

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

HELOISA DE CARVALHO MATOS

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO CIRCADIANA DE GENES ENVOLVIDOS COM
CÂNCER EM LEUCÓCITOS NORMAIS ISOLADOS DE SANGUE
PERIFÉRICO HUMANO**

Maceió - AL
2014

HELOISA DE CARVALHO MATOS

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO CIRCADIANA DE GENES ENVOLVIDOS COM
CÂNCER EM LEUCÓCITOS NORMAIS ISOLADOS DE SANGUE
PERIFÉRICO HUMANO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Tiago Gomes de Andrade

Co-orientador: Prof. Dr. Renato Santos Rodarte

Maceió - AL

2014

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecário Responsável: Valter dos Santos Andrade

M433a Matos, Heloisa de Carvalho.
Análise da expressão circadiana de genes envolvidos com câncer em leucócitos normais isolados de sangue periférico humano / Heloisa de Carvalho Matos. – 2014.
84 f. : il.; grafs.; tabs.

. Orientador: Tiago Gomes de Andrade.
Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Maceió, 2014.

Bibliografias: f. 65-74.
Glossário: f. 75-76.
Anexos: f. 77-84.

1. Ritmo circadiano. 2. Genes - Análise. 3. Leucócitos . 4. Pcr Array.
5. Câncer . I. Título.

CDU: 577.31

Folha de Aprovação

Heloisa de Carvalho Matos

Análise da expressão circadiana de genes envolvidos com câncer em leucócitos isolados de sangue periférico humano

Dissertação submetida ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas e aprovada em 29 de setembro de 2014.

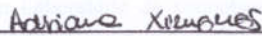


Prof. Dr. Hugo Gomes de Andrade (Orientador)

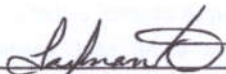
Banca Examinadora



Prof. Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra – (UFPE)



Prof.ª Dr.ª Adriana Ximenes da Silva – (UFAL)



Prof.ª Dr.ª Salete Smaniotto - (UFAL)

Agradecimentos

Gostaria de agradecer primeiro a Deus, que me deu forças para encarar essa jornada...

Agradeço aos meus pais Aloísio e Maria José, que sempre me ensinaram a dar valor aos estudos e me incentivaram a dar continuidade ao meu trabalho mesmo nos momentos mais difíceis.

Aos meus irmãos, Marília e Fernando que torcem sempre por mim e que me orgulham por serem tão dedicados em suas profissões.

Aos meus avós maternos Corália (*in memoriam*) e Sebastião que cuidaram da gente com todo amor do mundo. Em especial à minha avó, com quem convivi mais nos últimos meses antes de seu falecimento, e que me mostrou quão é importante estar sempre perto da família;

Aos meus avós paternos Flávio (*in memoriam*) e Marizete, que mesmo de longe sempre estiveram torcendo por nós;

À Priscila, que mesmo de longe esteve sempre pronta para me ajudar e me ouvir quando precisei de ajuda, pela força e incentivo;

À Aline, pelo apoio e incentivo;

Ao meu orientador, professor Tiago Gomes de Andrade, que aceitou o desafio de me orientar. Agradeço pela paciência e dedicação;

Ao professor Renato Rodarte, que desde a minha iniciação científica está comigo me incentivando, me motivando, “puxando minha orelha” quando necessário e que verdadeiramente se tornou um amigo com quem eu sempre poderei contar;

Ao Diego, que me ajudou durante toda a execução do projeto, análises dos resultados e apresentação;

À Mayara, que se tornou uma pessoa muito especial pra mim nessa mudança pra Arapiraca;

A todos do Laboratório de Cronobiologia Molecular (UFAL/Arapiraca) que me ajudaram e me deram forças;

Agradeço de todo o coração às pessoas que se tornaram especiais pra mim, Thalita, Tayhana, João, Bruna, Maísa, Wanessa, Evelin e Myka, vocês sempre estarão no meu coração;

A todos que fazem parte do Laboratório de Biologia Celular e Molecular que me ajudaram e se preocuparam comigo;

À Laís e a Leila, que desde a graduação estão me acompanhando e seguindo o mesmo caminho, mesmo de longe o carinho que sinto é muito grande;

Agradeço a todos os professores da banca de qualificação e de defesa, Salete, Magna, Adriana e Marcos, pela contribuição dada, sempre muito importante para o desenvolvimento do nosso trabalho;

Agradeço à UFAL e ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde pela oportunidade de desenvolver a pesquisa;

Agradeço à CAPES e FAPEAL por ter disponibilizado à bolsa que custeou minhas despesas.

RESUMO

O termo ritmo circadiano deriva do latim que significa “cerca de um dia” e descreve oscilações endógenas que ocorrem nos organismos ao longo do dia, com período de aproximadamente 24h. Estas variações rítmicas estão presentes em diferentes tecidos. Alterações nos ritmos circadianos podem acarretar diversas patologias, como o câncer. Embora os ritmos circadianos e o controle do ciclo celular estejam estreitamente relacionados, existem poucos estudos sobre os genes que poderiam participar das vias moleculares que conectam estes processos. Este trabalho teve como principal objetivo identificar genes previamente envolvidos com o câncer que apresentem expressão circadiana em leucócitos normais isolados de sangue periférico humano. As coletas foram realizadas ao longo do 24 horas com intervalos de 4 horas. Além disso, foi realizada uma validação da expressão circadiana de genes selecionados em um conjunto ampliado de amostras. As análises foram realizadas através da técnica de RT-qPCR utilizando placas de *PCR Array (RT² ProfilerTM PCR Array Human Cancer Pathway Finder)*. A análise de estabilidade realizada com seis genes de referência do software *geNorm* determinou que a melhor dupla para normalização foi a dos genes *Gapdh* e *Rpl13a*, no entanto, 4 dos 6 genes de referência analisados apresentaram variação temporal. Desta forma, as normalizações foram realizadas com os genes *Rpl13a* e *B2m*. Estes dados sobre a estabilidade de genes de referência sugerem que utilizar apenas o *geNorm* pode comprometer a análise do perfil de expressão na pesquisa de ritmos circadianos. Após a normalização com esses genes, os resultados do *Pcr Array* demonstraram que 13 (15,5%) dos 84 genes, classificados com diferentes funções, apresentaram variações diárias em sua expressão: *Bad, Casp8, Cflar, Fas, Htatip2, Itga1, Mmp9, Plaur, Nme1, Pdgfa, Rb1, Tnf* e *Tp53*. Além disso, pudemos observar que 7 deles apresentaram um pico de expressão durante a fase noturna e 6 apresentaram durante a fase diurna. O perfil de expressão de alguns destes genes mostram uma possível relevância funcional. Dos treze genes que apresentaram variação, três (*Casp8, Mmp9* e *Htatip2*) foram selecionados para validação da expressão ao longo do dia, utilizando uma amostra ampliada de indivíduos. Os resultados indicaram que os genes *Htatip2* e *Mmp9* apresentaram variação significativa nas análises. Entretanto, não foi possível confirmar o padrão de variação de *Casp8*. Acreditamos que os dados apresentados são originais e podem contribuir para uma melhor compreensão das vias que regulam a hematopoese no seu contexto normal e alterado, além de sua potencial contribuição para o diagnóstico e terapias cronofarmacológicas.

Palavras-chave: Ritmo circadiano. Leucócitos. *Pcr Array*. Câncer. *Mmp9*. *Htatip2*.

ABSTRACT

The term circadian rhythm derives from the latin meaning “about a day” and describes endogenous oscillations that occur in organisms through the day with a period of approximately 24 hours. These rhythmic variations are present in different tissues. Modifications in circadian rhythms can cause various diseases such as cancer. Although circadian rhythms and cell cycle control are closely related, there are few known genes that could participate in the molecular pathways that connect these processes. This study aimed to identify genes involved in cancer previously showing circadian expression. In normal leukocytes isolated from human peripheral blood. Samples were collected over 24 hours with intervals of four hours. Analyses were performed by RT-qPCR using PCR Array plates (RT2 PCR Array Profiler™ Human Cancer Pathway Finder). The stability analysis performed with six reference genes by geNorm software determined the best pair for normalization were *Rpl13a* and *Gapdh*. However, four of the six analyzed genes showed temporal variation. Thus, normalizations were performed with *Rpl13a* and *B2m* genes. These stability data of reference genes suggest that use only a single program may compromise the analysis of the expression profile in the research circadian rhythms. After normalization with these genes, the PCR Array results showed that 13 (15,5%) of the 84 genes exhibited daily variations in their expression.: *Bad*, *Casp8*, *Cflar*, *Fas*, *Htatip2*, *Itga1*, *Mmp9*, *Plaur*, *Nme1*, *Pdgfa*, *Rb1*, *Tnf* and *Tp53*. Furthermore, we observed that seven had a peak of expression. During the night phase and six presented during the diurnal phase. The expression profile of these genes show a possible functional significance. Of the thirteen genes showed variation, three (*Casp8*, *Htatip2* and *Mmp9*) were selected for validation of expression. Through the day utilizing an expanded sample of individuals. The results indicated that *Htatip2* and *Mmp9* genes exhibited significant variation in the analyzes. However, it was not possible to confirm the pattern of variation in *Casp8*. We believe that the data presented are original and can contribute to a better understanding of the pathways regulating hematopoiesis in normal and altered context, and its potential contribution to the diagnosis and chronopharmacological therapies.

Keywords: Circadian rhythms. Leukocytes. PCR Array. Cancer. *Mmp9*. *Htatip2*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Representação do oscilador central e alguns osciladores periféricos humanos	15
Figura 2 -	Representação do relógio molecular circadiano de mamíferos.....	18
Figura 3 -	RNAs extraídos de leucócito através do Kit <i>miRNeasy</i>	29
Figura 4 -	Análise de estabilidade dos genes de referência para a normalização dos genes da placa de <i>PCR Array</i> , utilizando software <i>geNorm</i>	36
Figura 5 -	Análise de variações diárias dos genes de referência através do teste de cosinor	37
Figura 6 -	Análise de variações diárias dos genes do relógio <i>Per3</i> através do teste de cosinor e anova normalizado com <i>Rpl13a</i> e <i>B2m</i>	38
Figura 7 -	Análise de variações diárias dos genes do relógio <i>Per3</i> através do teste de cosinor e anova normalizado com <i>Rpl13a</i> e <i>Gapdh</i>	39
Figura 8 -	Análise por <i>PCR Array</i> do perfil de expressão diária dos genes com cosinor positivo em leucócitos totais obtidos do sujeito S5.....	42
Figura 9 -	Perfil de expressão dos genes de acordo com sua função.....	45
Figura 10 -	Análise do perfil de expressão diária do gene <i>Mmp9</i> em leucócito total	47
Figura 11 -	Análise do perfil de expressão diária do gene <i>Htatip2</i> em leucócito total.....	48
Figura 12 -	Análise do perfil de expressão diária do gene <i>Casp8</i> em leucócito total	49

Figura 13 -	Análise do perfil de expressão diária dos genes em leucócitos totais de 6 sujeitos através do teste cosinor. Média do <i>fold change</i> de todos os sujeitos para cada gene	50
Figura 14 -	Análise do perfil de expressão diária dos genes em leucócitos totais através do teste cosinor. Média do <i>fold change</i> dos sujeitos agrupados por fase (dia/noite)	51
Figura 15 -	Variações diárias dos genes em amostras de leucócitos totais de 6 sujeitos analisada por ANOVA	52
Figura 16 -	Variações diárias dos genes em amostras de leucócitos totais dos sujeitos analisada por ANOVA. Média do <i>fold change</i> dos sujeitos agrupados por fase (dia/noite)	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Leucograma dos sujeitos incluídos na pesquisa.....	26
Tabela 2 - Sequência dos iniciadores utilizados para análise de estabilidade de genes de referência e validação dos ensaios de PCR <i>Array</i>	33
Tabela 3 - Eficiência de amplificação das reações de RT- <i>q</i> PCR referentes aos genes analisados.....	35
Tabela 4 - Resultados do controle da transcrição reversa.....	40
Tabela 5 - Análise descritiva dos dados de expressão dos genes com cosinor significativo.....	43
Tabela 6 - Classificação dos genes da placa de PCR <i>Array</i> de acordo com sua função.....	44

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 Ritmo Circadiano	13
2.2 Componentes moleculares do relógio circadiano.....	16
2.3 Ritmo Circadiano em células sanguíneas.....	19
2.4 Ritmo Circadiano e Câncer	21
3 OBJETIVOS.....	24
3.1 Objetivo Geral.....	24
3.2 Objetivos específicos	24
4. MATERIAIS E MÉTODOS	25
4.2 Extração de RNAm de Sangue Periférico com o kit <i>miRNeasy</i>	26
4.3 Quantificação e análise da integridade do RNA.....	27
4.4 Síntese de cDNA com <i>RT² First Strand Kit</i>	29
4.5 Análise de Estabilidade de Genes de Referência	30
4.6 <i>RT² ProfilerTM PCR Array Human Cancer Pathway Finder</i>	31
4.7 Validação dos genes selecionados a partir dos ensaios de <i>PCR Array</i>	33
4.8 Análise de eficiência de amplificação dos iniciadores	33
4.9 Análises Estatísticas	35
5. RESULTADOS.....	36
5.1 Análise da estabilidade de expressão dos genes de referência.....	36
5.2 Análise de variações diárias de <i>Per3</i>	37
5.3 Controles do <i>PCR Array</i>	39
5.4 Análise das variações diárias na expressão dos genes do <i>PCR Array</i>	40
5.5 Validação de genes selecionados a partir do teste cosinor	46
6 DISCUSSÃO	54
6.1 Análise de estabilidade dos genes de referência	55
6.2 Análise das variações diárias na expressão de genes envolvidos com câncer	57
7. CONCLUSÕES	63
REFERÊNCIAS	64
GLOSSÁRIO	74
ANEXOS.....	75

1 INTRODUÇÃO

Nos seres humanos e em outras espécies animais, muitos aspectos fisiológicos e comportamentais são expressos através de uma ritmicidade diária, compreendendo os ritmos circadianos com duração aproximada de 24h e que são controlados por osciladores biológicos autossustentáveis. Esses ritmos são capazes de controlar o comportamento alimentar, ciclos de sono-vigília, níveis hormonais e temperatura corporal, dentre outros processos. A luz é o principal fator de entrada (*zeitgeber*) ambiental regulador dessas alterações rítmicas (TAKAHASHI *et al.*, 2008).

Em humanos, as perturbações no sistema circadiano podem ser causadas por diversos fatores como: alterações nos turnos de trabalho, mudanças de fusos horários e estresse. Além disso, alterações nos genes que estão envolvidos na maquinaria do relógio, ou que são controlados por esse sistema, também são fatores que podem favorecer o desenvolvimento de doenças como síndromes metabólicas (obesidade, diabetes), problemas cardiovasculares e distúrbios neurológicos, além de tornar o indivíduo mais susceptível ao câncer (HASTINGS, REDDY e MAYWOOD, 2003). Existe uma relação entre desregulação do ritmo circadiano e o desenvolvimento de diferentes tipos de cânceres em seres humanos. Em nível celular, as alterações na homeostasia do sistema circadiano causadas por mutações em determinados genes do relógio podem resultar em alterações na proliferação celular, danos ao DNA e no metabolismo. Diferentes CCGs (*clock controlled genes*) também podem participar no metabolismo e homeostase celular, e estão envolvidos na regulação do ciclo celular e em processos carcinogênicos (PANDA *et al.*, 2002).

