. 2015, 2015.
40. Piñero, J., Ramírez-Anguita, J. M., Saüch-Pitarch, J., Ronzano, F., Centeno, E., Sanz, F., & Furlong, L. I. (2020). The DisGeNET knowledge platform for disease genomics: 2019 update. *Nucleic Acids Research*, 48(D1), D845-D855.
41. WISHART, David S. et al. DrugBank: a comprehensive resource for in silico drug discovery and exploration. **Nucleic acids research**, v. 34, n. suppl_1, p. D668-D672, 2006.

42. LERDORF, Rasmus. Announce: Personal Home Page Tools (PHP Tools). **Current version**, v. 5, 1995.
43. PRESCOTT, Preston. **Programação em JavaScript**. Babelcube Inc., 2016.
44. SILVA, Maurício Samy. **Criando sites com HTML: sites de alta qualidade com HTML e CSS**. Novatec Editora, 2008.
45. CHAFFER, Jonathan; SWEDBERG, Karl. **Learning jQuery**. Packt Publishing Ltd, 2011.
46. DUBOIS, Paul. **MySQL**. Pearson Education, 2008.
47. SIEVERT, Carson et al. plotly: Create Interactive Web Graphics via 'plotly.js'. **R package version**, v. 4, n. 1, p. 110, 2017.
48. EFRON, Bradley; TIBSHIRANI, Robert J. **An introduction to the bootstrap**. CRC press, 1994.
49. HOLDENER, Anthony T. **Ajax: the definitive guide**. " O'Reilly Media, Inc.", 2008.
50. HARVEY, Jenna RM; PLANTE, Amber E.; MEREDITH, Andrea L. Ion channels controlling circadian rhythms in suprachiasmatic nucleus excitability. **Physiological Reviews**, v. 100, n. 4, p. 1415-1454, 2020.
51. GOSSAN, Nicole C. et al. The E3 ubiquitin ligase UBE3A is an integral component of the molecular circadian clock through regulating the BMAL1 transcription factor. **Nucleic acids research**, v. 42, n. 9, p. 5765-5775, 2014.
52. SATO, Trey K. et al. A functional genomics strategy reveals Rora as a component of the mammalian circadian clock. **Neuron**, v. 43, n. 4, p. 527-537, 2004.
53. TAO, Weiwei et al. EGR1 regulates hepatic clock gene amplitude by activating Per1 transcription. **Scientific reports**, v. 5, n. 1, p. 1-13, 2015.
54. RIEDEL, Casper Schwartz et al. Altered light induced EGR1 expression in the SCN of PACAP deficient mice. **PloS one**, v. 15, n. 5, p. e0232748, 2020.
55. MURAI, Iori et al. Gpr176 is a Gz-linked orphan G-protein-coupled receptor that sets the pace of circadian behaviour. **Nature communications**, v. 7, n. 1, p. 1-13, 2016.
56. LIU, Yuting et al. Cold-induced RNA-binding proteins regulate circadian gene expression by controlling alternative polyadenylation. **Scientific reports**, v. 3, n. 1, p. 1-11, 2013.
57. LAING, Emma E. et al. Exploiting human and mouse transcriptomic data: Identification of circadian genes and pathways influencing health. **BioEssays**, v. 37, n. 5, p. 544-556, 2015.

58. MCGLINCY, Nicholas J. et al. Regulation of alternative splicing by the circadian clock and food related cues. **Genome biology**, v. 13, n. 6, p. 1-17, 2012.
59. SMARR, Benjamin L. et al. A time to remember: the role of circadian clocks in learning and memory. **Behavioral neuroscience**, v. 128, n. 3, p. 283, 2014.
60. REINKE, Hans et al. Differential display of DNA-binding proteins reveals heat-shock factor 1 as a circadian transcription factor. **Genes & development**, v. 22, n. 3, p. 331-345, 2008.
61. JASINSKA, Malgorzata et al. Circadian clock regulates the shape and content of dendritic spines in mouse barrel cortex. **PloS one**, v. 14, n. 11, p. e0225394, 2019.
62. JASINSKA, Malgorzata et al. Circadian changes of dendritic spine geometry in mouse barrel cortex. **Frontiers in Neuroscience**, v. 14, p. 990, 2020.
63. BODEN, GUENTHER et al. Evidence for a circadian rhythm of insulin secretion. **American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism**, v. 271, n. 2, p. E246-E252, 1996.
64. BODEN, GUENTHER et al. Evidence for a circadian rhythm of insulin secretion. **American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism**, v. 271, n. 2, p. E246-E252, 1996.
65. OHDO, Shigehiro; KOYANAGI, Satoru; MATSUNAGA, Naoya. Chronopharmacological strategies focused on chrono-drug discovery. **Pharmacology & therapeutics**, v. 202, p. 72-90, 2019.
66. NAHMIAS, Yaakov; ANDROULAKIS, Ioannis P. Circadian effects of drug responses. **Annual review of biomedical engineering**, v. 23, p. 203-224, 2021.
67. OHDO, Shigehiro. Chronotherapeutic strategy: rhythm monitoring, manipulation and disruption. **Advanced drug delivery reviews**, v. 62, n. 9-10, p. 859-875, 2010.
68. MORIN, Lawrence P. Serotonin and the regulation of mammalian circadian rhythmicity. **Annals of medicine**, v. 31, n. 1, p. 12-33, 1999.
69. PICKARD, Gary E. et al. 5HT1B receptor agonists inhibit light-induced phase shifts of behavioral circadian rhythms and expression of the immediate-early gene c-fos in the suprachiasmatic nucleus. **Journal of neuroscience**, v. 16, n. 24, p. 8208-8220, 1996.
70. BOSWELL-SMITH, Victoria; SPINA, Domenico; PAGE, Clive P. Phosphodiesterase inhibitors. **British journal of pharmacology**, v. 147, n. S1, p. S252-S257, 2006.
71. MASUMOTO, Koh-hei et al. Effect of phosphodiesterase type 4 on circadian clock gene *Per1* transcription. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 306, n. 3, p. 781-785, 2003.

72. KIM, Jong-So et al. Daily rhythm in pineal phosphodiesterase (PDE) activity reflects adrenergic/3', 5'-cyclic adenosine 5'-monophosphate induction of the PDE4B2 variant. **Endocrinology**, v. 148, n. 4, p. 1475-1485, 2007.
73. LANDOLT, Hans Peter. Caffeine, the circadian clock, and sleep. **Science**, v. 349, n. 6254, p. 1289-1289, 2015.
74. NAKANO, Shigeyuki; HARA, Chiaki; OGAWA, Nobuya. Circadian rhythm of apomorphine-induced stereotypy in rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 12, n. 3, p. 459-461, 1980.
75. FURUTA, Setsuo et al. Increase of peak expiratory flow by atropine is dependent on circadian rhythm. **Canadian journal of anaesthesia**, v. 48, n. 1, p. 85-87, 2001.
76. CROWLEY, Thomas J.; HYDINGER-MACDONALD, Marilyn. Bedtime flurazepam and the human circadian rhythm of spontaneous motility. **Psychopharmacology**, v. 62, n. 2, p. 157-161, 1979.
77. HALSAS, Marikki et al. Morning versus evening dosing of ibuprofen using conventional and time-controlled release formulations. **International journal of pharmaceutics**, v. 189, n. 2, p. 179-185, 1999.
78. HOLCSLAW, T. L.; MIYA, T. S.; BOUSQUET, W. S. Circadian rhythms in drug action and drug metabolism in the mouse. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 195, n. 2, p. 320-332, 1975.
79. DOYLE, Susan E. et al. Effects of circadian disruption on methamphetamine consumption in methamphetamine-exposed rats. **Psychopharmacology**, v. 232, n. 12, p. 2169-2179, 2015.
80. SACK, Robert L.; LEWY, Alfred J. Melatonin as a chronobiotic: treatment of circadian desynchrony in night workers and the blind. **Journal of Biological Rhythms**, v. 12, n. 6, p. 595-603, 1997.
81. CAJOCHEN, Christian; 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.
82. ZISAPEL, Nava; TARRASCH, Ricardo; LAUDON, Moshe. The relationship between melatonin and cortisol rhythms: clinical implications of melatonin therapy. **Drug development research**, v. 65, n. 3, p. 119-125, 2005.
83. BEN-HAMOUDA, Nawfel et al. Short-term propofol anaesthesia down-regulates clock genes expression in the master clock. **Chronobiology international**, v. 35, n. 12, p. 1735-1741, 2018.

84. SCHOTTE, An et al. Risperidone compared with new and reference antipsychotic drugs: in vitro and in vivo receptor binding. **Psychopharmacology**, v. 124, n. 1, p. 57-73, 1996.
85. ROMERO-FERNANDEZ, Wilber et al. Dopamine D1 and D2 receptor immunoreactivities in the arcuate-median eminence complex and their link to the tubero-infundibular dopamine neurons. **European journal of histochemistry: EJH**, v. 58, n. 3, 2014.
86. GUILDING, Clare et al. A riot of rhythms: neuronal and glial circadian oscillators in the mediobasal hypothalamus. **Molecular brain**, v. 2, n. 1, p. 1-19, 2009.
87. NATSUBORI, Akiyo; HONMA, Ken-ichi; HONMA, Sato. Differential responses of circadian Per2 rhythms in cultured slices of discrete brain areas from rats showing internal desynchronisation by methamphetamine. **European Journal of Neuroscience**, v. 38, n. 4, p. 2566-2571, 2013.
88. LANDGRAF, Dominic; LONG, Jaimie E.; WELSH, David K. Depression-like behaviour in mice is associated with disrupted circadian rhythms in nucleus accumbens and periaqueductal grey. **European Journal of Neuroscience**, v. 43, n. 10, p. 1309-1320, 2016.
89. GUREVICH, Eugenia V.; JOYCE, Jeffrey N. Distribution of dopamine D3 receptor expressing neurons in the human forebrain: comparison with D2 receptor expressing neurons. **Neuropsychopharmacology**, v. 20, n. 1, p. 60-80, 1999.
90. CHERUKALADY, Rajeev et al. Risperidone resets the circadian clock in mice. **Biological Rhythm Research**, v. 48, n. 4, p. 583-591, 2017.
91. JOHANSSON, Anne-Sofie et al. Valproic acid phase shifts the rhythmic expression of Period2:: Luciferase. **Journal of biological rhythms**, v. 26, n. 6, p. 541-551, 2011.
92. LANDGRAF, Dominic et al. The mood stabilizer valproic acid opposes the effects of dopamine on circadian rhythms. **Neuropharmacology**, v. 107, p. 262-270, 2016.
93. MINTZER, Miriam Z. et al. Effects of Triazolam on Brain Activity During Episodic Memory Encoding:: A PET Study. **Neuropsychopharmacology**, v. 25, n. 5, p. 744-756, 2001.
94. CLOS, Mareike; BUNZECK, Nico; SOMMER, Tobias. Dopamine is a double-edged sword: dopaminergic modulation enhances memory retrieval performance but impairs metacognition. **Neuropsychopharmacology**, v. 44, n. 3, p. 555-563, 2019.
95. BUXTON, Orfeu M. et al. A benzodiazepine hypnotic facilitates adaptation of circadian rhythms and sleep-wake homeostasis to an eight hour delay shift simulating westward jet lag. **Sleep**, v. 23, n. 7, p. 915-927, 2000.

96. JAMIESON, Andrew O. et al. Zolpidem reduces the sleep disturbance of jet lag. **Sleep medicine**, v. 2, n. 5, p. 423-430, 2001.
97. LENG, Yue et al. Association between circadian rhythms and neurodegenerative diseases. **The Lancet Neurology**, v. 18, n. 3, p. 307-318, 2019.
98. VIDENOVIC, A. Circadian rhythm in neurodegenerative diseases. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 405, p. 44, 2019.
99. WALKER, William H. et al. Circadian rhythm disruption and mental health. **Translational psychiatry**, v. 10, n. 1, p. 1-13, 2020.
100. PREUBNER, Marco; HEYD, Florian. Post-transcriptional control of the mammalian circadian clock: implications for health and disease. **Pflügers Archiv-European Journal of Physiology**, v. 468, n. 6, p. 983-991, 2016.

Acknowledgments: We thank John Hogenesch for providing the circadian temporal series data. This research was funded by CNPq, CAPES and FAPEAL.

11 Supplementary Materials – Tables

Table S1. Tissues, input parameters used for Co-Expression networks (WGCNA) and overall correlations for *CCorGs* sets. SD (standard deviation), $r_{\min}$ (minimum Pearson GS correlation), $r_{\max}$ (maximum Pearson GS correlation).

Tissues	Number of Subregions	Number of Input genes	Soft-Threshold Power (β)	$r_{\min}$	$r_{\max}$	Mean	SD
Central Nervous System	89	19933	8	0.726	0.903	0.798	0.037
Isocortex	62	19933	6	0.755	0.934	0.797	0.030
Hippocampus	33	19932	7	0.826	0.969	0.887	0.033
Medulla	30	19931	8	0.815	0.986	0.872	0.028
Midbrain	22	19933	8	0.814	0.991	0.885	0.040
Brain Stem	22	19933	7	0.659	0.982	0.884	0.043
Pallidum	21	19923	8	0.793	0.996	0.916	0.039
Thalamus	21	19924	8	0.671	0.961	0.816	0.062
Olfactory Areas	20	19933	10	0.786	0.991	0.907	0.031
Cerebellum	20	19924	9	0.845	0.992	0.930	0.026
Pons	20	19932	8	0.795	0.977	0.890	0.031
Striatum	20	19933	8	0.821	0.991	0.910	0.031
Hypothalamus	20	19885	6	0.794	0.993	0.897	0.047

Table S2. Fisher test and frequencies of circadian genes in sets of *CCorGs* by tissue compared to the frequency of circadian genes found for the mouse transcriptome (ZHANG, et al., 2014).

	N	Clock Genes	% Clock Genes	Fisher's Test
Mouse Transcriptome (ZHANG, et al., 2014)	26378	23	0,08	—
Thalamus	1952	9	0,46	$p = 0.0002313^*$
Isocortex	1133	6	0,52	$p = 0.001035^*$
Brain Stem	2080	8	0,38	$p = 0.001408^*$
Olfactory Areas	5489	14	0,25	$p = 0.003223^*$
Pallidum	3462	10	0,28	$p = 0.00328^*$
Striatum	4389	11	0,25	$p = 0.005976^*$
Central Nervous System	1451	5	0,34	$p = 0.01394^*$
Hypothalamus	1164	3	0,25	$p = 0.09562$
Midbrain	5030	8	0,15	$p = 0.1418$
Cerebellum	3674	5	0,13	$p = 0.3797$
Hippocampus	1594	2	0,12	$p = 0.6515$
Medulla	1679	2	0,11	$p = 0.6598$
Pons	1188	1	0,08	$p = 1$

Table S3. Evidence for circadian expression of the top *CCorGs* of 12 mouse CNS tissues and 12 top *CCorGs* in the integrated CNS according to CircaDB (<http://circadb.hogeneschlab.org/>) [35].

CCorGs	Official Full Name	Tissue	Circadian Expression in tissue according to CircaDB	
			JTK Q-value <0.05	JTK p-value <0.05
Cpsf7	Cleavage and polyadenylation specific factor 7	Brain Stem	Non Cyclers	Liver; Suprachiasmatic Nuclei
Hspa12b	Heat shock protein 12B	Cerebellum	Non Cyclers	Aorta; Lung; Skeletal Muscle
Gpr56	G protein-coupled receptor 56	Hippocampus	Brain Stem; Suprachiasmatic Nuclei	Aorta; Adrenal Gland; Brain Stem; Brown Adipose; Cerebellum; Heart; Hypothalamus; Lung
Apol11b	Apolipoprotein L 11b	Hypothalamus	Colon	Colon
Slamf1	Signaling lymphocytic activation molecule family member 1	Isocortex	Non Cyclers	Heart
Bok	BCL2 family apoptosis regulator BOK	Medulla	Liver	Adrenal Gland; Kidney; Liver
Tmem236	Transmembrane protein 236	Midbrain	Non Cyclers	Non-Cyclers
Hist1h2bg	Histone H2B type 1-C/E/F/G/I	Olfactory Areas	Non Cyclers	Liver
Plrg1	Pleiotropic regulator 1	Pallidum	Liver	Colon; Heart; Kidney; Liver; Lung; Suprachiasmatic Nuclei
Ifngr2	Interferon gamma receptor 2	Pons	Colon; Liver	Colon; Hypothalamus; Kidney; Liver; Suprachiasmatic Nuclei
Plekho1	Pleckstrin homology domain containing, family O member 1	Striatum	Non Cyclers	Heart
Iars	Isoleucine-trna synthetase	Thalamus	Heart; Kidney; Liver	Aorta; White Adipose; Heart; Hypothalamus; Kidney; Liver; Suprachiasmatic Nuclei
Hnrnpdl	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like	Central Nervous System	Brainstem; Liver; Pituitary; Suprachiasmatic Nuclei;	Aorta; Brainstem; Brown Adipose; Cerebellum; Colon; heart. Liver; Lung; Kidney; Pituitary; Suprachiasmatic Nuclei;
Fam49b	Family with sequence similarity 49 member	Central Nervous System	Brown Adipose; Suprachiasmatic Nuclei; White Adipose	Brown Adipose; Suprachiasmatic Nuclei; White Adipose
Gnptg	N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase, gamma subunit	Central Nervous System	Colon	Colon; Suprachiasmatic Nuclei
Ctsa	Cathepsin A	Central Nervous System	Adrenal Gland; Kidney	Adrenal Gland; Kidney; Liver
HnrnpH1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H1	Central Nervous System	Colon	Cerebellum; Colon; Heart; Hypothalamus;
Vps13b	Vacuolar protein sorting 13B	Central Nervous System	Cerebellum; Suprachiasmatic Nuclei	Cerebellum; Colon; Suprachiasmatic Nuclei
Arhgap32	Rho gtpase activating protein 32	Central Nervous System	Colon	Adrenal Gland; Colon; Heart; Suprachiasmatic Nuclei
Egr1	Early growth response 1	Central Nervous System	Liver; Suprachiasmatic Nuclei	Adrenal Gland; Colon; Heart; Lung; Suprachiasmatic Nuclei
Rprd1a	Regulation of nuclear pre-mrna domain containing 1A	Central Nervous System	Brown Adipose; Kidney; Liver; Lung	Adrenal Gland; Brain Stem; Brown Adipose; Cerebellum; Heart; Hypothalamus; Kidney; Liver; Lung
Qrich1	Glutamine-rich 1	Central Nervous System	Suprachiasmatic Nuclei	Suprachiasmatic Nuclei
Dusp6	Dual specificity phosphatase 6	Central Nervous System	Suprachiasmatic Nuclei	Adrenal Gland; Heart; Liver; Suprachiasmatic Nuclei
Pde4dip	Phosphodiesterase 4D interacting protein (myomegalin)	Central Nervous System	Non Cyclers	Brain Stem; Brown Adipose; Colon Liver; Pituitary; White Adipose

12 Supplementary Materials - Figures

Figure S1. Main steps in the co-expression network construction. **A** – Network topology analysis for various soft-threshold powers. Each power corresponded to an independence of scale and average connectivity. A different soft-threshold power (horizontal red line) was selected in each tissue (**Supplementary Table 1**) for the construction of the modules according to the free scale topology. **B** – Dendrogram of genes co-expression modules, each color represents a module. **C** – Heat map with the correlation between circadian markers (biological traits) and module eigengenes. **D** - Scatterplot of gene significance (GS) for a circadian marker trait and module membership (MM).

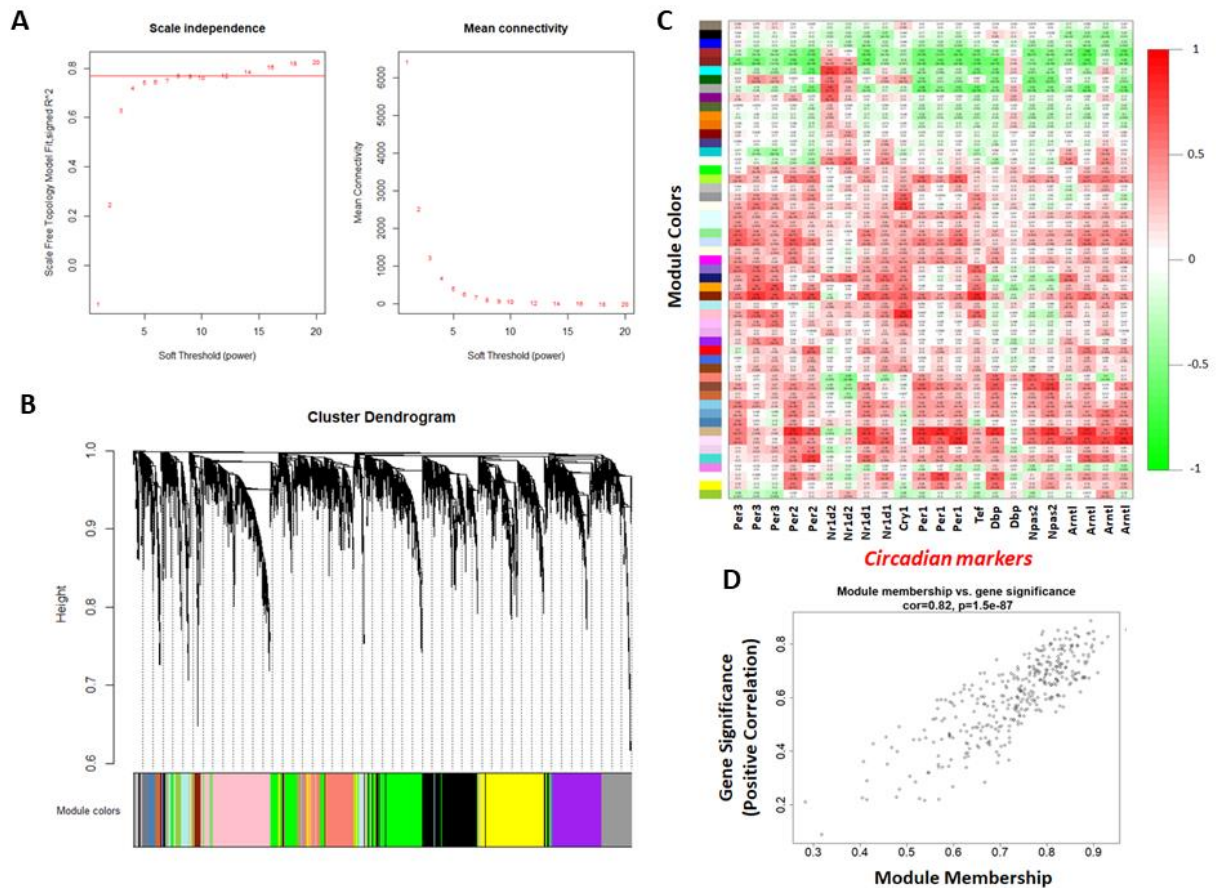


Figure S2. Functional enrichment analysis of pathways from the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) and Gene Ontology (GO) from the *CCorGs* in the brain stem. **A** – Bar plot with functional enrichment of KEGG terms. **B** – Dot plot with the functional enrichment of the GO terms and the functions associated with biological processes (BP), molecular functions (MF) and cellular components (CC), $p_{\text{adjust}} < 0.05$.