Diversos genes envolvidos no ciclo celular são regulados pelos relógios circadianos e, por isso, alterações no ritmo circadiano podem gerar erros no processo de divisão celular, levando ao surgimento de alterações gênicas ou a um estímulo da proliferação celular. Esse fator pode ser um ponto crítico no surgimento do câncer (RANA *et al.*, 2014).

Sabe-se que quase todas as células do corpo apresentam variações rítmicas de suas funções, incluindo as células sanguíneas. Para entender como

funciona a dinâmica que ocorre nessas células de maneira rítmica, é necessário que sejam avaliados parâmetros moleculares que sirvam como base para estudos posteriores e isso nos levou a analisar amostras de leucócitos em indivíduos normais. Neste estudo, investigamos um painel de genes marcadores de câncer para identificar se os mesmos apresentam variação diária em sua expressão. Analisamos ainda a estabilidade de expressão de genes de referência ao longo do ciclo circadiano, para ensaios de expressão gênica relativa. Com isso, o nosso objetivo é contribuir com o conhecimento sobre as bases moleculares da interação entre ritmo circadiano e câncer.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Ritmo Circadiano

O termo “ritmo circadiano” (do Latim, *circa diem*, que significa “cerca de um dia”) foi criado por Halberg para descrever oscilações endógenas em organismos, que foram observadas por conter uma associação aproximada com a rotação diária do planeta Terra (HALBERG, 1953). Esse processo de rotação da Terra ao redor de seu próprio eixo gera ciclos de dia e noite, e afeta a fisiologia da maioria dos organismos vivos (SCHIBLER e SASSONE-CORSI, 2002). Uma das características dos relógios circadianos é sua capacidade de serem sincronizados a partir de estímulos externos, mantendo, entretanto, as oscilações mesmo na ausência desses estímulos, ou seja, são autossustentáveis (MERROW, SPOELSTRA e ROENNEBERG, 2005; TAKAHASHI *et al.*, 2008; GOLOMBEK e ROSENSTEIN, 2010).

Relógios circadianos são sistemas intrínsecos adaptados que permitem aos organismos anteciparem as mudanças no ambiente ao seu redor, como por exemplo, a disponibilidade de comida e a predação e, além disso, permitem que eles adaptem seu comportamento e fisiologia aos diferentes períodos do dia, coordenando esses processos em ciclos de 24 horas (SAHAR e SASSONE-CORSI, 2009).

Um grande número de processos biológicos é regulado pelo relógio circadiano dos organismos, como por exemplo: comportamento alimentar, ciclos de sono-vigília, variação hormonal, temperatura corporal e metabolismo energético (SAHAR e SASSONE-CORSI, 2009; RANA e MAHMOOD, 2010). Além disso, a influência externa e interna de diversos fatores como a intensidade de luz no ambiente, estresse e condições de saúde, por exemplo, também são capazes de alterar os padrões de atividade e repouso (BEERSMA e GORDIJN, 2007). Muitas mudanças podem ser observadas durante o ciclo circadiano, como por exemplo, alterações na atividade física e mental, função cardiovascular e regulação de temperatura e também parâmetros do sistema imunológico, como número de leucócitos, função, proliferação e produção de citocinas (BESEDOVSKY, LANGE e BORN, 2012).

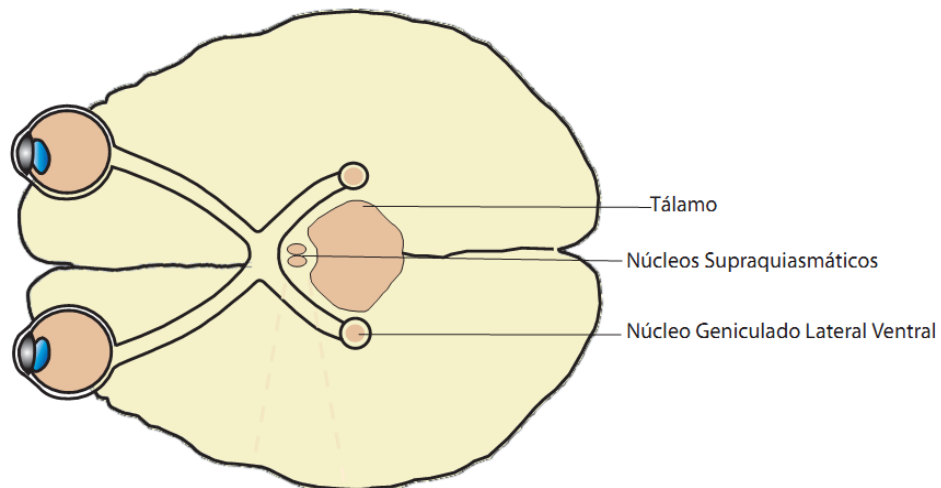
A mudança no estilo de vida influencia a desregulação do ritmo circadiano. Esse fator pode acarretar diversas patologias, como depressão, distúrbios de sono e, além disso, pode tornar o indivíduo mais susceptível ao câncer (HASTINGS, REDDY e MAYWOOD, 2003; SAHAR e SASSONE-CORSI, 2009). Um importante exemplo disso tem sido demonstrado em pesquisas que revelam que indivíduos que trabalham no período noturno tendem a ter um aumento na incidência de câncer de mama e outras doenças malignas (LI *et al.*, 2013).

Em mamíferos, o regulador sistêmico do relógio biológico, marca-passo (*Pacemaker*) ou oscilador central está localizado nos núcleos supraquiasmáticos (NSQ) (GERY e KOEFFLER, 2010; RANA *et al.*, 2014). Cada núcleo supraquiasmático é composto de pequenas estruturas emparelhadas no hipotálamo anterior, acima do quiasma óptico e contém cerca de 10.000 neurônios, estando estrategicamente posicionados para receber sinais de entrada de luz através de caminhos diretos ou indiretos do percurso retina-NSQ (REPPERT e WEAVER, 2001; ANTLE e SILVER, 2005). Cada neurônio pode gerar ritmos circadianos auto-sustentáveis independentes quando dissociados do NSQ (WELSH *et al.*, 1995; LIU *et al.*, 1997; HERZOG, TAKAHASHI e BLOCK, 1998; HONMA *et al.*, 1998). Estudos em lesões e transplantes estabeleceram que o NSQ é o marca-passo central dominante em mamíferos. Em roedores, lesões no NSQ aboliram completamente a ritmicidade circadiana em variáveis comportamentais e endócrinas (MOORE e EICHLER, 1972; STEPHAN e ZUCKER, 1972). Quando realizado um implante de tecido fetal do NSQ em animais que apresentam lesões em seu NSQ, os ritmos circadianos puderam ser parcialmente restaurados (LEHMAN *et al.*, 1987).

A presença de um marca-passo central serve para organizar de maneira temporal todo o organismo, e isso ocorre através da sincronização de vários relógios periféricos que oscilam de maneira autônoma e existem em praticamente em todas as células, gerando assim um ritmo comum (SCHEIERMANN, KUNISAKI e FRENETTE, 2013). O fígado, rins e sangue são exemplos desses relógios periféricos, como mostrado na figura 1 (GERY e KOEFFLER, 2010; RANA *et al.*, 2014). Eles são capazes de aumentar ou

diminuir as respostas centrais, ou ainda apresentar uma atividade autônoma que facilita as respostas adaptativas locais (RUDIC *et al.*, 2004).

Figura 1 - Representação do oscilador central e alguns osciladores periféricos humanos



Corte transversal demonstrando a localização do oscilador central (NSQ) no cérebro humano. O marca-passo central organiza de maneira temporal todo o organismo através da sincronização de vários relógios periféricos que oscilam de maneira autônoma e existem em praticamente em todas as células, gerando assim um ritmo comum. Fonte: FIGUEREDO, D.S., 2013.

2.2 Componentes moleculares do relógio circadiano

O núcleo molecular do relógio circadiano em vertebrados é formado por uma série de genes denominados “genes do relógio”, cujos produtos interagem entre si e geram uma atividade elétrica nas células do NSQ e, assim, levam a mudanças fisiológicas do organismo (KAMPHUIS *et al.*, 2005). O início da compreensão sobre os componentes desse sistema ocorreu com a descoberta de genes do relógio mutantes em fungos filamentosos da espécie *Neurospora crassa* e em *Drosophila pseudobscura*. Esses estudos com *Drosophila* possibilitaram a descoberta do gene *Period (Per)* (KONOPKA e BENZER, 1971; ZEHRING *et al.*, 1984). Em 1988, Ralph e Menaker identificaram uma mutação ocorrida em um *locus* autossômico em hamsters que afetava seu ritmo circadiano. Essa mutação foi denominada *Tau* e forneceu uma gama de ferramentas para futuras investigações sobre o controle da ritmicidade em mamíferos (RALPH e MENAKER, 1988). Cerca de dez anos depois, foi descoberto que a mutação *Tau* é um alelo da caseína quinase 1 ϵ (CK1 ϵ), uma proteína-quinase capaz de fosforilar as proteínas PER em mamíferos (LOWREY *et al.*, 2000).

Existem diversos fatores de transcrição que atuam juntos para formar alças de retroalimentação de transcrição (HASTINGS, REDDY e MAYWOOD, 2003; TAKAHASHI *et al.*, 2008). Muitos deles induzem a expressão de genes do relógio e outros genes que são controlados pelo relógio e são capazes de inibir sua própria transcrição, gerando assim padrões de oscilação na expressão gênica (HARMER, PANDA e KAY, 2001). Os genes *Clock (circadian locomotor output cycleskaput)* e *Bmal1 (brain and muscle arylhydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT)-like1)* codificam as proteínas CLOCK e BMAL1, que são fatores de transcrição que possuem um domínio *basic-helix-loop-helix-PAS (bHLH-PAS)* (YU e WEAVER, 2011) e formam o complexo heterodimérico CLOCK:BMAL1, o qual se liga nas regiões promotoras de genes alvo contendo a região E-box (DRUZD, DE JUAN e SCHEIERMANN, 2014).

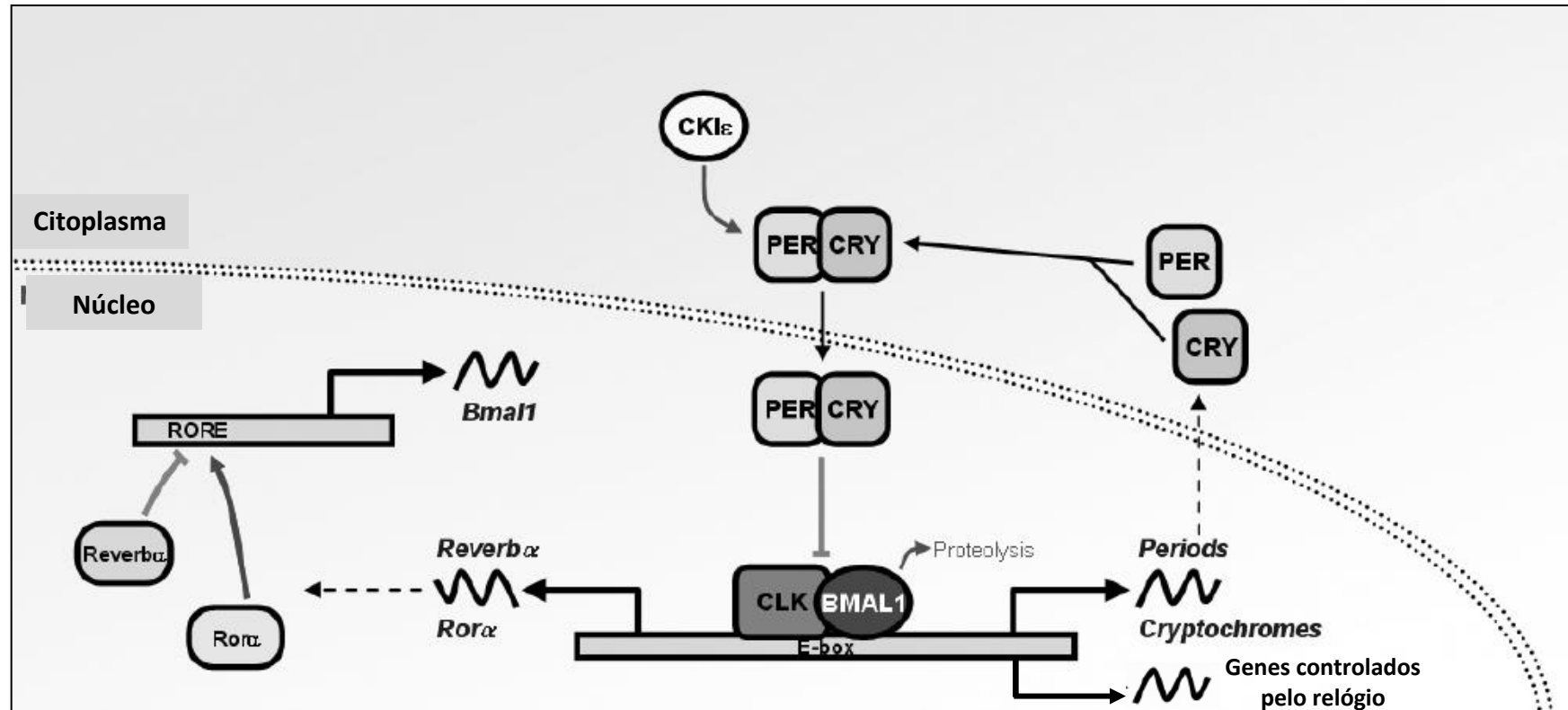
Em mamíferos, o complexo CLOCK:BMAL1 ativa os genes do relógio *Per (Per1 e Per2)* e *Cry (Cry1 e Cry2)*, que, por sua vez, codificam proteínas que formam o complexo heterodimérico PER:CRY que migra para o núcleo

inibindo a atividade transcricional do complexo CLOCK:BMAL1 e formando, assim uma alça de retroalimentação molecular (OKAMURA *et al.*, 2010; BUHR e TAKAHASHI, 2013; DRUZD, DE JUAN e SCHEIERMANN, 2014; KELLEHER, RAO e MAGUIRE, 2014).

Além desta, existem ainda alças acessórias envolvidas, como por exemplo, a composta por REV-ERB α e ROR α , um alvo da ativação da transcrição de CLOCK:BMAL1 e que atua inibindo *Bmal1*, como mostrado na figura 2 (OKAMURA *et al.*, 2010). A regulação circadiana se estende além dos genes do relógio e incluem *clock controlled genes* (genes controlados pelo relógio - CCGs), como os genes *c-Myc* e *Wee1*, por exemplo, que são chave no ciclo celular (PANDA *et al.*, 2002).