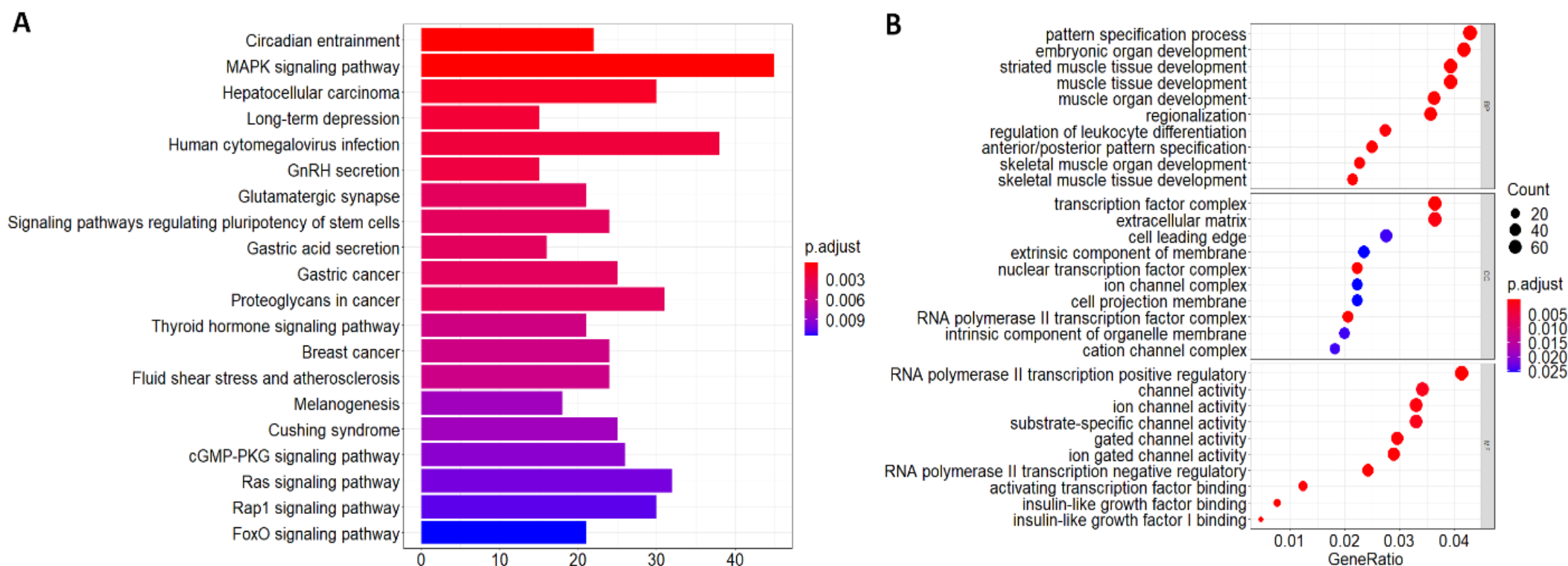


Figure S3. Functional enrichment analysis of pathways from the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) and Gene Ontology (GO) from the *CCorGs* in the cerebellum. **A** – Bar plot with functional enrichment of KEGG terms. **B** – Dot plot with the functional enrichment of the GO terms and the functions associated with biological processes (BP), molecular functions (MF) and cellular components (CC), p. adjust<0.05.

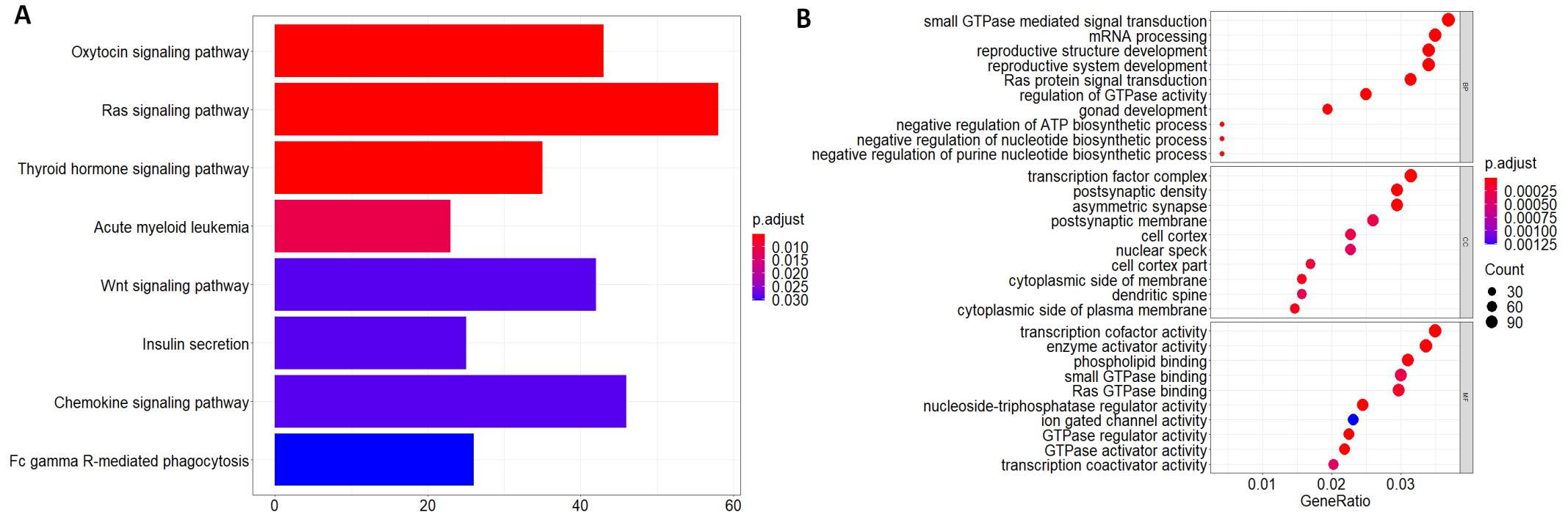


Figure S4. Functional enrichment analysis of pathways from the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) and Gene Ontology (GO) from the *CCorGs* in the hippocampus. A – Bar plot with functional enrichment of KEGG terms. B – Dot plot with the functional enrichment of the GO terms and the functions associated with biological processes (BP), molecular functions (MF) and cellular components (CC), p . adjust<0.05.

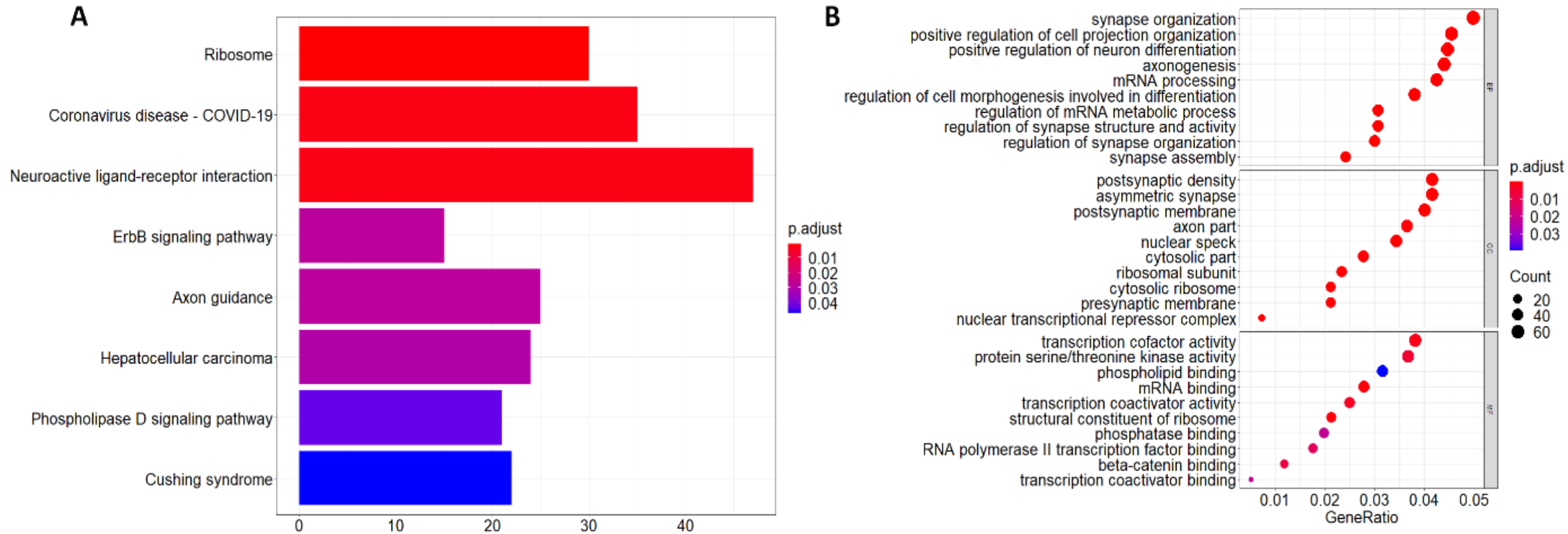


Figure S5. Functional enrichment analysis of pathways from the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) and Gene Ontology (GO) from the CCorGs in the hypothalamus. A – Bar plot with functional enrichment of KEGG terms. B – Dot plot with the functional enrichment of the GO terms and the functions associated with biological processes (BP), molecular functions (MF) and cellular components (CC), p. adjust<0.05.

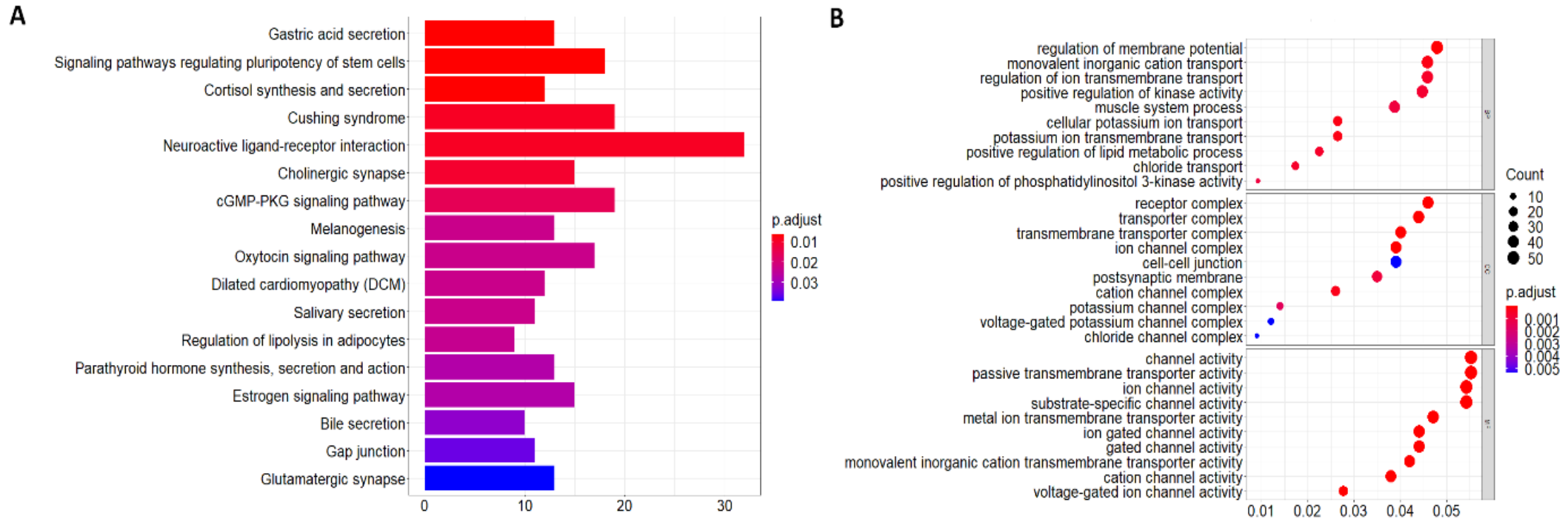


Figure S6. Functional enrichment analysis of pathways from the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) and Gene Ontology (GO) from the CCorGs in the isocortex. A – Bar plot with functional enrichment of KEGG terms. B – Dot plot with the functional enrichment of the GO terms and the functions associated with biological processes (BP), molecular functions (MF) and cellular components (CC), p. adjust<0.05.

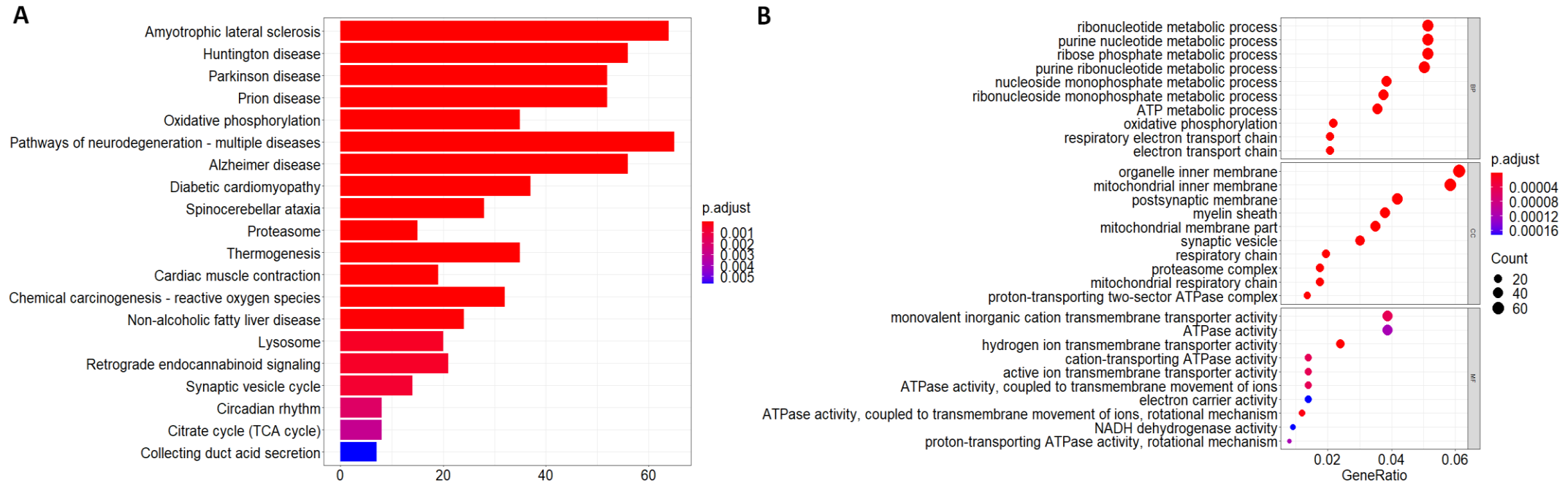


Figure S7. Functional enrichment analysis of pathways from the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) and Gene Ontology (GO) from the *CCorGs* in the medulla. A – Dot plot with the functional enrichment of the GO terms and the functions associated with biological processes (BP), p . adjust < 0.05. We did not find results for the functional enrichment of the KEGG terms and functions associated with molecular functions (MF) and cellular components (CC).

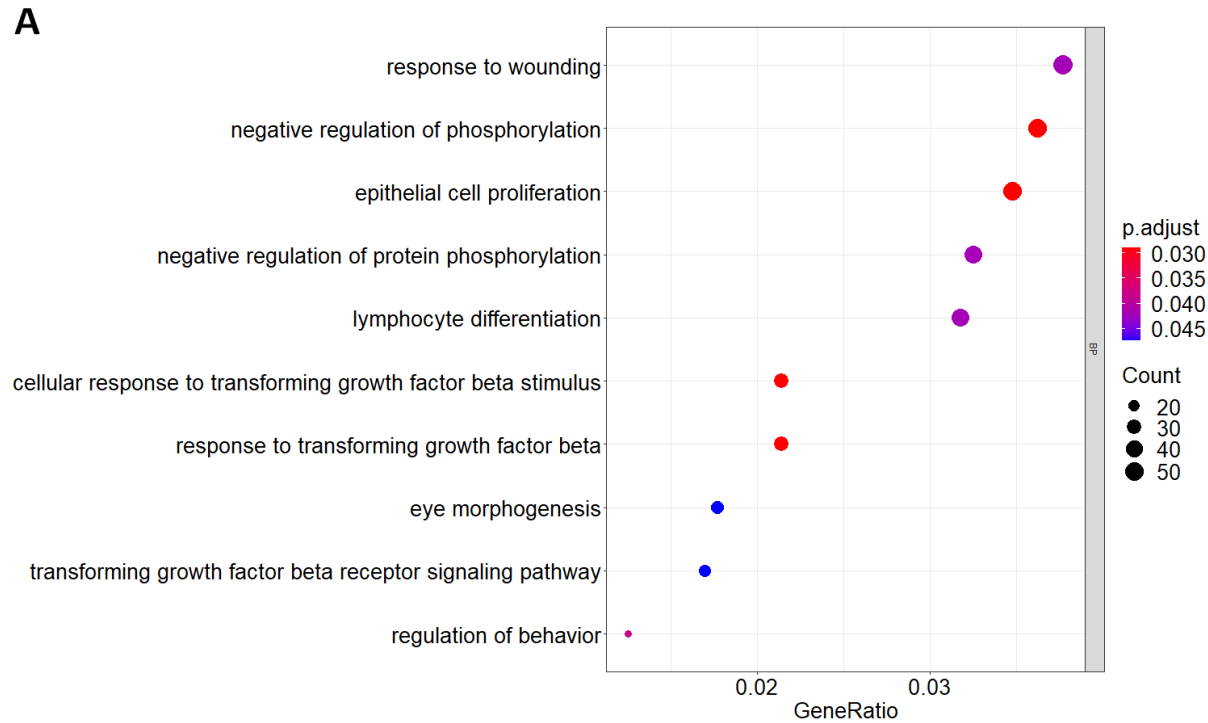


Figure S8. Functional enrichment analysis of pathways from the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) and Gene Ontology (GO) from the CCorGs in the midbrain. A – Bar plot with functional enrichment of KEGG terms. B – Dot plot with the functional enrichment of the GO terms and the functions associated with biological processes (BP), molecular functions (MF) and cellular components (CC), $p_{\text{adjust}} < 0.05$.

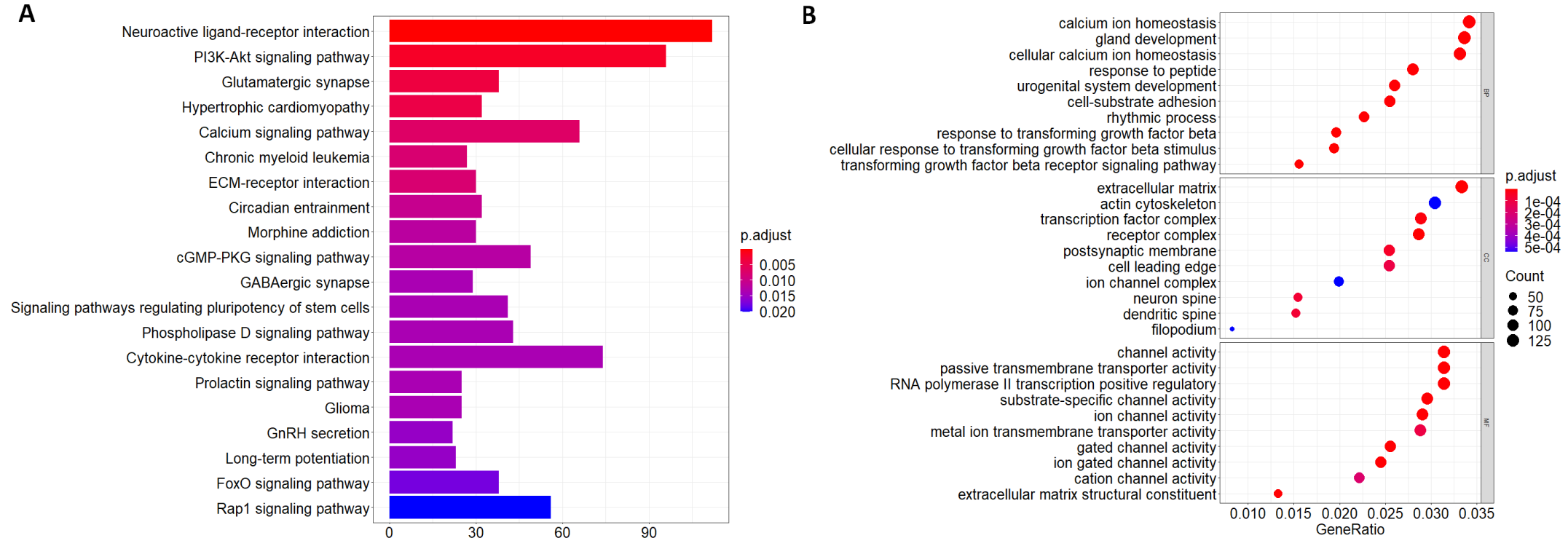


Figure S9. Functional enrichment analysis of pathways from the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) and Gene Ontology (GO) from the CCorGs in the olfactory areas. A – Bar plot with functional enrichment of KEGG terms. B – Dot plot with the functional enrichment of the GO terms and the functions associated with biological processes (BP), molecular functions (MF) and cellular components (CC), p. adjust<0.05.

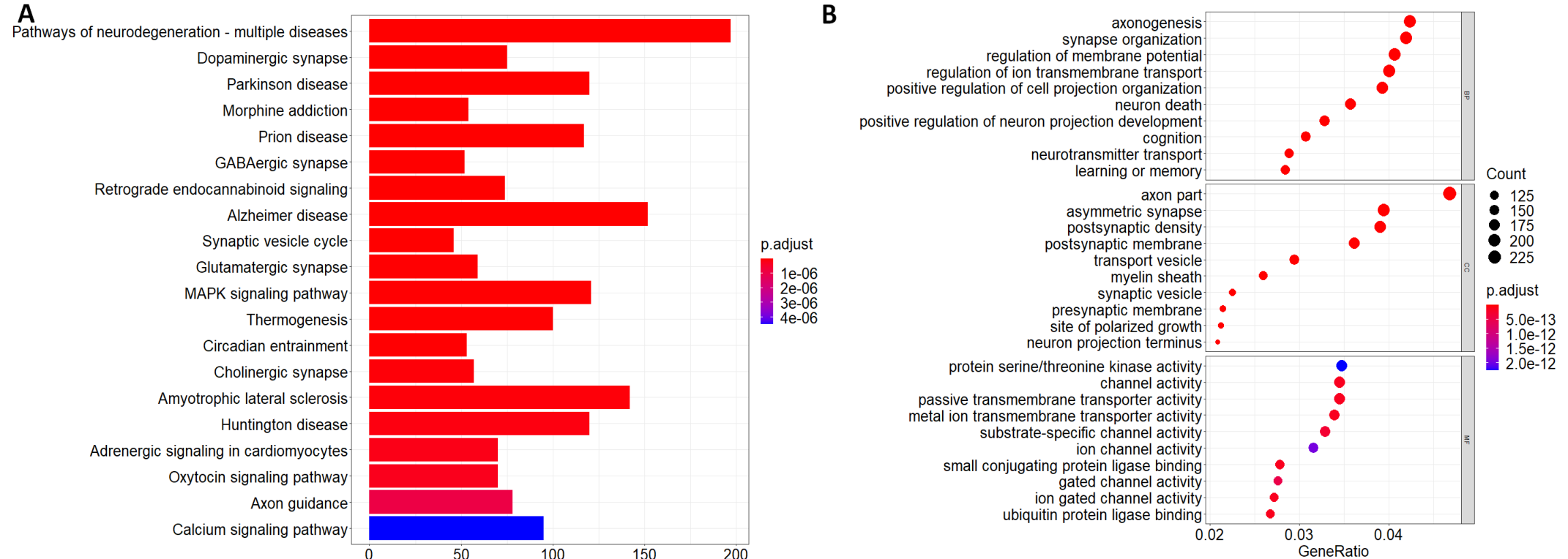


Figure S10. Functional enrichment analysis of pathways from the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) and Gene Ontology (GO) from the *CCorGs* in the pallidum. **A** – Bar plot with functional enrichment of KEGG terms. **B** – Dot plot with the functional enrichment of the GO terms and the functions associated with biological processes (BP), molecular functions (MF) and cellular components (CC), p. adjust<0.05.