A regulação pós transcricional e pós traducional ocorre de maneira essencial para o mecanismo molecular do relógio. Dentre os processos de regulação pós traducional, podemos citar a ubiquitinação, acetilação, fosforilação, metilação e SUMoilação (LEE *et al.*, 2001; CARDONE *et al.*, 2005; LEE *et al.*, 2008). As regulações pós transcricionais podem ocorrer em nível de RNA ou na sequência de proteínas (através de *splicing* alternativo), na estabilidade do RNA, na capacidade de um RNAm ser traduzido (KEENE, 2010), e os miRNAs, que são reguladores pós transcricionais também atuam nesse processo reconhecendo sequências alvo de RNAm e se ligando de maneira completa ou parcial agindo principalmente nos níveis de tradução (BARTOK *et al.*, 2013). Na própria maquinaria do relógio, a fosforilação de PER2 promove a formação do complexo com CRY que, por sua vez, promove a translocação para o núcleo (YAGITA *et al.*, 2002). Além disso, a fosforilação de PER1 também medeia a localização celular (VIELHABER *et al.*, 2000). A fosforilação de todas as proteínas do núcleo circadiano em diferentes momentos do processo contribui para sua degradação, provavelmente através de vias de degradação proteossomal mediada por ubiquitina (LEE *et al.*, 2001; AKASHI *et al.*, 2002; YAGITA *et al.*, 2002; KONDRATOV *et al.*, 2003) Pelo menos um dos membros da família das quinases, a CKI ϵ (*casein kinase epsilon1*) participa desse processo (AKASHI *et al.*, 2002).

Figura 2 – Representação do relógio molecular circadiano de mamíferos.



O relógio circadiano é formado por alças de retroalimentação positivas e negativas. O complexo heterodimérico formado por CLOCK:BMAL1 ativa os genes do relógio *Per* e *Cry* que, por sua vez, formam o complexo heterodimérico PER:CRY que migra para o núcleo e inibe a atividade transcritora de CLOCK:BMAL1. Alças acessórias também fazem parte desse processo, como a composta por REV-ERB α e ROR α , que atua inibindo *Bmal1*, e as alças que ativam *clock controlled genes*.

2.3 Ritmo Circadiano em células sanguíneas

A ritmicidade circadiana em células hematopoiéticas foi relatada no início dos anos 50 e estudos posteriores identificaram a expressão de diferentes genes do relógio nessas células (CHEN *et al.*, 2000; GIMBLE, FLOYD e BUNNELL, 2009). O sistema imune e as respostas relacionadas a ele são regulados pelo relógio circadiano no cérebro e em suas células (HAUS e SMOLENSKY, 1999; SCHEIERMANN, KUNISAKI e FRENETTE, 2013).

Nos mamíferos, diferentes substâncias como hormônios e metabólitos já foram descritas por apresentarem oscilações circadianas (MINAMI *et al.*, 2009). Os níveis do hormônio corticosterona são controlados pelo relógio circadiano e apresentam picos durante a noite em camundongos (KENNAWAY *et al.*, 2006), já os níveis de melatonina nesses animais apresentam picos durante o início da manhã (KENNAWAY *et al.*, 2002). Em humanos, já foi demonstrado que o pico dos hormônios de crescimento ocorre durante o período em que o indivíduo está dormindo (TAKAHASHI, KIPNIS e DAUGHADAY, 1968), bem como os níveis de leptina e prolactina também apresentam picos durante a noite (SCHOELLER *et al.*, 1997; KOK *et al.*, 2006). A melatonina e o cortisol são dois hormônios importantes em estudos com ritmos circadianos. Em humanos, a melatonina apresenta altos níveis durante a noite (BERGER, 2008).

Estudos que mostram o envolvimento do ritmo circadiano em diferentes etapas da hematopoiese têm sido descritos em humanos e murinos (LAERUM, 1995; SMAALAND, 1996). Em camundongos, foi demonstrado que o número de unidades formadoras de colônias (UFC) na medula óssea, incluindo UFC de células multipotentes, UFC eritrocítica, UFC de granulócitos e macrófagos exibem essa ritmicidade (AARDAL e LAERUM, 1983; LEVI, BLAZSEK e FERLE-VIDOVIC, 1988; PERPOINT *et al.*, 1995; WOOD, HRUSHESKY e KLEVECZ, 1998). Kronfol e colaboradores demonstraram um ritmo circadiano nas contagens de leucócitos totais, contagem absoluta de linfócitos, células CD3+, CD4+ e CD8+, contagem percentual de neutrófilos e células CD56+ e *Natura killers* (NK) (KRONFOL *et al.*, 1997). Suzuki e colaboradores (1997) conseguiram confirmar o padrão de expressão circadiana em leucócitos totais humanos, bem como de granulócitos, linfócitos e monócitos em indivíduos saudáveis, onde o número e a proporção de granulócitos e monócitos

aumentou durante o dia e de linfócitos aumentou durante a noite (SUZUKI *et al.*, 1997).

Com relação aos genes do relógio, *Per1*, *Per2* e *Per3* apresentam um ritmo diário em células mononucleares de sangue periférico humano, que foi positivamente correlacionado com os níveis de melatonina no plasma, esta sendo um marcador circadiano confiável (BOIVIN *et al.*, 2003). Outra pesquisa realizada também com humanos mostrou que os genes *Per3*, *Cry1*, *Clock*, *Bmal1*, *Rev-Erba* e *Dec1* são expressos em leucócitos de maneira circadiana (ARCHER *et al.*, 2008).

2.4 Ritmo Circadiano e Câncer

A maquinaria de transcrição circadiana não está apenas relacionada com a expressão dos genes do relógio, ela pode também influenciar de maneira tecido-específica, a expressão de genes que não fazem parte desse sistema (PANDA *et al.*, 2002; STORCH *et al.*, 2002). Os genes que não são componentes centrais do ritmo circadiano estão envolvidos em diversas funções no organismo, como por exemplo, na secreção de hormônios, envelhecimento, ciclo celular, resposta ao dano no DNA, dentre outros (GERY e KOEFFLER, 2010; RANA e MAHMOOD, 2010). A desregulação do ritmo circadiano tem sido relacionada com o surgimento de diferentes patologias, incluindo o câncer (GERY e KOEFFLER, 2010).

O relógio circadiano e o ciclo celular possuem semelhanças conceituais e moleculares, pois ambos são constituídos por processos que apresentam alças de regulação interligadas e apresentam sequências de transcrição, tradução, modificação e degradação de proteínas (SAHAR e SASSONE-CORSI, 2009; RANA e MAHMOOD, 2010). Existem interações entre esses dois ciclos e, quando há uma desregulação no ritmo circadiano, há uma alteração no ciclo celular (YU e WEAVER, 2011). Vários estudos *in vivo* apoiam o conceito de que o ritmo circadiano coordena a progressão do ciclo celular. Estudos experimentais e clínicos sugerem uma coordenação circadiana das células que progridem através do ciclo celular (CANAPLE, KAKIZAWA e LAUDET, 2003). Esse fato é descrito devido a algumas observações como: mutações em alguns genes circadianos que estão relacionadas com taxas alteradas de câncer e os níveis de expressão de genes do relógio e proteínas que estão alteradas em tumores (YU e WEAVER, 2011).

Os genes circadianos podem aumentar a susceptibilidade ao câncer através dos efeitos nos mecanismos biológicos que regulam o dano e reparo ao DNA, o metabolismo carcinogênico, crescimento e morte celular (ZIENOLDDINY *et al.*, 2013). Esses *clock controlled genes* e que fazem parte do mecanismo de regulação do ciclo celular como *Myc*, *p53*, *Cyclin D1* e *Wee1* já foram descritos por apresentarem alteração em sua expressão em pacientes com leucemias associados à desregulação de genes do relógio (FU *et al.*, 2002; RANA *et al.*, 2014). Em estudos com modelo animal com câncer

colorretal, foi observado que os padrões de expressão para os genes do relógio *Per1*, *Per2*, *Rev-Erba*, *Bmal1* e *Cry1*, bem como os *clock controlled genes* *Wee1*, *Dbp* e *p21* apresentaram sua expressão rítmica no tecido normal como o esperado. No entanto, no tecido metastático, todos os genes do relógio, exceto *Cry1*, e os demais genes não apresentaram expressão circadiana (HUISMAN *et al.*, 2014).

O ciclo circadiano também controla a secreção de vários hormônios, o que também ocorre no sentido inverso, quando os hormônios em circulação influenciam os ritmos circadianos. Esse fluxo bidirecional é fundamental para a fisiologia normal do organismo e, por isso, alguns estudos sugerem que essa variação circadiana tem papel relevante no surgimento de neoplasias endócrinas. Um exemplo disso são as pessoas que trabalham em turnos noturnos e se mostram susceptíveis ao desenvolvimento de câncer de mama e de próstata relacionados com hormônios (HANSEN, 2001; SCHERNHAMMER *et al.*, 2003; MEGDAL *et al.*, 2005; KUBO *et al.*, 2006).

Em humanos e ratos, essas alterações podem acelerar o desenvolvimento de tumores em pacientes portadores da doença e em animais portadores de tumores. Ratos com carcinoma ou sarcoma mostraram um aumento do crescimento do tumor e diminuição do tempo de sobrevivência quando expostos a ciclos de tempos diferentes (claro/escuro – 14:10 horas ou 10:14 horas) em comparação com animais que permaneceram com o ciclo normal de 12:12 horas (LI e XU, 1997).

Dentre os cânceres que se apresentam afetados por desregulações do sistema circadiano, o câncer de mama é o que tem recebido mais atenção. Muitos estudos com humanos mostram que a expressão de alguns genes circadianos está desregulada em células de câncer de mama. Alguns deles relatam que a expressão dos genes *Per1* e *Per2* em tumores de mama primários encontram-se significativamente diminuídos em comparação com tecidos normais da mama (CHEN *et al.*, 2005; WINTER *et al.*, 2007; KUO *et al.*, 2009). Além disso, mutações em NPAS2 foram associadas com um maior risco de câncer de mama e linfoma não-hodgkin (CHEN *et al.*, 2005; HOFFMAN *et al.*, 2008). Outro estudo utilizando modelos com camundongos mostrou que existem ligações entre alguns genes do relógio e o processo de formação de tumor. Nele, o gene *Per2* parece funcionar como supressor de tumor, pois

camundongos mutantes desse gene apresentaram uma alta taxa de desenvolvimento de tumores (FU *et al.*, 2002).

A regulação circadiana é fundamental para a hematopoiese normal. Perturbações nesse sistema têm implicado no surgimento de neoplasias hematopoiéticas (GERY e KOEFFLER, 2010). Há relatos na literatura de que baixos níveis de expressão de *Per*, *Cry* e *Bmal1* foram encontrados em células de pacientes com leucemia mieloide crônica (YANG *et al.*, 2006). Em um estudo realizado com pacientes portadores de leucemia leucocítica crônica, os genes *Bmal1*, *Per1* e *Per2* apresentaram baixos níveis de expressão estatisticamente significantes quando comparados ao grupo controle composto por indivíduos saudáveis (RANA *et al.*, 2014).

Apesar da interação entre ritmos circadianos e câncer ser bastante descrita na literatura, pouco se sabe sobre genes envolvidos com o desenvolvimento de tumores que possam ser modulados por este sistema circadiano. Neste trabalho nós avaliamos um painel de 84 genes marcadores de câncer para identificar o perfil de expressão circadiano em amostras de leucócitos extraídos de sangue periférico de indivíduos saudáveis coletadas ao longo de 24 horas. A maioria desses genes não possui nenhuma descrição correlacionando seu perfil de expressão com ritmo circadiano.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Identificar genes previamente envolvidos com o câncer que apresentem expressão circadiana em leucócitos normais isolados de sangue periférico humano.

3.2 Objetivos específicos

3.2.1 Avaliar a estabilidade de expressão no ciclo circadiano de genes de referência utilizados em ensaios de quantificação relativa por PCR em tempo Real;

3.2.2 Avaliar através da técnica de *PCR Array* o perfil de expressão de 84 genes envolvidos com câncer em leucócitos isolados de sangue periférico humano de um indivíduo ao longo do ciclo circadiano;

3.2.3 Validar a expressão circadiana de genes selecionados em um conjunto ampliado de amostras, através da técnica de PCR em tempo real.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Coleta do sangue dos sujeitos da pesquisa

Para obtenção do material para os experimentos, foram selecionados 8 sujeitos que se disponibilizaram a ser voluntários na pesquisa. Todos os sujeitos foram orientados a ler e assinar o TCLE (Projeto aprovado no CEP – 23065.007138/2011-41). Como critério de inclusão da pesquisa, o sujeito deveria apresentar cronotipo indefinido, que foi obtido após a aplicação e análise do questionário de Horne-Ostberg (KARATSOREOS *et al.*, 2004). Este questionário atribui uma pontuação para 19 questões e gera um valor numérico referente aos horários de preferência de atividades. Com o resultado desse questionário, pode-se classificar os indivíduos em diferentes cronotipos: matutinos (pontuação final entre 86 – 59), indefinidos (58 – 42) e vespertinos (41 e 16). Como os indivíduos classificados no grupo com o cronotipo indefinido parecem ser mais tolerantes ou adaptáveis aos fatores de entrada (*zeitgebers*) sociais horário de turno de estudos, por exemplo, apenas os indivíduos com esse fenótipo foram selecionados para a pesquisa.

Oito voluntários saudáveis do sexo masculino, com idade média de 23.6 ± 4.7 anos, estudantes e de mesma etnia fizeram parte do estudo. Os voluntários não apresentaram mudanças no turno de trabalho, não tiveram experiência de *jetlag*, não eram fumantes e não faziam uso regular de medicações ou suplementos alimentares. Os voluntários foram orientados para que na semana anterior ao período do estudo evitassem o consumo de café ou produtos com cafeína e também substâncias energéticas. Além disso, deveriam manter uma rotina de alimentação e sono regulares. Após esse período de preparação, os voluntários foram recebidos no laboratório, jantaram às 19 horas e as luzes foram apagadas às 22 horas. A coleta de sangue foi realizada nos seguintes horários: 0:00 horas, 4:00 horas, 8:00 horas, 12:00 horas, 16:00 horas e 20:00 horas. Durante as coletas que foram realizadas nos períodos noturnos (fase escura), a amostragem foi realizada sob condições de baixa luminosidade. O material coletado (sangue) foi armazenado a 4°C até o início da extração de RNA. Os sujeitos se alimentaram entre os horários de 7:00 - 8:00 horas (Café da Manhã), 9:30-10:30 horas (Lanche), 12:00-13:00

horas (Almoço), 15:30-16:30 horas (Lanche), e 19:00-20:30 horas (Jantar), havendo disponibilidade de água em qualquer horário, esses parâmetros foram acompanhados pela equipe de pesquisa.

Antes dos experimentos, uma alíquota de sangue dos voluntários foi encaminhada ao Laboratório de Análises Clínicas (Laboratório Lima do Vale. Rua S. Francisco, 896, Centro, Arapiraca - AL) para realização de hemogramas. O resultado do leucograma de cada sujeito está apresentado na Tabela 1. Dentre os oito indivíduos selecionados, dois deles foram excluídos do grupo experimental por apresentar alterações nos padrões hematológicos normais. Desta forma, a pesquisa foi realizada apenas com seis sujeitos, alterando desta forma a média de idade para 26.5. ± 6.4.

Tabela 1. Leucograma dos sujeitos incluídos na pesquisa.

	Leucócitos Totais	Linfócitos	Neutrófilos	Monócitos	Eosinófilos
S1	4600	1702	2530	230	138
S2	7200	3240	3240	432	216
S3	5100	2550	2244	204	102
S4	8600	3354	4730	344	86
S5	7100	1704	4473	710	213
S6	9300	3813	4650	837	93
V.R.	5.000– 10.000	1.000 – 5.000	1.800 – 7.000	80 – 1.200	0 – 600

Unidade: Células/ mm³.

V.R.: Valor de referência.

FONTE: FIGUEREDO, D.S., 2013.

4.2 Extração de RNAm de Sangue Periférico com o kit *miRNeasy*

Foram coletadas três alíquotas de 5mL de sangue dos sujeitos para cada ponto (horário). As amostras foram colocadas em tubos com EDTA, conservadas em gelo e, em seguida, transferidas para um tubo falcon de 15mL específico para a centrifuga refrigerada (Neofurge 18R, Heal Force). Em seguida, o processo de lise dos eritrócitos foi realizado com a adição de solução de lise (*Buffer EL*, Qiagen, USA), aproximadamente cinco vezes à quantidade de sangue inicial. A solução foi incubada por 15 minutos no gelo com homogeneização frequente. As amostras com eritrócitos lisados foram centrifugadas a 400 x g a 4°C por 10 minutos. O sobrenadante foi retirado cuidadosamente e o processo de lise foi repetido com o volume de 3mL de

Buffer EL. Novamente foi retirado o sobrenadante cuidadosamente e, após essa etapa, para a lise do *Pellet* de células nucleadas foram adicionados 700 µL de Qiazol (Qiagen, USA) e as amostras incubadas por 5 minutos em temperatura ambiente. Após o tempo de incubação, foram adicionados 140 µL de clorofórmio à solução e foi homogeneizada durante 15 segundos. As amostras foram incubadas durante 3 minutos sob temperatura ambiente e em seguida centrifugadas a 12,000 x g à 4 °C. Quando o processo terminou, pode-se observar três fase no tubo: fase vermelha inferior (Trizol/Clorofórmio e proteínas), interfase (restos moleculares degradados) e superior (RNA). A fase inferior foi armazenada em freezer -80 para ensaios posteriores. A fase superior com RNA foi transferida para um tubo novo, com um volume de aproximadamente 350µL e depois foram adicionados 525µL de etanol absoluto.

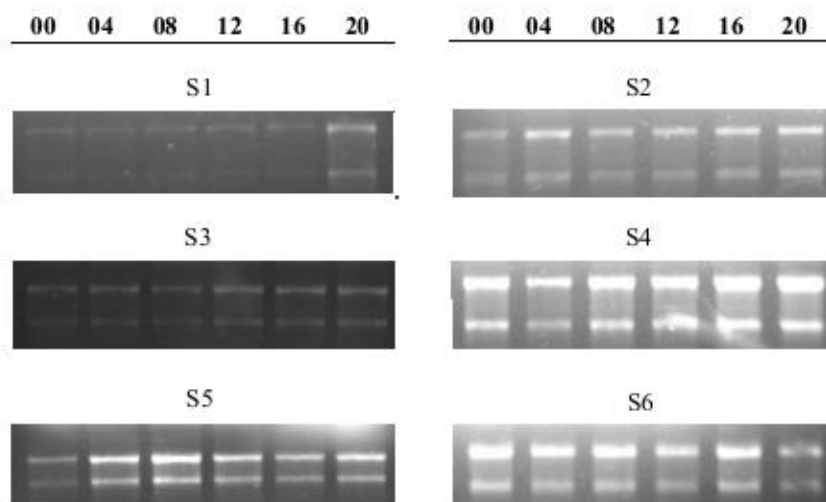
Um volume de 700µL de cada amostra foi transferido para o *RNeasy Mini spin column* (Qiagen, USA) e centrifugado a 8,000 x g (10,000 rpm) durante 1 minuto em temperatura ambiente. O precipitado resultante após o processo foi descartado. Para a lavagem da coluna, 700 µL do Buffer RWT (Qiagen, USA) foram adicionados na *RNeasy Mini spin column* (Qiagen, USA), e centrifugadas a 8,000 x g (10,000 rpm) por 1 minuto em temperatura ambiente. O precipitado foi descartado novamente. Foram adicionados 500 µL do *Buffer RPE* (Qiagen, USA), centrifugadas a 8,000 x g (10,000 rpm) por 1 minuto. O precipitado também foi descartado. Esta etapa foi repetida, sendo o tempo de centrifugação elevado para 3 minutos para assegurar a ausência de resíduos de etanol e contaminantes nas colunas. Em seguida as colunas (*RNeasy Mini spin column*) foram transferidas para novos tubos de 1,5 mL, sendo adicionados 30 µL de água livre de RNase, As amostras foram centrifugadas a 8,000xg (10,000 rpm) por 1 minuto para a eluição do RNA. Esta etapa foi repetida totalizando um volume final de 60 µL e as amostras devidamente armazenadas em – 80°C.

4.3 Quantificação e análise da integridade do RNA

As amostras do RNA foram analisadas em um gel de agarose desnaturante com a concentração de 1,5% (Figura 3). O material utilizado na preparação, como a cuba de eletroforese e as vidrarias foram tratados com

peróxido de hidrogênio 3%. Após esse tratamento, a cuba foi montada e o gel foi preparado no aparelho de micro-ondas, onde 1,5g de agarose foram dissolvidos em 72mL de água tratada com DEPC e em seguida foram acrescentados 18mL de formaldeído e 10mL de MOPS 10 X (25mL de MOPS 10x e 225 mL de água tratada com DEPC). O tampão de desnaturação foi preparado com 2µL de MOPS 10x, 4 µL de formaldeído, 7 µL de formamida e 1 µL de brometo de etídio, sendo acrescentado 5 µL de RNA total de cada amostra por solução individual, desconsiderando quantificação em espectrofotômetro. Após homogeneização, a solução foi incubada a 65°C durante 10 minutos e, em seguida, colocada no gelo. O gel foi corrido na cuba de eletroforese por 5 minutos a 5 V/cm antes das amostras serem aplicadas no gel. Por fim, as amostras foram aplicadas com a adição de 2 µL do tampão de carregamento (Glicerol 50%, azul 0,25%, EDTA 10mM, e água DEPC) por solução individual, sob uma corrente de 5V/cm, por aproximadamente 4 horas.

Figura 3. RNAs extraídos de leucócito através do *Kit miRNeasy*



FONTE: FIGUEREDO, D.S., 2013.

Com o objetivo de padronizar a quantidade de RNA total usados na síntese de cDNA, as mesmas foram quantificadas para determinar suas respectivas concentrações. Para isto, foi utilizado o aparelho de espectrofotometria (*BioPhotometer plus/Eppendorf*), que possibilita a quantificação de ácidos nucleicos. Foram utilizados 5 μ L de RNA diluídos em 45 μ L de água livre de RNase (AMRESCO), sendo considerados, para o valor de absorvância igual a 1, em comprimento de onda de 260nm, 38 μ g de RNA/mL. A razão das absorvâncias em 260nm e 280nm foi calculada para averiguar o grau de pureza das amostras de RNA (Anexo 1). Além disso, ressalta-se que a absorvância da água usada para a diluição foi desconsiderada antes de cada procedimento de espectrometria. Os resultados obtidos após os experimentos de eletroforese demonstram as bandas dos rRNA 28S e 18S em proporção (2:1), um padrão esperado em para extrações de RNA bem sucedidas. Nos dados de espectrometria observa-se que 5 amostras apresentam o valor da razão 260nm/280nm entre 2.1-2.5. Embora acima do valor de referência, acreditamos que estes sejam valores aceitáveis para a consideração da integridade das amostras obtidas após a extração de RNA total com o *miRNeasy* (Qiagen, USA).

4.4 Síntese de cDNA com *RT² First Strand Kit*

A síntese de cDNA foi realizada com o RNA total de um sujeito escolhido aleatoriamente. Para a síntese de cDNA através do sistema *RT² First Strand Kit* (Qiagen, USA) foi utilizado 1µg de RNA total da amostra. O protocolo foi desenvolvido seguindo as instruções do fabricante e utilizou dois princípios: eliminação de contaminação com DNA genômico e a transcrição reversa.

Na primeira etapa, foi preparado um mix denominado *genomic DNA elimination mix* para cada amostra, com o intuito de eliminar resíduos de DNA genômico das amostras de RNA, ao qual foi adicionado 1µg do RNA total da amostra, 4µL de *Buffer GE* (solução de eliminação de DNA genômico) e H₂O livre de RNase (o volume de água variou de acordo com o volume do RNA) chegando a um volume final de 10µL. O mix foi incubado durante 5 minutos a 42°C e, após a incubação, as amostras foram colocadas em gelo durante 1 minuto. A segunda etapa consistiu na preparação do mix da transcrição reversa, onde foram adicionados 4µL de *5x Buffer BC3*, 1µL de *Control P2*, 2µL de *RE3 Reverse Transcriptase Enzyme Mix 3* e 3µL de água livre de RNase, em um volume total de 10µL. O volume total do Mix da Transcrição Reversa foi adicionado ao tubo do mix de eliminação do DNA genômico, homogeneizado gentilmente e incubado a 42°C por 15 minutos. Depois de decorrido o tempo, a reação foi finalizada com a incubação das amostras por 5 minutos a 95°C e foram adicionados 91µL de água livre de RNase. As amostras foram mantidas em gelo para serem utilizadas nas reações de *PCR Array* e posteriormente foram armazenadas em freezer -80°C.

4.5 Análise de Estabilidade de Genes de Referência

A análise de estabilidade foi realizada a partir das séries temporais de dados obtidos com os 6 sujeitos da pesquisa, ou seja, seis pontos de coleta no período circadiano para cada sujeito. Foram analisados os genes *B2m* (*beta 2-microglobulin*), *Gapdh* (*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*), *Rpl13a* (*ribosomal protein L13a*), *Actb* (*actin, beta*), *Hprt1* (*hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1*), *18s rRNA* (*18S ribosomal RNA*), *Eif2a* (*eukaryotic translation initiation factor 2A, 65kDa*) como candidatos a controles endógenos. Inicialmente, o software *geNorm* foi utilizado para analisar a

estabilidade dos genes de referência selecionados para serem utilizados como normalizadores. Para esse programa, é recomendado que os valores de Cts (*cycle thresholds*) sejam convertidos em $2^{(Ct/Amostra - Ct/Mínimo)}$ (VANDESOMPELE *et al.*, 2002). Aqui, os Cts das amostras correspondem aos dados obtidos para cada amostra (horários) e Ct mínimo ao menor Ct dentre os seis horários. O programa utiliza um fator de normalização calculado com base na média geométrica dos genes (HIROTA *et al.*, 2010; HEUSTON, LEMON e ARCECI, 2011; PALMA *et al.*, 2012).

O programa parte do princípio de que a razão da expressão de dois genes endógenos ideais é a mesma em qualquer tecido e condição experimental, ou seja, a presença de variação na razão da expressão de dois genes endógenos em condições experimentais distintas reflete no fato de um, ou ambos os genes não serem constitutivamente expressos (HIROTA *et al.*, 2010). A partir disso, para um conjunto de genes são feitas correlações aos pares com o desvio padrão das razões da expressão, que é a base para o cálculo do índice de estabilidade M, a média das variações aos pares de um determinado gene com todos os demais, onde o gene com menor valor M apresenta maior estabilidade (HIROTA *et al.*, 2010). Além disso, assumindo que os genes não apresentam uma co-regulação, é indicada a exclusão gradual dos genes com maior valor de M até a obtenção dos dois genes mais estáveis (HIROTA *et al.*, 2010). O programa realiza o cálculo automático de M e possui uma ferramenta para eliminação gradual do gene mais instável para obtenção de novos valores de estabilidade para os demais genes (HIROTA *et al.*, 2010). Valores de M maior do que 1.5 são considerados insatisfatórios.

Além desta análise, realizamos o teste Cosinor (ver o item 4.5.4- Análises Estatísticas) com os dados brutos de Ct como critério de exclusão. Aqueles genes candidatos que apresentaram cosinor significativo a partir dos dados de Ct não foram utilizados para normalização. A expressão do gene do relógio *Per3* foi utilizada como um controle positivo para variações diurnas. As sequências dos iniciadores selecionados estão descritas na tabela 2

4.6 RT² Profiler™ PCR Array Human Cancer Pathway Finder

A fim de avaliar o perfil de variações diárias de genes relacionados com câncer, foram realizadas reações através da técnica de *PCR Array* com o cDNA de um dos sujeitos da pesquisa, selecionado aleatoriamente (S5). Para cada placa foi utilizada uma amostra de cDNA proveniente de um ponto de coleta no ciclo de 24h (0, 4, 8, 12, 16 ou 20 horas), totalizando seis placas.

As reações foram feitas no equipamento *StepOne Plus* (Applied Biosystems, USA) utilizando o sistema *RT²ProfilerTM PCR Array Human Cancer Pathway Finder* (Qiagen, USA). O número de ciclos de PCR em que a fluorescência atingiu o limiar (*threshold*) na curva de amplificação – *cycle threshold* (Ct) – foi determinado automaticamente pelo programa *StepOnePlusTM*.

O sistema do *PCR Array* é composto por placas de 96 poços, e contém 84 poços com *primers* de genes relacionados ao câncer, 5 de genes constitutivos – *housekeeping genes* (Anexo 2), 1 poço com controle de contaminação da reação por DNA genômico (HGDC), o qual vai permitir a detecção específica de contaminações com DNA genômico utilizando os seguintes parâmetros como referência: valor de Ct > 35, então a contaminação com DNA genômico é muito baixa e não afeta a expressão dos genes e nada deve ser feito. Se o valor de Ct < 30, a contaminação com o DNA genômico deve ser removida a partir das amostras de RNA e a análise deve ser repetida. Se o valor estiver entre 30 e 35, os resultados podem ser interpretados gene por gene de maneira cautelosa. Além desse controle, há também 3 poços da placa com controle da transcrição reversa (RTC), com o objetivo de avaliar a eficiência da transcrição reversa, onde o cálculo a ser realizado é $Ct^{RTC} - Ct^{PPC}$, onde Ct^{RTC} corresponde aos Cts do controle da transcrição reversa e Ct^{PPC} corresponde ao controle positivo. A diferença entre esses dois controles deve ser menor que 5 para garantir que não houve inibição na transcrição por impurezas. Valores maiores que 5 indicam que houve inibição do processo de transcrição e o RNA deve ser checado para garantir a pureza, qualidade e integridade das amostras. E, por último, dois poços com controles positivos (PPC), utilizados para testar a eficiência da reação de PCR, valores de $Ct^{PPC} = 20 \pm 2$ indicam ausência de inibidores, valores abaixo ou acima disso indicam a presença de inibição.

Em um tubo de 15mL foi preparado um mix contendo 1350µL do 2x RT² Sybr Green Master Mix e 1248µL de água livre de RNase. Foram adicionados 22,5µL desse mix em cada poço da placa e, após isso, foram distribuídos 2,5µL de cDNA em cada poço. O kit contém uma enzima *HotStarTaq DNA Polymerase*, tendo sido, portanto, ativada apenas após aquecimento inicial por 10 minutos à 95°C. Foram realizados 40 ciclos de amplificação, com duas etapas, sendo 15 segundos à 95°C e 1 minuto à 60°C.

4.7 Validação dos genes selecionados a partir dos ensaios de PCR Array

A validação foi realizada através de reações de RT-qPCR utilizando as amostras dos seis sujeitos da pesquisa nos seis tempos de coleta (0, 4, 8, 12, 16 e 20 horas). As sequências dos iniciadores selecionados estão descritas na tabela 2.