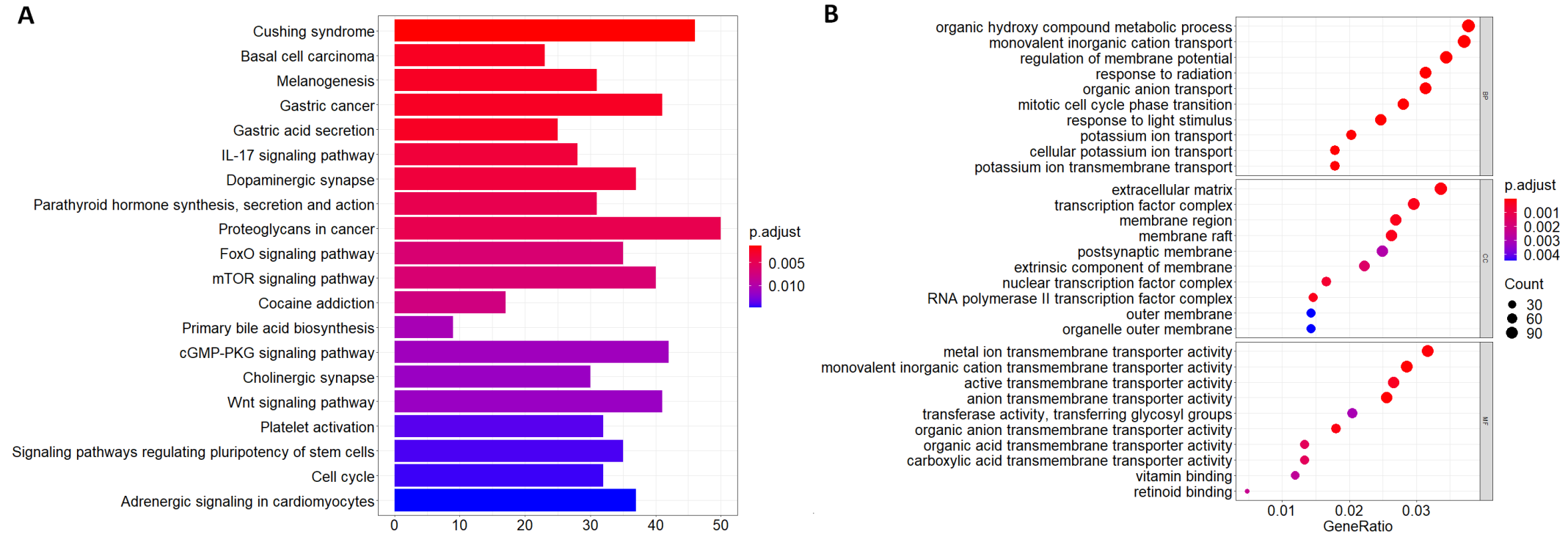


Figure S11. Functional enrichment analysis of pathways from the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) and Gene Ontology (GO) from the *CCorGs* in the pons. **A** – Bar plot with functional enrichment of KEGG terms. **B** – Dot plot with the functional enrichment of the GO terms and the functions associated with biological processes (BP), molecular functions (MF) and cellular components (CC), $p.adjust < 0.05$.

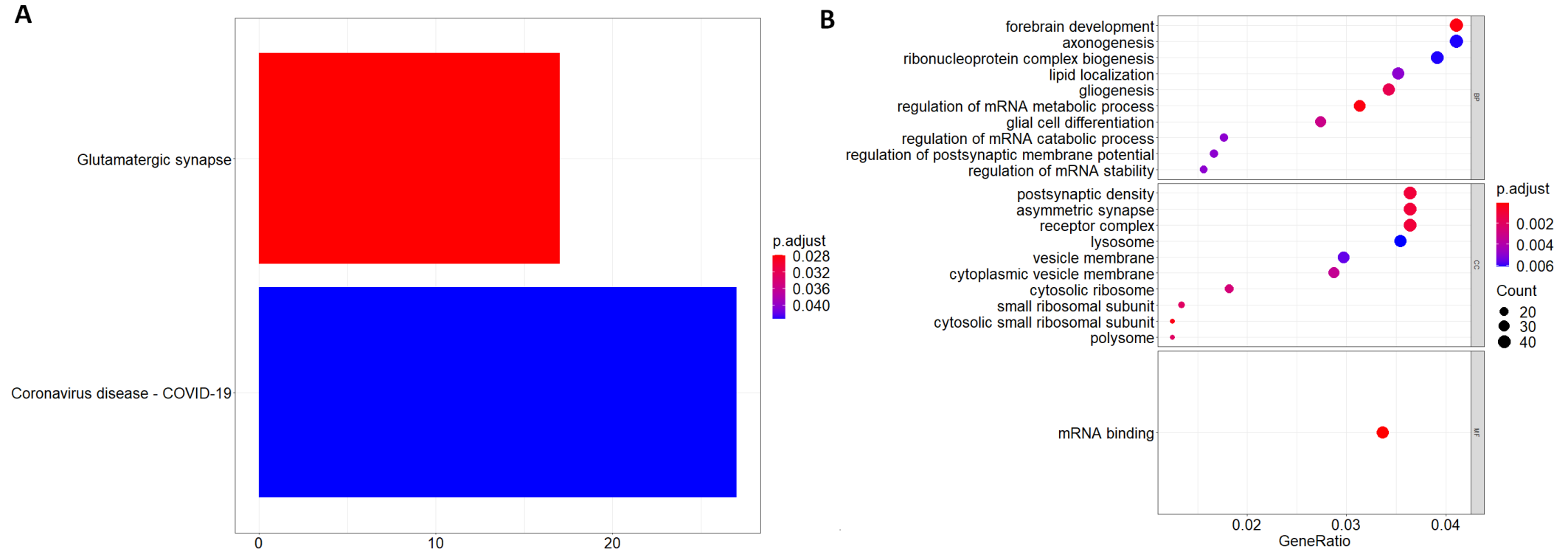


Figure S12. Functional enrichment analysis of pathways from the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) and Gene Ontology (GO) from the *CCorGs* in the striatum. A – Bar plot with functional enrichment of KEGG terms. B – Dot plot with the functional enrichment of the GO terms and the functions associated with biological processes (BP), molecular functions (MF) and cellular components (CC), p . adjust<0.05.

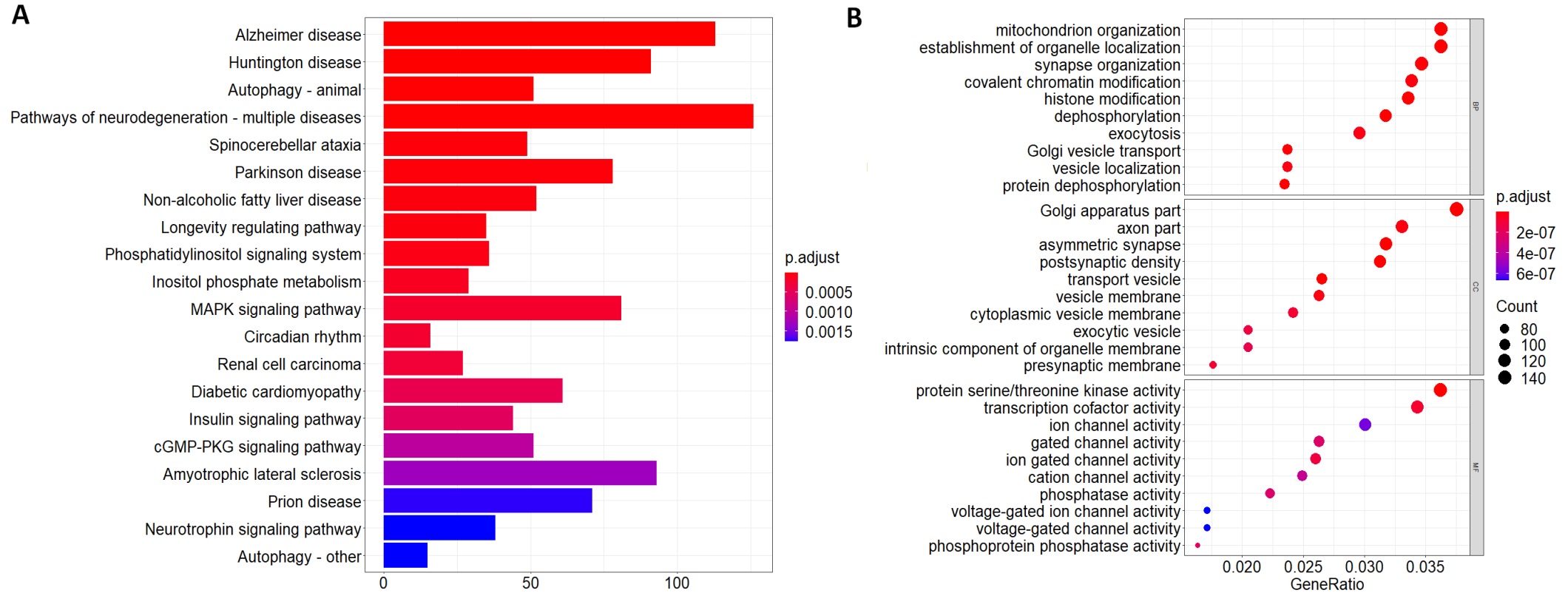


Figure S13. Functional enrichment analysis of pathways from the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) and Gene Ontology (GO) from the *CCorGs* in the thalamus. A – Bar plot with functional enrichment of KEGG terms. B – Dot plot with the functional enrichment of the GO terms and the functions associated with biological processes (BP), molecular functions (MF) and cellular components (CC), p. adjust<0.05.

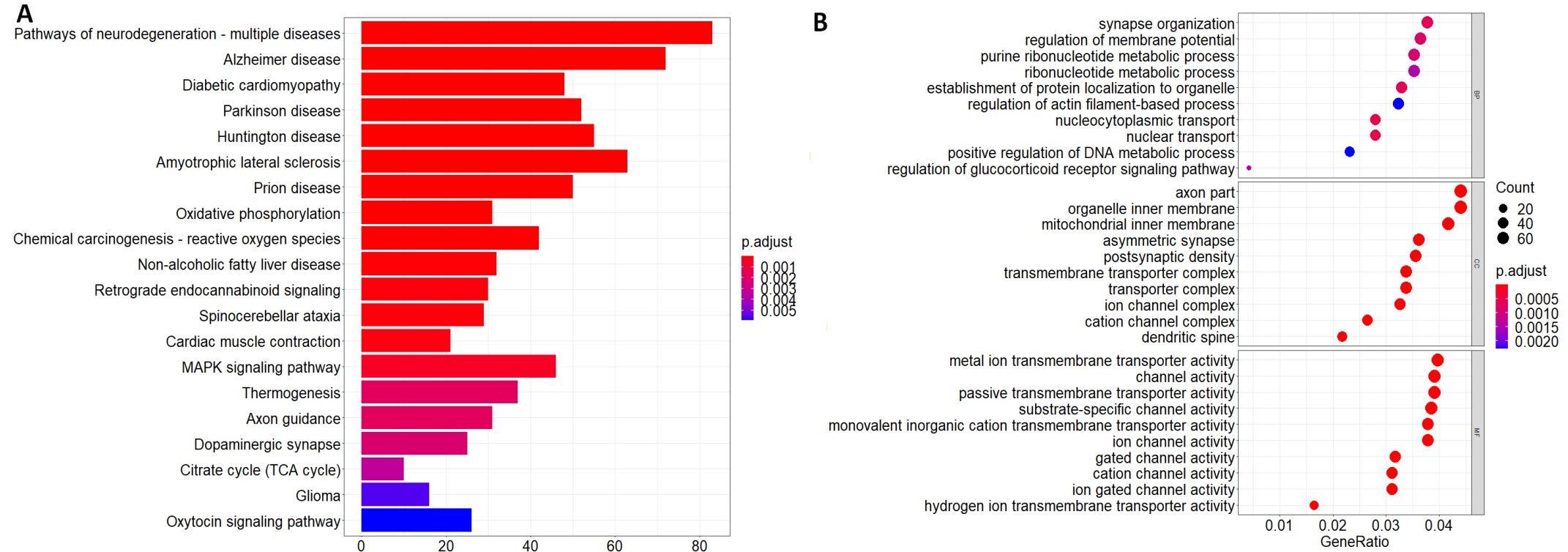


Figure S14. Heat map with *CCorGs* by tissue that encode targets of pharmacological drugs with a half-life of up to 12 hours and that acts on the central nervous system. Gene Ratio (ratio between the number of *CCorGs* targets by drug/number total of *CCorGs* by tissue).