Tabela 2. Sequência dos iniciadores utilizados para análise de estabilidade de genes de referência e validação dos ensaios de PCR Array.

	Gene	Senso	Antisenso
Genes para validação	<i>Mmp9</i>	5'-CTTTGGACACGCACGACGT-3'	5'-CCTGGTTCAACTCACTCCGG-3'
	<i>Htatip2</i>	5'-CGGAGGGATTTGTTCTGTTG-3'	5'-AGCTCCTTTAGAGGATAGCAAGT-3'
	<i>Casp8</i>	5'-TTTCTGCCTACAGGGTCATGC-3'	5'-TGTCCAACCTTCTCTCCCA-3'
Genes de referência	<i>Actb</i>	5'-CATGTACGTTGCTATCCAGGC-3'	5'-CATGTACGTTGCTATCCAGGC-3'
	<i>Rpl13a</i>	5'-GCCCTACGACAAGAAAAAGCG-3'	5'-TACTTCCAGCCAACCTCGTGA-3'
	<i>B2m</i>	5'-GAGGCTATCCAGCGTACTCCA-3'	5'-CGGCAGGCATACTCATCTTTT-3'
	<i>Gapdh</i>	5'-AGAAGGCTGGGGCTCATTTG-3'	5'-AGGGGCCATCCACAGTCTTC-3'
	<i>Hprt1</i>	5'-CCTGGCGTCGTGATTAGTG-3'	5'-TCCCATCTCCTTCATCACATC-3'
	<i>18S rRNA</i>	5'-AGG AAT TCC CAG TAA GTG CG-3	5'-GCC TCA CTA AAC CAT CCA A-3'
	<i>Eif2a</i>	5'-GACAGTCCGAGGATCAGAAGG-3'	5'-TGCAATTCTTCCCAGATTCC-3'
Gene circadiano	<i>Per3</i>	5'-GCAGAGGAAATTGGCGGACA-3'	5'-AGAGTGTTGGCTTATTGCGTC-3'

FONTE: AUTORA, 2014.

4.8 Análise de eficiência de amplificação dos iniciadores

Antes dos experimentos de expressão relativa foram feitas análises das eficiências dos iniciadores. Para isso, o cDNA total foi diluído cinco vezes (diluições: 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32) para a construção da curva padrão para

cada iniciador. A eficiência do iniciador estaria confirmada caso os valores estivessem entre 90 e 110%. Podemos observar na tabela 3 que todos os iniciadores apresentaram boa eficiência de amplificação, exceto o da *Actb*, que apresentou uma eficiência de 60% e, por isso, as análises não foram feitas com esse gene. Os dados de eficiência foram analisados no *StepOnePlus software v2.1* (Applied Biosystems, USA).

Tabela 3. Eficiência de amplificação das reações de RT-qPCR referentes aos genes analisados.

Gene	Eficiência (%)
<i>Casp8</i>	91,6
<i>Htatip2</i>	90,1
<i>Mmp9</i>	90,4
<i>B2m</i>	91,0
<i>Hprt1</i>	92,9
<i>Rpl13a</i>	90,9
<i>Gapdh</i>	95,1
<i>18S rRna</i>	97,7
<i>Eif2a</i>	90,3
<i>Actb</i>	60
<i>Per3</i>	103,3

FONTE: AUTORA, 2014.

4.9 Análises Estatísticas

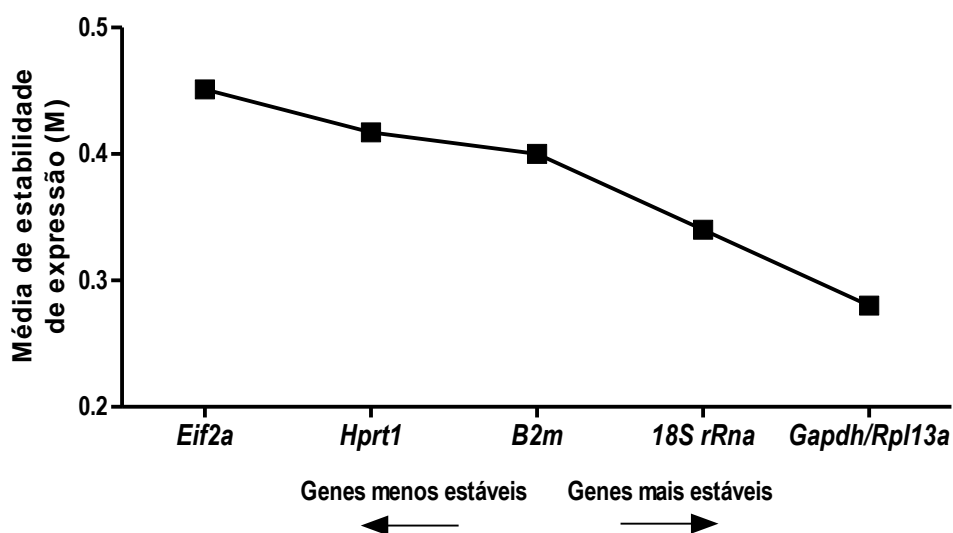
Para as análises de variações diárias na expressão dos genes foi aplicado o teste *One-way* ANOVA de uma via com medidas repetidas com o pós-teste de Newman-Keuls. Além disso, foi empregado o teste Cosinor com período ajustado para 24 horas (GUAY *et al.*, 2011; LUO e SEHGAL, 2012) para a análise estatística das variações diárias individuais ou com dados agrupados de diferentes sujeitos. As análises foram realizadas com o programa *Acrophase* (<http://www.circadian.org/software.html>). Alguns dos parâmetros analisados por este teste foram: mesor, que representa uma estimativa da média de oscilação (valor médio do ciclo); amplitude da onda do cosseno, que representa metade da distância entre os picos da onda e acrofase, que representa o ponto de tempo no ciclo com maior amplitude.

5. RESULTADOS

5.1 Análise da estabilidade de expressão dos genes de referência

A primeira etapa realizada foi a análise de estabilidade de expressão dos genes de referência utilizando o software *geNorm*. O programa gerou valores médios de estabilidade de expressão de cada gene resultando no índice M, que está representado na figura 4. Quanto menor o valor do índice M, maior a estabilidade do gene. O gene *Eif2a* foi indicado como o menos estável dentre eles. Além disso, o programa gerou resultados automáticos a partir da exclusão dos genes menos estáveis e mostrou a melhor combinação de genes para serem utilizados como normalizadores. Os genes *Gapdh* e *Rpl13a* foram apontados como a melhor dupla pelo software por apresentarem a expressão mais estável na condição de estudo.

Figura 4. Análise de estabilidade dos genes de referência para a normalização da expressão gênica relativa, utilizando software *geNorm*.

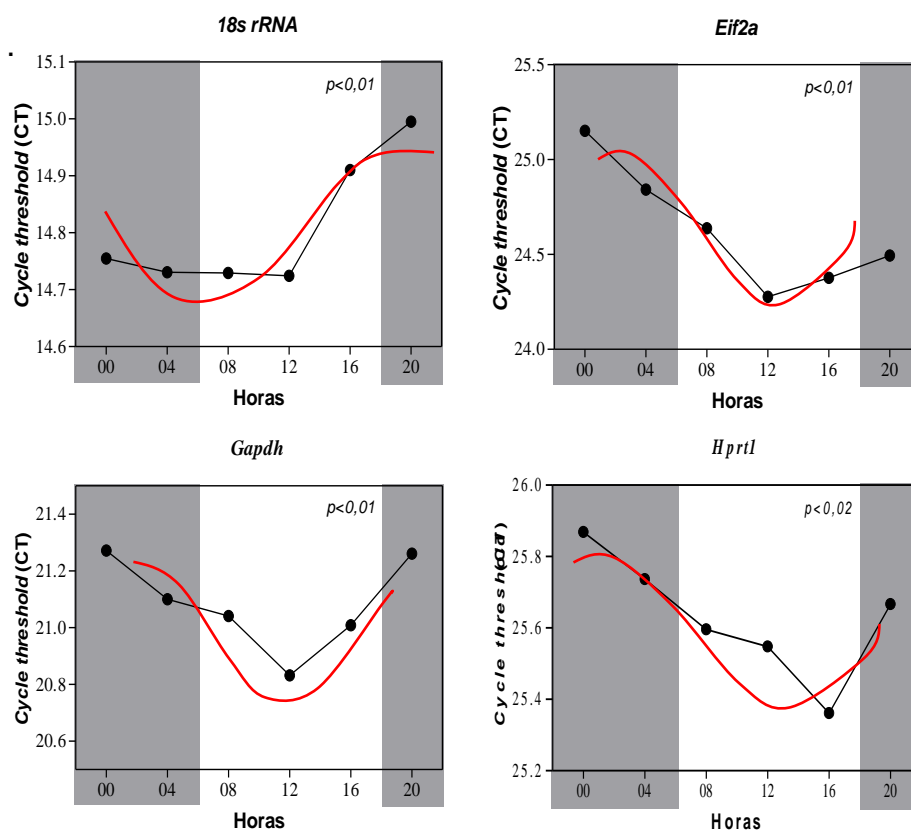


Cálculo da média da estabilidade de expressão. Para cada gene, foi calculado o valor de M. O eixo x da esquerda para a direita indica a posição dos genes de acordo com a sua estabilidade de expressão. Fonte: Autora, 2014.

Após essa análise de estabilidade, avaliamos se os dados brutos de Ct desses genes apresentaram variações circadianas de acordo com o teste

Cosinor. Pudemos observar que quatro dos seis genes de referência selecionados para o estudo, apresentaram cosinor estatisticamente significante: *Eif2a*, *Hprt1*, *Gapdh* e *18S rRNA* (Figura 5).

Figura 5. Análise de variações diárias dos genes de referência através do teste de cosinor.



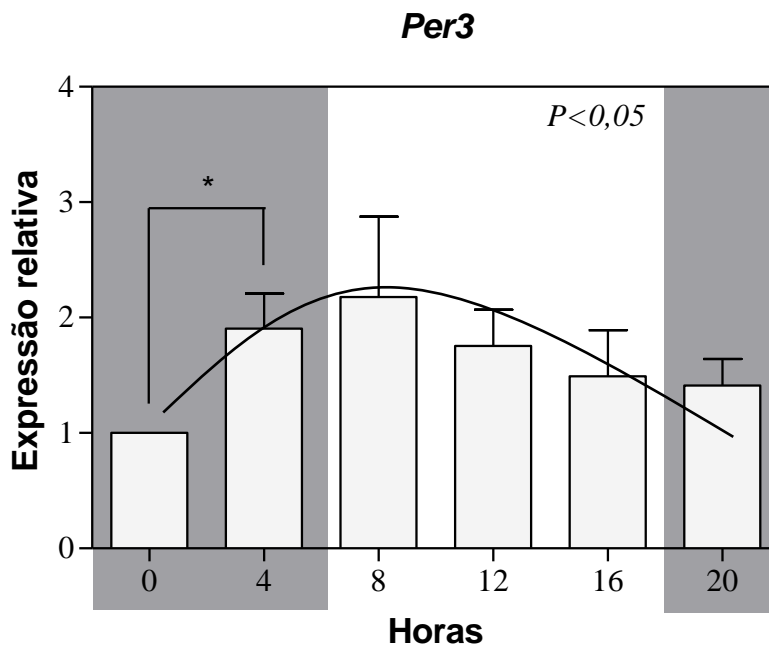
Os pontos pretos representam os dados de expressão relativa (*Fold change*) da média dos 6 sujeitos da pesquisa e as linhas em vermelho representam as curvas cosseno ajustadas para o período de 24 horas. A amostra referente ao ponto 0 horas foi utilizada como calibrador da reação (Valor = 1). Cosinor, $p < 0,05$.

Diante disso, nós utilizamos esse resultado como critério de exclusão, passando então a normalizar os nossos dados com os dois genes de referência que não apresentaram variação ao longo do dia, o *Rpl13a* e o *B2m*. Como mostrado no gráfico de estabilidade acima, o gene *Rpl13a* foi indicado como um dos genes da melhor combinação para normalização, e o *B2m* está em terceiro no *ranking* de estabilidade, ambos com índice M abaixo do limiar de 1.5.

5.2 Análise de variações diárias de *Per3*

O gene do relógio *Per3* foi utilizado como controle de variações diurnas para avaliação dos genes endógenos selecionados. Quando normalizado com os genes *Rpl13a/B2m*, as análises mostraram que o gene apresenta uma variação rítmica ao longo do dia, com significância estatística para cosinor e anova (Figura 6). O teste ANOVA mostrou uma diferença estatística significativa entre os pontos 0 e 4 horas.

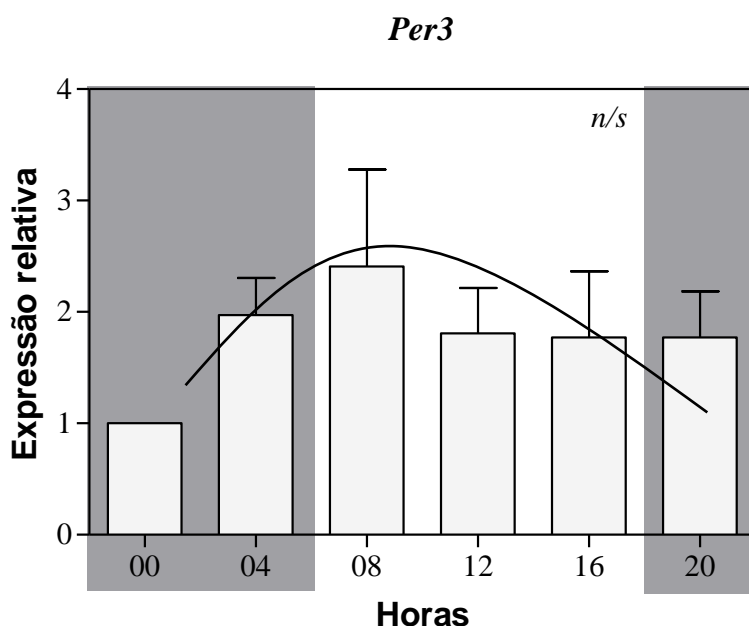
Figura 6. Análise de variações diárias dos genes do relógio *Per3* através do teste de cosinor e anova normalizado com *Rpl13a* e *B2m*.



Análises realizadas com a média do *fold change* (expressão relativa) dos seis sujeitos da pesquisa. *Per3* normalizado com os genes de referência *Rpl13a* e *B2m*. Cosinor $p < 0,05$. One way ANOVA: * $p < 0,04$.

Quando *Per3* foi normalizado com a melhor combinação sugerida pela análise com *geNorm*, *Gapdh/Rpl13a* o resultado não apresentou significância (Figura 7).

Figura 7. Análise de variações diárias dos genes do relógio *Per3* através do teste de cosinor e anova normalizado com *Gapdh* e *Rpl13a*.



Análises realizadas com a média do *fold change* (expressão relativa) dos seis sujeitos da pesquisa. *Per3* normalizado com os genes de referência *Gapdh* e *Rpl13a*.

5.3 Controles do *PCR Array*

Para garantir que os experimentos não apresentaram problemas relacionados com contaminação de DNA genômico e garantir a qualidade das amostras de RNA e o desempenho geral da PCR, foram utilizados os próprios controles da placa de *PCR Array*. A empresa que comercializa o kit estabeleceu valores de referência para cada controle. Assim, comparando os nossos dados com esses valores chegamos aos seguintes resultados: nossas amostras não apresentaram contaminação com DNA genômico, pois os valores dos Cts (*cycle thresholds*) referentes a essas análises foram maiores que 35, que é o limite recomendado; os controles positivos da PCR (PPCs) foram utilizados para testar a eficiência da reação, tendo como valores de referência Cts = 20 ± 2 . As reações de PCR funcionaram da maneira adequada, visto que os valores ficaram dentro desse limite (Tabela 4). Além disso, para testar a eficiência da transcrição reversa, outro controle interno também foi utilizado, RTC, o qual, a diferença entre as médias de cada horário de $Ct^{RTC} - Ct^{PPC}$ deveria ser menor que 5 para garantir que não houve inibição na transcrição por impurezas. Os nossos resultados também ficaram dentro do valor de

referência, ou seja, menores que 5, como indicado na tabela 4. Além disto, o desvio das triplicatas dos controles foi pequeno, o que indica pouca variação na pipetagem.

Tabela 4. Resultados do Controle da transcrição reversa (RTC)

Horas	Ct ^{RTC} - Ct ^{PPC}	PPC
0	3,84	20,62 ± 0,11
4	3,84	20,75 ± 0,21
8	3,61	20,85 ± 0,0
12	3,51	20,71 ± 0,25
16	3,25	20,90 ± 0,06
20	3,90	20,59 ± 0,09

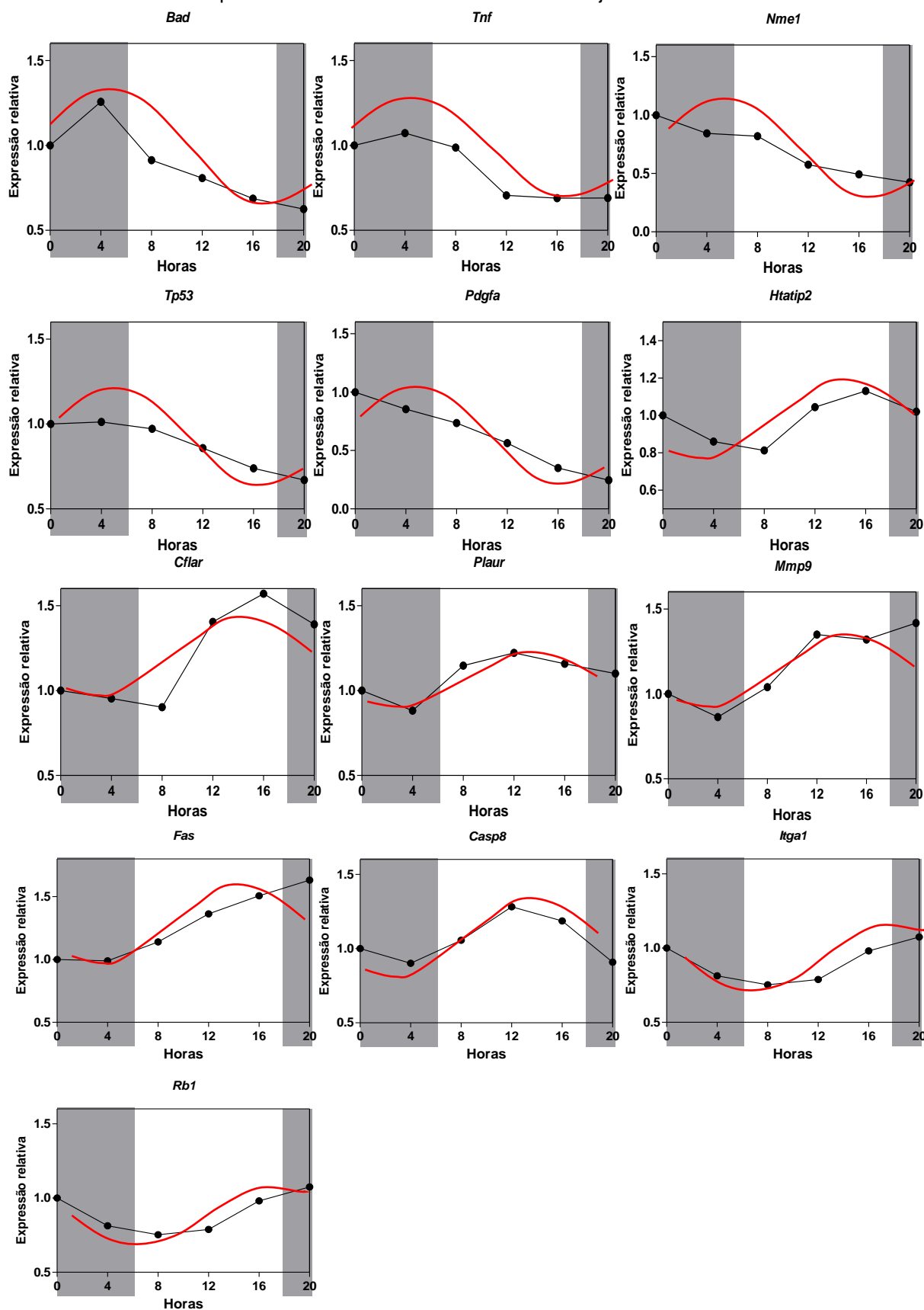
Ct: *Cycle threshold*; PPC: controle positivo da PCR e RTC: controle da transcrição reversa.

5.4 Análise das variações diárias na expressão dos genes do PCR Array

Após a normalização feita com os genes *Rpl13a* e *B2m*, foram realizadas as análises de variações diárias através do teste cosinor para verificar quais dos 84 genes da placa de PCR Array apresentam um padrão de expressão circadiana. Como resultados dessas análises, 15,5% dos genes da placa, ou seja, 13 dos 84 genes apresentaram significância estatística no teste de cosinor (cosinor positivo): *Bad* (*BCL2-associated agonist of cell death*), *Casp8* (*Caspase 8, apoptosis-related cysteine peptidase*), *Cflar* (*CASP8 and FADD-like apoptosis regulator*), *Htatip2* (*HIV-1 Tat interactive protein 2, 30kDa*), *Mmp9* (*Matrix metalloproteinase 9 (gelatinase B, 92kDa gelatinase, 92kDa type IV collagenase)*), *Nme1* (*NME/NM23 nucleoside diphosphate kinase 1*), *Pdgfa* (*Platelet-derived growth factor alpha polypeptide*), *Tnf* (*Tumor necrosis factor*), *Tp53* (*Tumor protein p53*), *Fas* (*Fas (TNF receptor superfamily, member 6)*), *Itga1* (*Integrin, alpha 1*), *Plaur* (*Plasminogen activator, urokinase receptor*) e *Rb1* (*Retinoblastoma 1*), como mostrado na Figura 8.

A tabela 5 mostra os dados da média (mesor), acrofase e amplitude dos genes que apresentaram cosinor significativo. Dentre os 13 genes que apresentaram variação ao longo do dia, podemos observar que sete deles apresentaram um pico de expressão durante a fase escura, com uma variação de 20,0 a 5,2 horas (*Bad, Itga1, Nme1, Pdgfa, Rb1, Tnf e Tp53*), enquanto seis dos treze genes apresentaram um pico de expressão na fase clara, com uma variação de 12,8 a 17,2 horas (*Casp8, Cflar, Fas, Htatip2, Mmp9 e Plaur*).

Figura 8. Análise por *PCR Array* do perfil de expressão diária dos genes com cosinor positivo em leucócitos totais obtidos do sujeito S5.



Nota: Os pontos pretos representam os dados de expressão relativa (*Fold change*) individual e as linhas em vermelho as curvas cosseno ajustadas para o período de 24 horas.

Tabela 5. Análise descritiva dos dados de expressão dos genes com cosinor significativo.

GENES	Mesor	Amplitude	Acrofase/horas	Fase do dia	Função
<i>Bad</i>	0,33	0,316	4,4	noite	Apoptose e Senescência celular
<i>Casp8</i>	0,66	0,19	12,8	dia	
<i>Cflar</i>	0,66	0,354	16,4	dia	
<i>Htatip2</i>	0,66	0,159	17,2	dia	
<i>Fas</i>	0,83	0,321	16,4	dia	
<i>Pdgfa</i>	0,167	0,377	4,0	noite	Angiogênese
<i>Tnf</i>	0,5	0,265	4,0	noite	
<i>Itga1</i>	0,33	0,161	20,0	noite	Adesão
<i>Nme1</i>	0,16	0,288	4,0	noite	Invasão e metástase
<i>Mmp9</i>	0,83	0,277	16,0	dia	
<i>Plaur</i>	0,83	0,17	14,0	dia	
<i>Rbi</i>	0,667	0,204	18,0	noite	Controle do ciclo celular e reparo do dano ao DNA
<i>Tp53</i>	0,33	0,171	5,2	noite	

*FONTE: A função dos genes foi retirada da pesquisa no site do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>), de acordo com o código do *Gene Bank* disponibilizado pelo site do fabricante das placas (<http://www.sabiosciences.com/genetable.php?pcatn=PAHS-033A>). Cosinor, $p < 0,05$

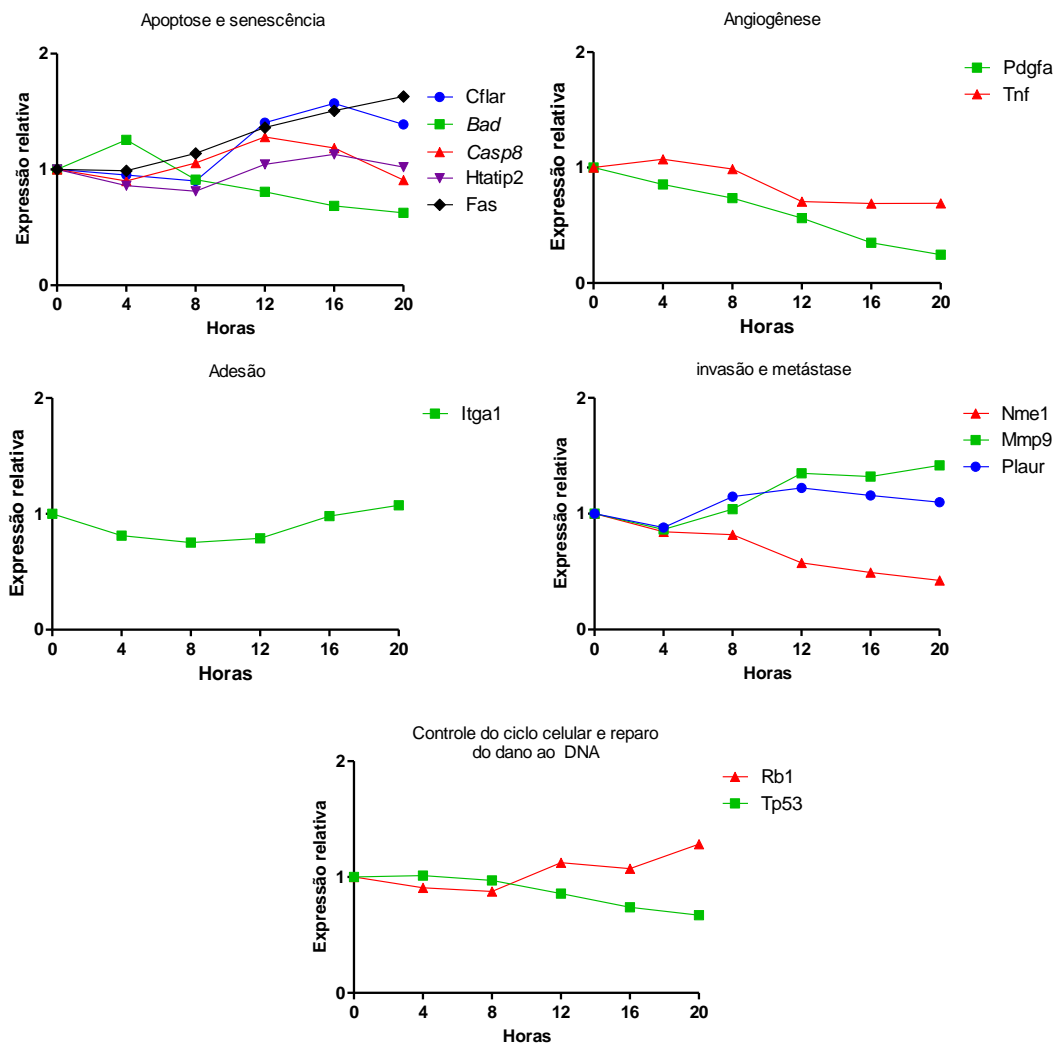
Os genes *Tp53* e *Rb1* estão envolvidos em funções relacionadas ao controle do ciclo celular e reparo ao dano do DNA, os genes *Bad*, *Casp8*, *Cflar*, *Fas* e *Htatip2* estão envolvidos em processos de apoptose e senescência celular, o gene *Itga1* em processos de adesão, *Pdgfa* e *Tnf* em processos de angiogênese e os genes *Mmp9*, *Plaur* e *Nme1*, envolvidos em processos de invasão e metástase (Tabela 6). A figura 9 mostra o perfil de expressão descritivo dos treze genes da placa agrupados de acordo com sua função.

Tabela 6. Classificação dos genes da placa de PCR Array de acordo com sua função.

FUNÇÃO	GENES
Controle do ciclo Celular e Reparo do dano ao DNA	<i>Atm</i> , <i>Brca1</i> , <i>Ccne1</i> , <i>Cdc25a</i> , <i>Cdk2</i> , <i>Cdk4</i> , <i>Cdkn1a</i> , <i>Cdkn2a</i> , <i>Chek2</i> , <i>E2f1</i> , <i>Mdm2</i> , <i>Rb1</i> , <i>S100a4</i> , <i>Tp53</i> .
Apoptose e Senescência celular	<i>Apaf1</i> , <i>Bad</i> , <i>Bax</i> , <i>Bcl2</i> , <i>Bcl2l1</i> , <i>Casp8</i> , <i>Cflar</i> , <i>Fas</i> , <i>Gzma</i> , <i>Htatip2</i> , <i>Tert</i> , <i>Tnfrsf1a</i> , <i>Tnfrsf10b</i> , <i>Tnfrsf25</i> .
Moléculas de transdução de sinal e Fatores de transcrição	<i>Akt1</i> , <i>ErbB2</i> , <i>Ets2</i> , <i>Fos</i> , <i>Jun</i> , <i>Map2k1</i> , <i>Myc</i> , <i>Nfkb1</i> , <i>Nfkbia</i> , <i>Pik3r1</i> , <i>Raf1</i> , <i>Sncg</i> .
Adesão	<i>Itga1</i> , <i>Itga2</i> , <i>Itga3</i> , <i>Itga4</i> , <i>ItgaV</i> , <i>Itgb1</i> , <i>Itgb3</i> , <i>Itgb5</i> , <i>Mcam</i> , <i>Mtss1</i> , <i>Pnn</i> , <i>Syk</i> , <i>Epdr1</i> .
Angiogênese	<i>Angpt1</i> , <i>Angpt2</i> , <i>Col18a1</i> , <i>Fgfr2</i> , <i>Ifna1</i> , <i>Ifnb1</i> , <i>Igf1</i> , <i>Il8</i> , <i>Pdgfa</i> , <i>Pdgfb</i> , <i>Tek</i> , <i>Tgfbr1</i> , <i>Thbs1</i> , <i>Tnf</i> , <i>Vegfa</i> .
Invasão e metástase	<i>Met</i> , <i>Mmp1</i> , <i>Mmp2</i> , <i>Mmp9</i> , <i>Mta1</i> , <i>Mta2</i> , <i>Nme1</i> , <i>Nme4</i> , <i>Plau</i> , <i>Plaur</i> , <i>S100a4</i> , <i>Serpinb5</i> , <i>Serpine1</i> , <i>Timp1</i> , <i>Timp3</i> , <i>Twist1</i> .