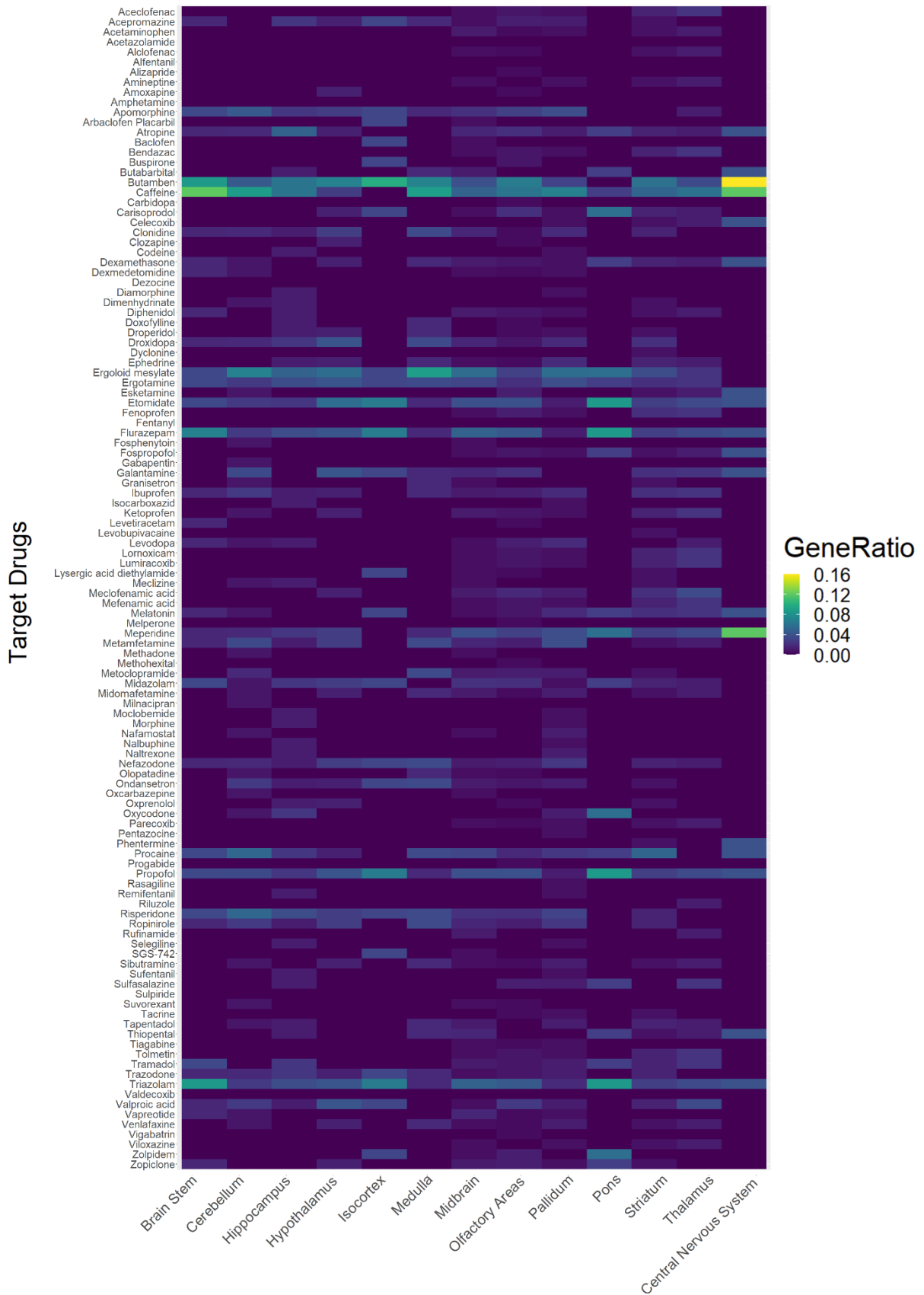
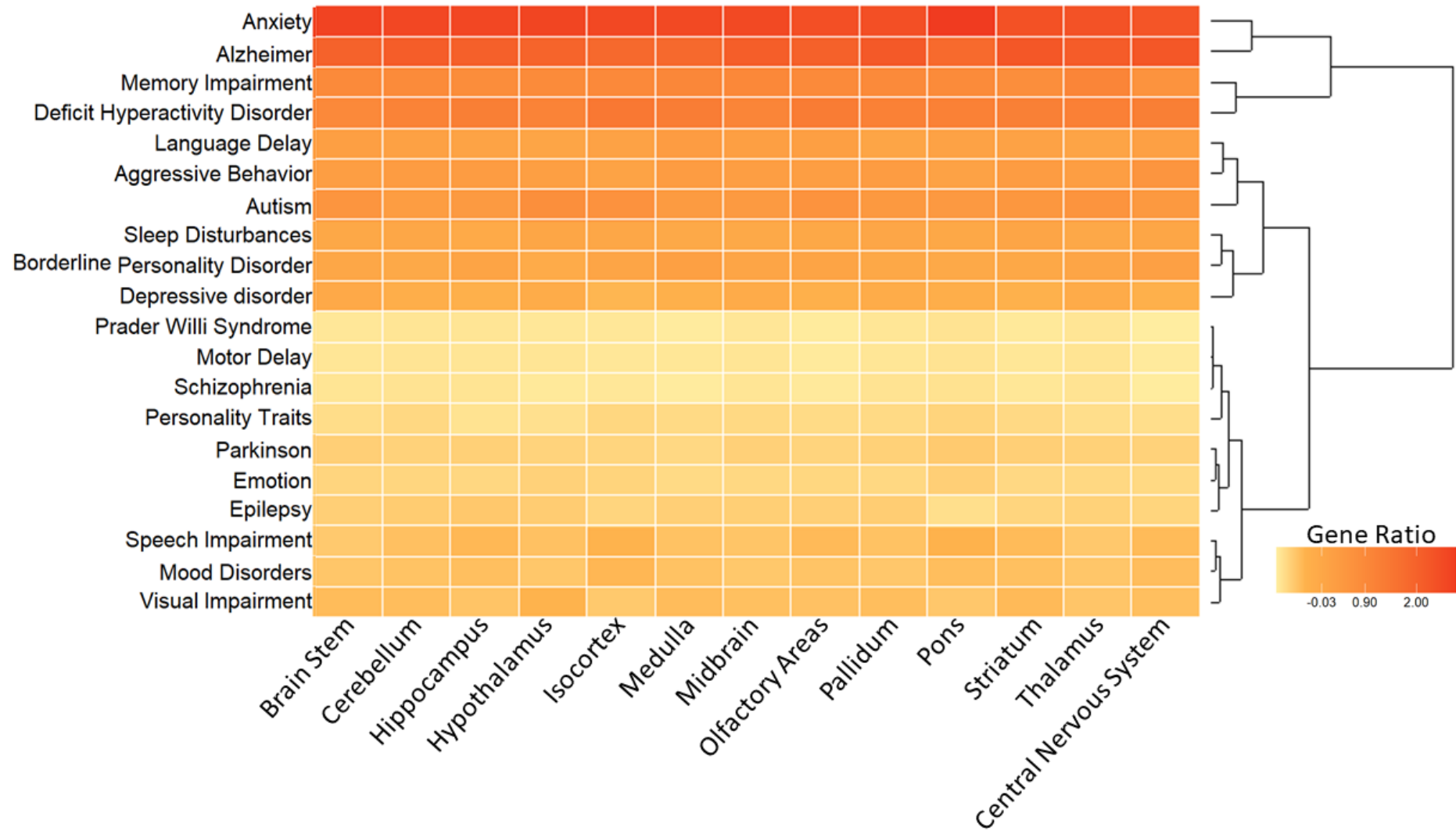


Figure S15. Heat map of *CCorGs* by tissue associated with neurodegenerative and behavioral disturbances. Gene Ratio (ratio between the number of *CCorGs* targets by disturbances/number of total of *CCorGs* by tissue).



13 Conclusões

- 1- Identificamos módulos de co-expressão significativamente correlacionados com genes circadianos e com funções importantes para os ritmos;
- 2- Grupos de genes correlacionados identificados em cerebelo, hipotálamo e tronco encefálico com alta correlação com os genes circadianos apresentaram maiores valores de amplitude relativa identificada previamente em estudos de análise de transcriptoma;
- 3- Este é o primeiro trabalho que utiliza a estratégia de biologia de sistemas e análise de co-expressão através do *WGCNA* para buscar genes com expressão circadiana e envolvimento com os ritmos em tecidos específicos do sistema nervoso central;
- 4- Foram identificados até o momento conjuntos de genes candidatos a fazer parte do sistema de temporização circadiana em tecidos específicos do sistema nervoso central de camundongos, alguns com comprovação experimental já publicada;
- 5- O enriquecimento funcional para os *CCorGS* mostrou processos biológicos, funções moleculares e componentes celulares associados com os ritmos;
- 6- Nós encontramos diversos *CCorGS* associados a diferentes distúrbios dos SNC;
- 7- Muitos dos *CCorGS* são alvos de drogas com ação no sistema nervoso central de humanos;
- 8- A estratégia utilizada tem potencial para identificar genes importantes para o ritmo circadiano em tecidos específicos do sistema nervoso central de mamíferos, sobrepujando limitações metodológicas consideradas em outros estudos;

14 Perspectivas

Para complementar nossas observações, estudos com análises de expressão gênica e ensaios funcionais são necessários para validar o envolvimento de *CCorGS* com os ritmos circadianos e ensaios farmacológicos prospectivos elaborados para testar o efeito do medicamento de acordo com a hora da administração são necessários para validar os alvos de drogas. Sobretudo, esperamos que, coletivamente, nossos resultados promovam informações que sirvam como base para pesquisas experimentais com modelos animais e estudos clínicos, e sobretudo, que seja um banco de dados útil para estudar o papel do tempo biológico e sua importância para a medicina circadiana.

15 Referências da Introdução e do Referencial Teórico

- ABBASSI-DALOII, Tooba et al. Recommendations for the analysis of gene expression data to identify intrinsic differences between similar tissues. **Genomics**, v. 112, n. 5, p. 3157-3165, 2020.
- ABE, M. et al. Circadian rhythms in isolated brain regions. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 22, n. 1, p. 350–356, 2002.
- ABRAHAMSON, Eric E.; MOORE, Robert Y. Suprachiasmatic nucleus in the mouse: retinal innervation, intrinsic organization and efferent projections. **Brain research**, v. 916, n. 1, p. 172-191, 2001.
- AGOSTINELLI, Forest et al. What time is it? Deep learning approaches for circadian rhythms. **Bioinformatics**, v. 32, n. 12, p. i8-i17, 2016.
- AKASHI, Makoto; TAKUMI, Toru. The orphan nuclear receptor ROR α regulates circadian transcription of the mammalian core-clock Bmal1. **Nature structural & molecular biology**, v. 12, n. 5, p. 441-448, 2005.
- ALBRECHT, Urs; EICHELE, Gregor. The mammalian circadian clock. **Current opinion in genetics & development**, v. 13, n. 3, p. 271-277, 2003.
- ALBRECHT, Urs. Timing to perfection: the biology of central and peripheral circadian clocks. **Neuron**, v. 74, n. 2, p. 246-260, 2012.
- ALMON, Richard R. et al. Relationships between circadian rhythms and modulation of gene expression by glucocorticoids in skeletal muscle. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 295, n. 4, p. R1031-R1047, 2008
- ANAFI, Ron C. et al. Machine learning helps identify CHRONO as a circadian clock component. **PLoS Biol**, v. 12, n. 4, p. e1001840, 2014.
- ASHER, Gad et al. Poly (ADP-ribose) polymerase 1 participates in the phase entrainment of circadian clocks to feeding. **Cell**, v. 142, n. 6, p. 943-953, 2010.
- BARGIELLO, Thaddeus A.; YOUNG, Michael W. Molecular genetics of a biological clock in Drosophila. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 81, n. 7, p. 2142-2146, 1984.
- BARGIELLO, Thaddeus A.; JACKSON, F. Rob; YOUNG, Michael W. Restoration of circadian behavioural rhythms by gene transfer in Drosophila. **Nature**, v. 312, n. 5996, p. 752-754, 1984.
- BELL-PEDERSEN, Deborah et al. Circadian rhythms from multiple oscillators: lessons from diverse organisms. **Nature Reviews Genetics**, v. 6, n. 7, p. 544-556, 2005.
- BHARGAVA, Anuprabha; HERZEL, Hanspeter; ANANTHASUBRAMANIAM, Bharath. Mining for novel candidate clock genes in the circadian regulatory network. **BMC systems biology**, v. 9, n. 1, p. 1, 2015.
- BOTBOL, Michel et al. Biological and psychological rhythms: An integrative approach to rhythm disturbances in autistic disorder. **Journal of Physiology-Paris**, v. 107, n. 4, p. 298-309, 2013.