Os genes marcados em negrito são os que apresentaram cosinor positivo. FONTE: NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>), de acordo com o código do GeneBank disponibilizado pelo site do fabricante das placas (<http://www.sabiosciences.com/genetable.php?pcatn=PAHS-033A>)

Figura 9. Perfil de expressão dos genes de acordo com sua função.

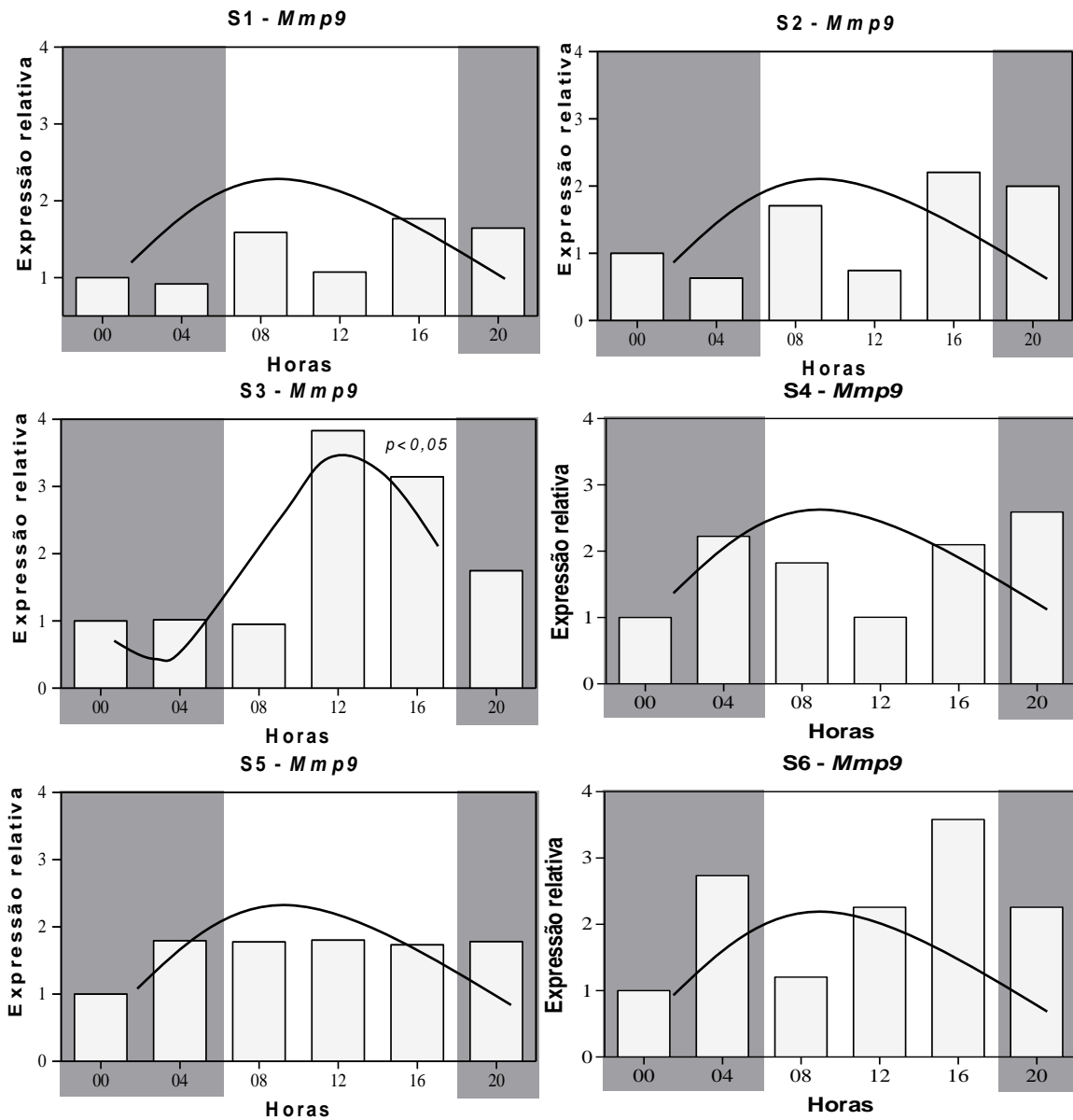


Gráficos descritivos mostrando o perfil de expressão dos 13 genes selecionados a partir do PCR Array agrupados de acordo com sua função.

5.5 Validação de genes selecionados a partir do teste cosinor

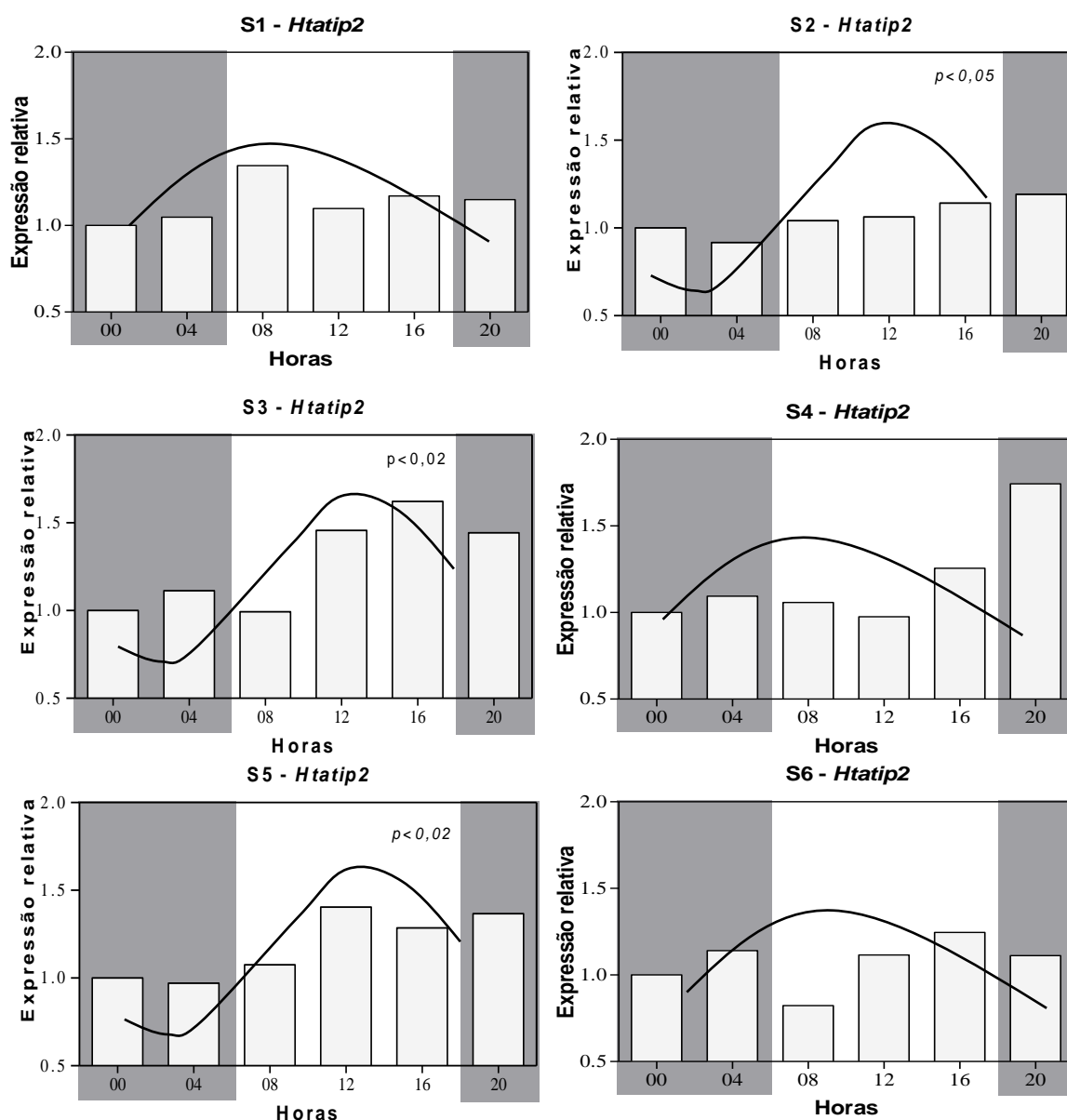
Dos 13 genes que apresentaram cosinor positivo nos testes de *PCR Array*, foram selecionados os genes *Casp8*, *Htatip2* e *Mmp9* para validação da expressão ao longo do dia, utilizando uma amostra ampliada com seis indivíduos.. As análises foram realizadas utilizando a normalização com os dois genes de referência (*Rpl13a* e *B2m*), previamente selecionados. Utilizando o teste cosinor, observamos inicialmente o perfil de expressão individual dos sujeitos para cada um dos três genes. Como podemos observar, para o gene *Mmp9* (Figura 10), o sujeito S3, bem como para o gene *Htatip2* (Figura 11), os sujeitos S2, S3 e S5 apresentaram significância estatística no nível de expressão ao longo do dia. Já para o gene *Casp8* (Figura 12), nenhum dos sujeitos apresentou alteração em sua expressão de maneira estatisticamente significativa.

Figura 10. Análise do perfil de expressão diária individual do gene *Mmp9* em leucócito total.



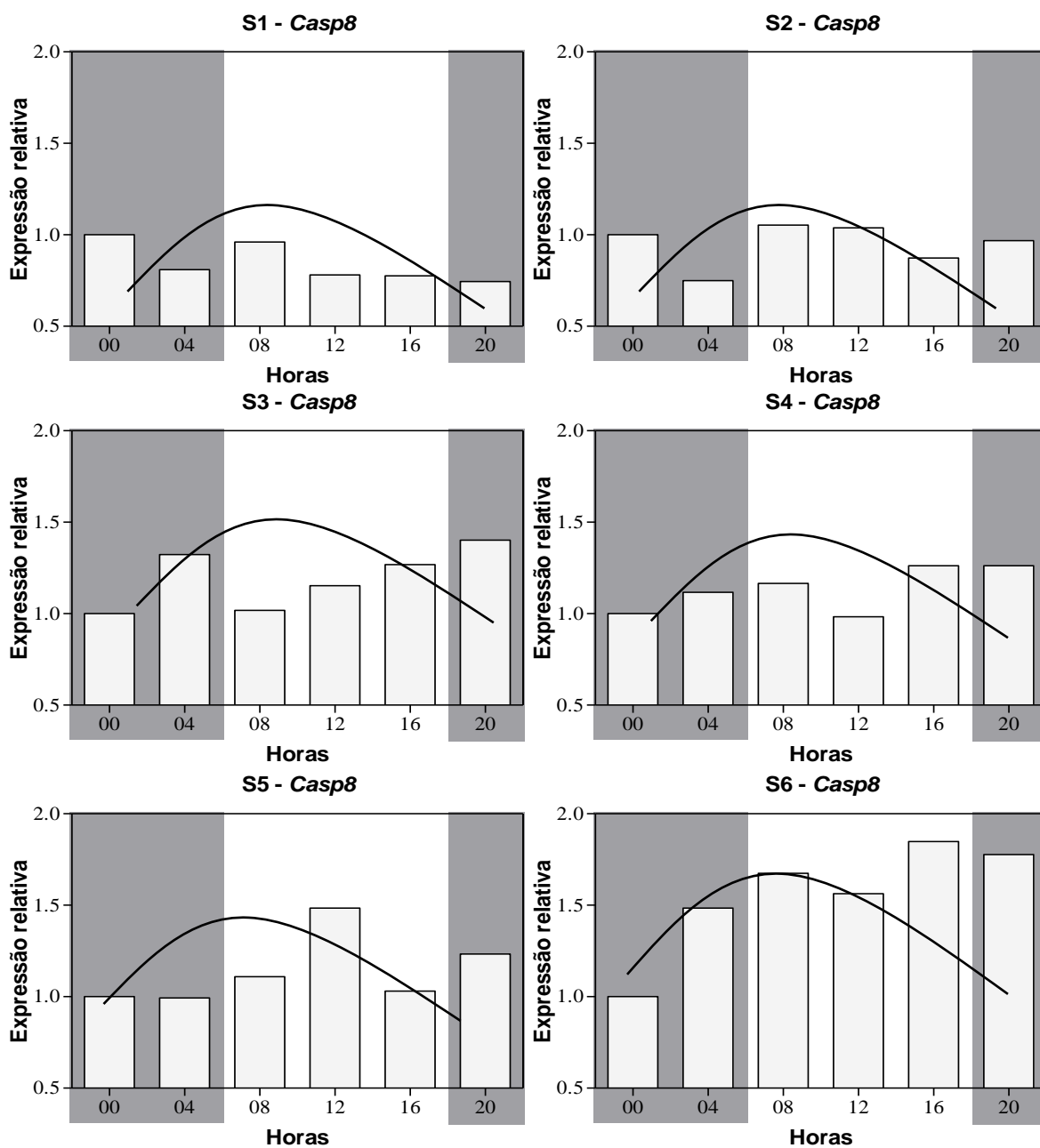
As barras representam o *fold change* (expressão relativa) para cada horário e a curva representa a variação ao longo do dia. Apenas o sujeito S3 apresentou significância estatística através do teste cosinor ($p < 0,05$). S1-S6 – Sujeitos 1 a 6.

Figura 11. Análise do perfil de expressão diária individual do gene *Htati2* em leucócito total.



As barras representam o *fold change* (expressão relativa) para cada horário e a curva representa a variação ao longo do dia. Os sujeitos S2, S3 e S5 apresentaram significância estatística através do teste cosinor ($p < 0,05$, $p < 0,02$ e $p < 0,02$, respectivamente). S1-S6 – Sujeitos 1 a 6.