BROOKS, Elisabeth; CANAL, Maria M. Development of circadian rhythms: Role of postnatal light environment. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 37, n. 4, p. 551-560, 2013.

BUHR, Ethan D.; TAKAHASHI, Joseph S. Molecular components of the mammalian circadian clock. In: **Circadian clocks**. Springer Berlin Heidelberg, 2013. p. 3-27.

BUHR, Ethan D. Molecular circadian rhythms in mammals: From angstroms to organisms. In: **Seminars in Cell & Developmental Biology**. 2021.

BUNGER, Maureen K. et al. Mop3 is an essential component of the master circadian pacemaker in mammals. **Cell**, v. 103, n. 7, p. 1009-1017, 2000.

BUTTGEREIT, Frank et al. Clocking in: chronobiology in rheumatoid arthritis. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 11, n. 6, p. 349-356, 2015.

CHIANG, C. K. et al. The Proteomic Landscape of the Suprachiasmatic Nucleus Clock Reveals Large-Scale Coordination of Key Biological Processes. **PLoS Genetics**, v. 10, n. 10, 2014.

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

CZEISLER, Charles A. et al. Stability, precision, and near-24-hour period of the human circadian pacemaker. **Science**, v. 284, n. 5423, p. 2177-2181, 1999.

DAMIOLA, Francesca et al. Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. **Genes & development**, v. 14, n. 23, p. 2950-2961, 2000.

DARDENTE, Hugues et al. Implication of the F-Box Protein FBXL21 in circadian pacemaker function in mammals. **PLoS One**, v. 3, n. 10, p. e3530, 2008.

DIBNER, Charna; SCHIBLER, Ueli; ALBRECHT, Urs. The mammalian circadian timing system: organization and coordination of central and peripheral clocks. **Annual review of physiology**, v. 72, p. 517-549, 2010.

DUDLEY, Carol A. et al. Altered patterns of sleep and behavioral adaptability in NPAS2-deficient mice. **Science**, v. 301, n. 5631, p. 379-383, 2003.

DUNLAP, Jay C. Molecular bases for circadian clocks. **Cell**, v. 96, n. 2, p. 271-290, 1999.

EISING, Else et al. Gene co-expression analysis identifies brain regions and cell types involved in migraine pathophysiology: a GWAS-based study using the Allen Human Brain Atlas. **Human genetics**, v. 135, n. 4, p. 425-439, 2016.

FANG, B. et al. Circadian enhancers coordinate multiple phases of rhythmic gene transcription in vivo. **Cell**, v. 159, n. 5, p. 1140-1152, 2014.

FARHADIAN, Mohammad et al. Weighted gene co-expression network analysis identifies modules and functionally enriched pathways in the lactation process. **Scientific reports**, v. 11, n. 1, p. 1-15, 2021.

FEILLET, Céline A. et al. Forebrain oscillators ticking with different clock hands. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 37, n. 2, p. 209-221, 2008.

FELTRIN, Arthur Sant'Anna et al. Assessment of complementarity of WGCNA and NERI results for identification of modules associated to schizophrenia spectrum disorders. **PLoS One**, v. 14, n. 1, p. e0210431, 2019.

FILICHKIN, Sergei A. et al. Global profiling of rice and poplar transcriptomes highlights key conserved circadian-controlled pathways and cis-regulatory modules. **PloS one**, v. 6, n. 6, p. e16907, 2011.

GIERA, Stefanie et al. The adhesion G protein-coupled receptor GPR56 is a cell-autonomous regulator of oligodendrocyte development. **Nature communications**, v. 6, n. 1, p. 1-12, 2015.

GLYNN, Earl F.; CHEN, Jie; MUSHEGIAN, Arcady R. Detecting periodic patterns in unevenly spaced gene expression time series using Lomb–Scargle periodograms. **Bioinformatics**, v. 22, n. 3, p. 310-316, 2006.

GUILDING, Clare, and HUGH D. Piggins. "Challenging the omnipotence of the suprachiasmatic timekeeper: are circadian oscillators present throughout the mammalian brain?." **European Journal of Neuroscience** 25.11 (2007): 3195-3216.

GRANADOS-FUENTES, Daniel et al. Olfactory bulb neurons express functional, entrainable circadian rhythms. **European Journal of Neuroscience**, v. 19, n. 4, p. 898-906, 2004.

GRIFFIN, Edmund A.; STAKNIS, David; WEITZ, Charles J. Light-independent role of CRY1 and CRY2 in the mammalian circadian clock. **Science**, v. 286, n. 5440, p. 768-771, 1999.

HAND, David J.; MANNILA, Heikki; SMYTH, Padhraic. **Principles of data mining**. MIT press, 2001.

HASTINGS, Michael H.; REDDY, Akhilesh B.; MAYWOOD, Elizabeth S. A clockwork web: circadian timing in brain and periphery, in health and disease. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 4, n. 8, p. 649-661, 2003.

HASTINGS, M. H. et al. Expression of clock gene products in the suprachiasmatic nucleus in relation to circadian behaviour. In: **Novartis Found Symp.** 2004. p. 203-217.

HAWRYLYCZ, Michael J. et al. An anatomically comprehensive atlas of the adult human brain transcriptome. **Nature**, v. 489, n. 7416, p. 391-399, 2012.

HERZOG, Erik D. Neurons and networks in daily rhythms. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 8, n. 10, p. 790-802, 2007.

HONMA, S. et al. Dec1 and Dec2 are regulators of the mammalian molecular clock. **Nature**, v. 419, n. 6909, p. 841–844, 2002.

HOGENESCH, John B.; UEDA, Hiroki R. Understanding systems-level properties: timely stories from the study of clocks. **Nature Reviews Genetics**, v. 12, n. 6, p. 407-416, 2011.

HUANG, Rong-Chi. The discoveries of molecular mechanisms for the circadian rhythm: The 2017 Nobel Prize in Physiology or Medicine. **Biomedical journal**, v. 41, n. 1, p. 5-8, 2018.

HUGHES, M. E. et al. Harmonics of Circadian Gene Transcription in Mammals. v. 5, n. 4, 2009.

HUGHES, Michael E.; HOGENESCH, John B.; KORNACKER, Karl. JTK_CYCLE: an efficient nonparametric algorithm for detecting rhythmic components in genome-scale data sets. **Journal of biological rhythms**, v. 25, n. 5, p. 372-380, 2010.

HUGHES, Michael E. et al. Guidelines for genome-scale analysis of biological rhythms. **Journal of biological rhythms**, v. 32, n. 5, p. 380-393, 2017.

HUTCHISON, Alan L. et al. Improved statistical methods enable greater sensitivity in rhythm detection for genome-wide data. **PLoS Comput Biol**, v. 11, n. 3, p. e1004094, 2015.

JIANG, Yuchao et al. CODEX2: full-spectrum copy number variation detection by high-throughput DNA sequencing. **Genome biology**, v. 19, n. 1, p. 1-13, 2018.

JONES, Allan R.; OVERLY, Caroline C.; SUNKIN, Susan M. The Allen brain atlas: 5 years and beyond. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 10, n. 11, p. 821-828, 2009.

KANEHISA, Minoru; GOTO, Susumu. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. **Nucleic acids research**, v. 28, n. 1, p. 27-30, 2000.

KAKATI, Tulika; KASHYAP, Hirak; BHATTACHARYYA, Dhruba K. THD-module extractor: an application for CEN module extraction and interesting gene identification for Alzheimer's disease. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 1-11, 2016..

KAKATI, Tulika et al. Comparison of methods for differential co-expression analysis for disease biomarker prediction. **Computers in biology and medicine**, v. 113, p. 103380, 2019.

KHAN, Sofia et al. Circadian rhythm and epilepsy. **The Lancet Neurology**, v. 17, n. 12, p. 1098-1108, 2018.

KO, Caroline H.; TAKAHASHI, Joseph S. Molecular components of the mammalian circadian clock. **Human molecular genetics**, v. 15, n. suppl 2, p. R271-R277, 2006.

KOIKE, N. et al. NIH Public Access. v. 338, n. 6105, p. 349-354, 2013.

KOJIMA, Shihoko; SHINGLE, Danielle L.; GREEN, Carla B. Post-transcriptional control of circadian rhythms. **Journal of cell science**, v. 124, n. 3, p. 311-320, 2011.

KOJIMA, Shihoko; GREEN, Carla B. Circadian genomics reveal a role for post-transcriptional regulation in mammals. **Biochemistry**, v. 54, n. 2, p. 124-133, 2014.

KONOPKA, Ronald J.; BENZER, Seymour. Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 68, n. 9, p. 2112-2116, 1971.

KUAN, Leonard et al. Neuroinformatics of the allen mouse brain connectivity atlas. **Methods**, v. 73, p. 4-17, 2015.

KUELLER, Rikard. The influence of light on circarhythms in humans. **Journal of physiological anthropology and applied human science**, v. 21, n. 2, p. 87-91, 2002.

LAING, Emma E. et al. Exploiting human and mouse transcriptomic data: Identification of circadian genes and pathways influencing health. **BioEssays**, v. 37, n. 5, p. 544-556, 2015.

LANGFELDER, Peter; HORVATH, Steve. WGCNA: an R package for weighted correlation network analysis. **BMC bioinformatics**, v. 9, n. 1, p. 1-13, 2008.

- LANGFELDER, Peter; ZHANG, Bin; HORVATH, Steve. Defining clusters from a hierarchical cluster tree: the Dynamic Tree Cut package for R. **Bioinformatics**, v. 24, n. 5, p. 719-720, 2008.
- LEHMANN, Robert et al. Assembly of a comprehensive regulatory network for the mammalian circadian clock: a bioinformatics approach. **PloS one**, v. 10, n. 5, p. e0126283, 2015.4
- LEIN, Ed S. et al. Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain. **Nature**, v. 445, n. 7124, p. 168-176, 2007.
- LEMMER, Björn. Discoveries of rhythms in human biological functions: a historical review. **Chronobiology international**, v. 26, n. 6, p. 1019-1068, 2009.
- LI, Dong et al. MODA: MOdule Differential Analysis for weighted gene co-expression network. **arXiv preprint arXiv:1605.04739**, 2016.
- LI, J. Z. et al. Circadian patterns of gene expression in the human brain and disruption in major depressive disorder. 2013.
- LITTLETON, Evan S. et al. Genome-wide correlation analysis to identify amplitude regulators of circadian transcriptome output. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 1-13, 2020.
- LITOVCHENKO, Maria et al. Extensive tissue-specific expression variation and novel regulators underlying circadian behavior. **Science Advances**, v. 7, n. 5, p. eabc3781, 2021.
- LOPES, Robson da Silva et al. Application of bioinformatics in chronobiology research. **The Scientific World Journal**, v. 2013, 2013.
- LOWREY, Phillip L.; TAKAHASHI, Joseph S. Mammalian circadian biology: elucidating genome-wide levels of temporal organization. **Annual review of genomics and human genetics**, v. 5, p. 407, 2004.
- LOWREY, Phillip L.; TAKAHASHI, Joseph S. Genetics of circadian rhythms in Mammalian model organisms. **Advances in genetics**, v. 74, p. 175, 2011.
- LU, Qingqing; KIM, Jin Young. Mammalian circadian networks mediated by the suprachiasmatic nucleus. **The FEBS Journal**, 2021.
- MAIER, Bert et al. A large-scale functional RNAi screen reveals a role for CK2 in the mammalian circadian clock. **Genes & Development**, v. 23, n. 6, p. 708-718, 2009.
- MALER, Thomas et al. The Drosophila per gene homologs are expressed in mammalian suprachiasmatic nucleus and heart as well as in molluscan eyes. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 184, n. 2, p. 1082-1087, 1992.
- MARET, Stéphanie et al. Homer1a is a core brain molecular correlate of sleep loss. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 50, p. 20090-20095, 2007.
- MARQUES, Nelson; BARRETO, Luiz Menna. **Cronobiologia: Princípios e Aplicações**. 3ed. Edusp. São Paulo, 2003. ISBN: 85-314-0400-2.
- MAUVOISIN, D. et al. Circadian clock-dependent and -independent rhythmic proteomes implement distinct diurnal functions in mouse liver. **Proceedings of the National Academy**

of Sciences of the United States of America, v. 111, n. 1, p. 167–72, 2014.

MAVROUDIS, Panteleimon D. et al. Daily variation of gene expression in diverse rat tissues. **PloS one**, v. 13, n. 5, p. e0197258, 2018.

MCGLINCY, Nicholas J. et al. Regulation of alternative splicing by the circadian clock and food related cues. **Genome biology**, v. 13, n. 6, p. 1-17, 2012.

MEI, Wenwen et al. Genome-wide circadian rhythm detection methods: systematic evaluations and practical guidelines. **Briefings in Bioinformatics**, 2020.

MENDOZA, Jorge; CHALLET, Etienne. Brain clocks: from the suprachiasmatic nuclei to a cerebral network. **The Neuroscientist**, v. 15, n. 5, p. 477-488, 2009.

MENDOZA, Jorge et al. The cerebellum harbors a circadian oscillator involved in food anticipation. **The Journal of Neuroscience**, v. 30, n. 5, p. 1894-1904, 2010.

MOHAWK, Jennifer A.; GREEN, Carla B.; TAKAHASHI, Joseph S. Central and peripheral circadian clocks in mammals. **Annual review of neuroscience**, v. 35, p. 445, 2012.

MOORE, Robert Y.; EICHLER, Victor B. Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. **Brain research**, 1972.

MORDEL, Jérôme et al. The output signal of Purkinje cells of the cerebellum and circadian rhythmicity. **PloS one**, v. 8, n. 3, p. e58457, 2013.

MURE, Ludovic S. et al. Diurnal transcriptome atlas of a primate across major neural and peripheral tissues. **Science**, v. 359, n. 6381, 2018.

NAMIHIRA, Masakazu et al. Daily variation and light responsiveness of mammalian clock gene, Clock and BMAL1, transcripts in the pineal body and different areas of brain in rats. **Neuroscience letters**, v. 267, n. 1, p. 69-72, 1999.

NAYAK, Renuka R. et al. Coexpression network based on natural variation in human gene expression reveals gene interactions and functions. **Genome research**, v. 19, n. 11, p. 1953-1962, 2009.

NEGI, Simarjeet K.; GUDA, Chittibabu. Global gene expression profiling of healthy human brain and its application in studying neurological disorders. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 897, 2017.

NIU, Xiaowei et al. Weighted gene co-expression network analysis identifies critical genes in the development of heart failure after acute myocardial infarction. **Frontiers in genetics**, v. 10, p. 1214, 2019.

PARTCH, Carrie L.; GREEN, Carla B.; TAKAHASHI, Joseph S. Molecular architecture of the mammalian circadian clock. **Trends in cell biology**, v. 24, n. 2, p. 90-99, 2014.

PEREIRA, Danyella Silva; TUFIK, Sergio; PEDRAZZOLI, Mario. Moléculas que marcam o tempo: implicações para os fenótipos circadianos Timekeeping molecules: implications for circadian phenotypes. **Rev Bras Psiquiatr**, v. 31, n. 1, p. 63-71, 2009.

- PREITNER, N. et al. Orphan nuclear receptors, molecular clockwork, and the entrainment of peripheral oscillators. **Novartis Found Symp**, v. 253, p. 89-99; discussion 99-109, 2003.
- PREITNER, N. et al. The orphan nuclear receptor REV-ERB α controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. **Cell**, v. 110, n. 2, p. 251-60, Jul 26. 2002.
- RATH, Martin F.; ROHDE, Kristian; MØLLER, Morten. Circadian oscillations of molecular clock components in the cerebellar cortex of the rat. **Chronobiology international**, v. 29, n. 10, p. 1289-1299, 2012.
- REDDY, A. B. et al. Circadian orchestration of the hepatic proteome. **Curr Biol**, v. 16, n. 11, p. 1107-15, Jun 6. 2006.
- REFINETTI, R.; KAUFMAN, C. M.; MENAKER, M. Complete suprachiasmatic lesions eliminate circadian rhythmicity of body temperature and locomotor activity in golden hamsters. **Journal of Comparative Physiology A**, v. 175, n. 2, p. 223-232, 1994.
- REICK, Martin et al. NPAS2: an analog of clock operative in the mammalian forebrain. **Science**, v. 293, n. 5529, p. 506-509, 2001.
- RICHTER, Curt P. Biological clocks in medicine and psychiatry: shock-phase hypothesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 46, n. 11, p. 1506, 1960.
- RIQUELME MEDINA, Ignacio; LUBOVAC-PILAV, Zelmina. Gene co-expression network analysis for identifying modules and functionally enriched pathways in type 1 diabetes. **PloS one**, v. 11, n. 6, p. e0156006, 2016.
- ROBLES, M. S.; COX, J.; MANN, M. In-Vivo Quantitative Proteomics Reveals a Key Contribution of Post-Transcriptional Mechanisms to the Circadian Regulation of Liver Metabolism. **PLoS Genetics**, v. 10, n. 1, 2014.
- ROSSNER, Moritz J. et al. Disturbed clockwork resetting in Sharp-1 and Sharp-2 single and double mutant mice. **PLoS One**, v. 3, n. 7, p. e2762, 2008.
- RUBEN, Marc D. et al. A database of tissue-specific rhythmically expressed human genes has potential applications in circadian medicine. **Science Translational Medicine**, v. 10, n. 458, 2018.
- 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. 527–537, 2004.
- SEGRS, Anneleen; DEPOORTERE, Inge. Circadian clocks in the digestive system. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, p. 1-13, 2021.
- SERIN, Elise AR et al. Learning from co-expression networks: possibilities and challenges. **Frontiers in plant science**, v. 7, p. 444, 2016.
- SHANNON, Paul et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. **Genome research**, v. 13, n. 11, p. 2498-2504, 2003.
- SHEARMAN, Lauren P. et al. Interacting molecular loops in the mammalian circadian clock. **Science**, v. 288, n. 5468, p. 1013-1019, 2000.

SHEN, Elaine H.; OVERLY, Caroline C.; JONES, Allan R. The Allen Human Brain Atlas: comprehensive gene expression mapping of the human brain. **Trends in neurosciences**, v. 35, n. 12, p. 711-714, 2012.

SIEPKA, Sandra M. et al. Circadian mutant Overtime reveals F-box protein FBXL3 regulation of cryptochrome and period gene expression. **Cell**, v. 129, n. 5, p. 1011-1023, 2007.

STEPHAN, Friedrich K.; ZUCKER, Irving. Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 69, n. 6, p. 1583-1586, 1972.

SUNKIN, Susan M. et al. Allen Brain Atlas: an integrated spatio-temporal portal for exploring the central nervous system. **Nucleic acids research**, p. gks1042, 2012.

SZKLARCZYK, Damian et al. STRING v10: protein–protein interaction networks, integrated over the tree of life. **Nucleic acids research**, p. gku1003, 2014.

TAKUMI, T. et al. A new mammalian period gene predominantly expressed in the suprachiasmatic nucleus. **Genes to Cells**, v. 3, n. 3, p. 167–176, 1998.

TAKAHASHI, Joseph S. et al. The genetics of mammalian circadian order and disorder: implications for physiology and disease. **Nature Reviews Genetics**, v. 9, n. 10, p. 764-775, 2008.

TAKAHASHI, J. S. Molecular components of the circadian clock in mammals. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 17, n. S1, p. 6-11, 2015.

TAKAHASHI, Joseph S. Transcriptional architecture of the mammalian circadian clock. **Nature Reviews Genetics**, v. 18, n. 3, p. 164, 2017.

TEI, Hajime et al. Circadian oscillation of a mammalian homologue of the Drosophila period gene. **Nature**, v. 389, n. 6650, p. 512-516, 1997.

TESSON, Bruno M.; BREITLING, Rainer; JANSEN, Ritsert C. DiffCoEx: a simple and sensitive method to find differentially coexpressed gene modules. **BMC bioinformatics**, v. 11, n. 1, p. 1-9, 2010.

THABEN, Paul F.; WESTERMARK, Pål O. Detecting rhythms in time series with RAIN. **Journal of biological rhythms**, v. 29, n. 6, p. 391-400, 2014.

TRIQUENEAUX, Gérard et al. The orphan receptor Rev-erb α gene is a target of the circadian clock pacemaker. **Journal of molecular endocrinology**, v. 33, n. 3, p. 585-608, 2004.

TOSINI, Gianluca et al. The circadian clock system in the mammalian retina. **Bioessays**, v. 30, n. 7, p. 624-633, 2008.

WATSON, Michael. CoXpress: differential co-expression in gene expression data. **BMC bioinformatics**, v. 7, n. 1, p. 1-12, 2006.

WEBER, Frank et al. Second messenger and Ras/MAPK signalling pathways regulate CLOCK/CYCLE-dependent transcription. **Journal of neurochemistry**, v. 98, n. 1, p. 248-257, 2006.

- WELSH, David K.; TAKAHASHI, Joseph S.; KAY, Steve A. Suprachiasmatic nucleus: cell autonomy and network properties. **Annual review of physiology**, v. 72, p. 551, 2010.
- WU, Gang et al. MetaCycle: an integrated R package to evaluate periodicity in large scale data. **Bioinformatics**, v. 32, n. 21, p. 3351-3353, 2016.
- WU, Gang et al. Genome-wide studies of time of day in the brain: Design and analysis. **Brain Science Advances**, v. 6, n. 2, p. 92-105, 2020.
- VAN DAM, Sipko et al. Gene co-expression analysis for functional classification and gene–disease predictions. **Briefings in bioinformatics**, v. 19, n. 4, p. 575-592, 2018.
- VAN DER HORST, G. T. et al. Mammalian Cry1 and Cry2 are essential for maintenance of circadian rhythms. **Nature**, v. 398, n. 6728, p. 627–30, 1999.
- VIDENOVIC, Aleksandar et al. 'The clocks that time us'[mdash] circadian rhythms in neurodegenerative disorders. **Nature Reviews Neurology**, v. 10, n. 12, p. 683-693, 2014.
- VITATERNA, Martha Hotz et al. Mutagenesis and mapping of a mouse gene, Clock, essential for circadian behavior. **Science (New York, NY)**, v. 264, n. 5159, p. 719, 1994.
- XU, Hao-jie et al. Identification of hub genes correlated with sleep deprivation using co-expression analysis. **Sleep and Breathing**, p. 1-8, 2021.
- YANG, Rendong; SU, Zhen. Analyzing circadian expression data by harmonic regression based on autoregressive spectral estimation. **Bioinformatics**, v. 26, n. 12, p. i168-i174, 2010.
- YAMAZAKI, Shin et al. Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. **Science**, v. 288, n. 5466, p. 682-685, 2000.
- YIP, Andy M.; HORVATH, Steve. Gene network interconnectedness and the generalized topological overlap measure. **BMC bioinformatics**, v. 8, n. 1, p. 1-14, 2007.
- ZHANG, E. E. et al. A Genome-wide RNAi Screen for Modifiers of the Circadian Clock in Human Cells. **Cell**, v. 139, n. 1, p. 199–210, 2009.
- ZHANG, R. et al. A circadian gene expression atlas in mammals : Implications for biology and medicine. n. 642, 2014.