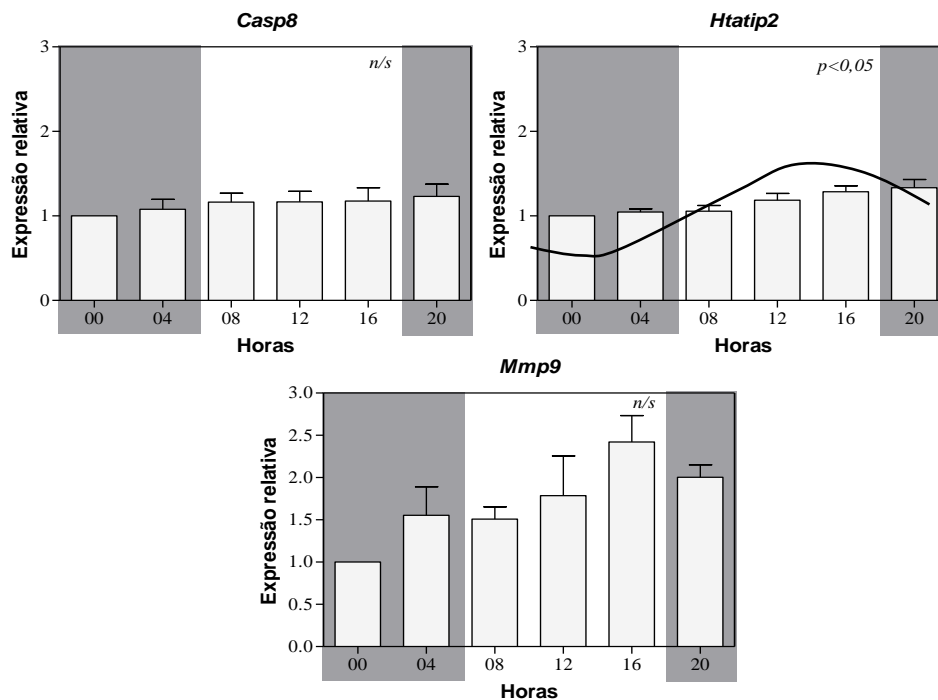
Figura 12. Análise do perfil de expressão diária individual do gene *Casp8* em leucócito total.



As barras representam o *fold change* (expressão relativa) para cada horário e a curva representa a variação ao longo do dia. Análises realizadas através do teste de cosinor. Nenhum sujeito apresentou diferença estatisticamente significativa. S1-S6 – Sujeitos 1 a 6.

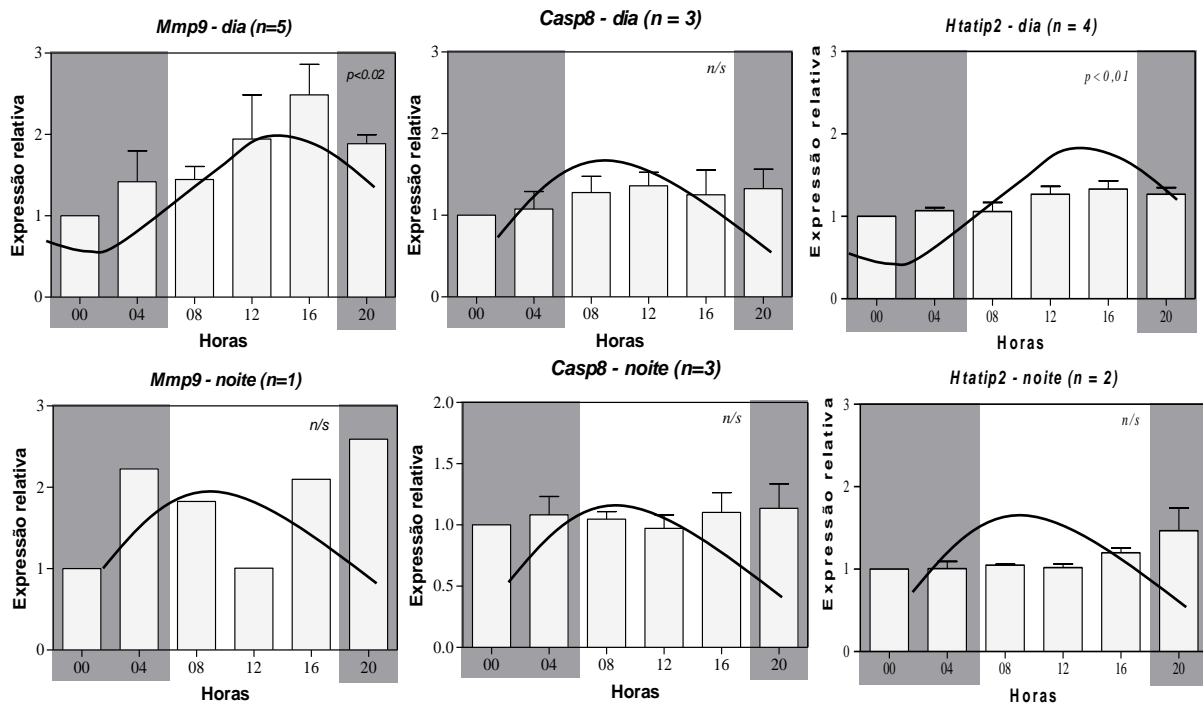
Ao analisar a média dos valores da expressão relativa (*fold change*) de todos os sujeitos agrupados para observar a variação diária de cada gene, encontramos um resultado estatisticamente significativo para o gene *Htatip2* (Figura 13). As análises realizadas com os genes *Casp8* e *Mpp9* não apresentaram significância, considerando os dados dos seis sujeitos agrupados pelas análises do cosinor. Além disso, também fizemos análises agrupando os sujeitos de acordo com a acrofase (dia ou noite). Como mostrado na figura 14, os genes *Mmp9* e *Htatip2* apresentaram resultados estatisticamente significantes para o período diurno, enquanto *Casp8* não apresentou significância. Nenhum gene apresentou valores significantes para as análises do período noturno.

Figura 13. Análise do perfil de expressão diária dos genes em leucócitos totais de 6 sujeitos através do teste cosinor. Média do *fold change* de todos os sujeitos para cada gene.



As barras representam a média do *fold change* (expressão relativa) dos seis sujeitos para cada horário e a curva representa a variação ao longo do dia. Análises realizadas através do teste de cosinor com significância estatística para o gene *Htatip2* ($p < 0,05$). n/s: não significativo.

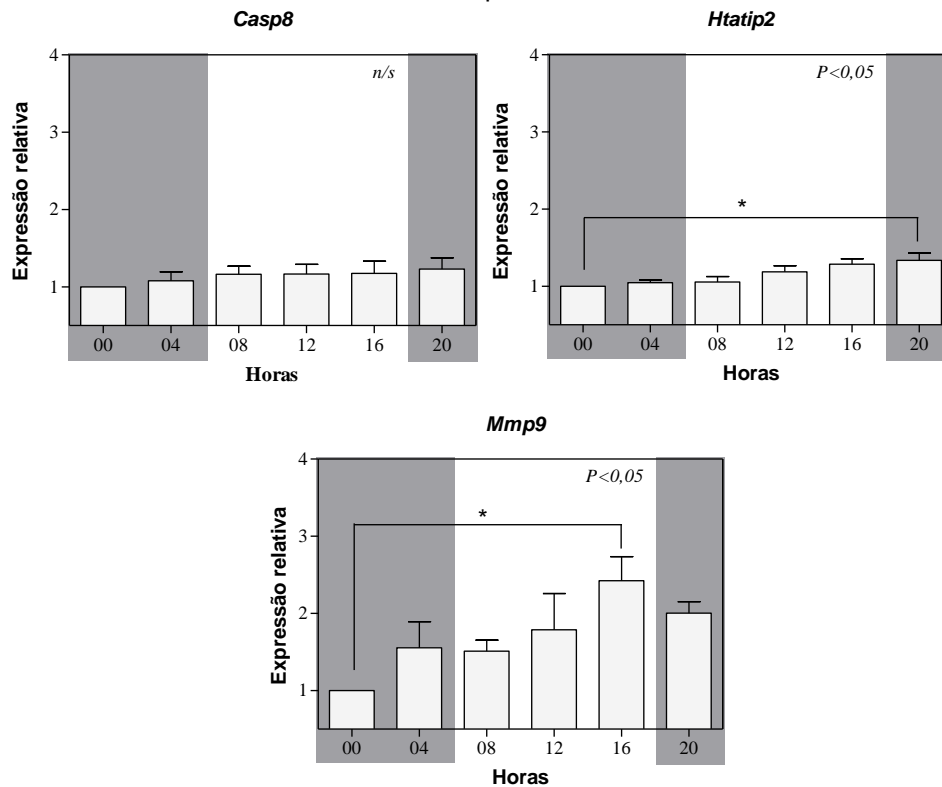
Figura 14. Análise do perfil de expressão diária dos genes em leucócitos totais através do teste cosinor. Média do *fold change* dos sujeitos agrupados por fase (dia/noite).



As barras representam a média do *fold change* (expressão relativa) dos seis sujeitos para cada horário e a curva representa a variação ao longo do dia. Análises realizadas através do teste de cosinor com significância estatística para *Mmp9* – dia ($p < 0,02$) e para *Htatip2* – dia ($p < 0,01$). n/s: não significativo.

Além do teste de cosinor, onde avaliamos se os dados se ajustaram a uma curva cosseno no tempo de 24 horas, nós fizemos análises através do teste *One-way* ANOVA, para observar diferenças entre os pontos. Na figura 15 estão representadas as variações diárias da média dos sujeitos ($n=6$), onde observamos uma diferença estatística significativa para o gene *Htatip2* entre os pontos 0 e 20 horas e para o gene *Mmp9* entre os pontos 0 e 16 horas.

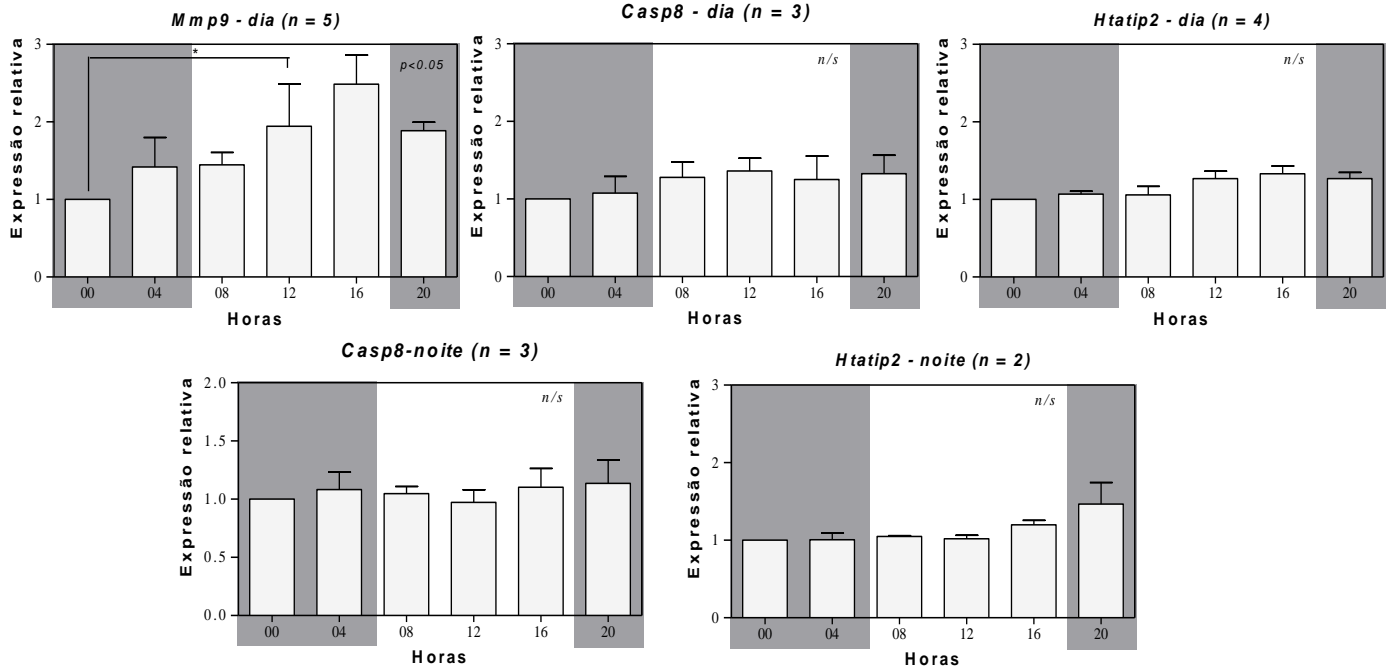
Figura 15. Variações diárias dos genes em amostras de leucócitos totais de 6 sujeitos analisada por ANOVA.



Para o teste estatístico foram usados os dados de expressão relativa (*Fold change*). Os dados estão representados com a média \pm desvio padrão. *One-way* ANOVA e pós-teste Bonferroni ($p < 0,05$).

Ao fazermos essa análise agrupando os sujeitos de acordo com a acrofase, observamos uma diferença estatística significativa apenas para o gene *Mmp9* durante o dia entre os pontos 0 e 12 horas (Figura 16). Não foi possível fazer o teste estatístico para a fase da noite do gene *Mmp9*, pois apenas 1 sujeito apresentou acrofase para este período.

Figura 16. Variações diárias dos genes em amostras de leucócitos totais dos sujeitos analisada por ANOVA. Média do *fold change* dos sujeitos agrupados por fase (dia/noite).



Para o teste estatístico foram usados os dados de expressão relativa (*Fold change*). Os dados estão representados com a média \pm desvio padrão. *One-way* ANOVA e pós-teste Bonferroni ($p < 0,05$).

6 DISCUSSÃO

Diversos fatores podem levar a uma desregulação nos ritmos circadianos. Estes fatores podem ser ambientais, como a exposição à luz durante o período noturno, ou genéticos, como mutações e outras alterações nos genes do relógio, por exemplo (SHAMMUGAM, V. *et al*, 2013). Esta desregulação no ritmo circadiano está associada ao aparecimento de diferentes tipos de cânceres e outras doenças em humanos (SAVVIDIS e KOUTSILIERIS, 2012).

A regulação do ciclo celular pelo relógio circadiano já foi descrita em alguns estudos. Alguns *clock controlled genes* são responsáveis pela regulação dos pontos de checagem que ocorrem durante o ciclo. Sabe-se que os genes *p20* e *p21* são importantes reguladores da transição G1/S e são temporalmente expressos de uma maneira tecido-específica (GRECHEZ-CASSIAU *et al.*, 2008). Além disso, o ciclo celular também sofre regulação nos pontos de checagem S/G2 e G2/M por genes que são controlados pelo relógio como *Cyclin D1*, *c-Myc* e *Wee1* (MASRI, CERVANTES e SASSONE-CORSI, 2013).

Rana e colaboradores (2014) compararam o perfil de expressão dos genes controlados pelo relógio, e que estão envolvidos no ciclo celular, *Myc*, *Cyclin D1* e *Wee1* em indivíduos saudáveis e pacientes portadores de leucemia linfocítica crônica. Eles observaram que os genes *Myc* e *Cyclin D1* encontram-se super expressos enquanto o gene *Wee1* encontra-se sub expresso nos pacientes com leucemia quando comparados aos indivíduos saudáveis, isso acontece porque os genes do relógio *Per1*, *Per2* e *Bmal1* estão desregulados (RANA *et al.*, 2014)

Já se sabe que existe uma expressão circadiana de genes do relógio em leucócitos humanos (TAKIMOTO *et al.*, 2005; ARCHER *et al.*, 2008) e em roedores (FUKUYA *et al.*, 2007), mas além dos genes circadianos, outros genes controlados pelo relógio, incluindo aqueles envolvidos com o controle do ciclo celular, também podem estar sendo expressos de maneira circadiana nesse tecido. Determinar a expressão destes genes em condições normais é essencial para poder comparar os resultados quando há uma condição patológica, como o câncer. Neste aspecto, investigamos neste trabalho, o padrão de expressão ao longo de um ciclo circadiano de uma série de 84

marcadores tumorais em leucócitos totais isolados de sangue periférico humano.

6.1 Análise de estabilidade dos genes de referência

A normalização com genes de referência é uma etapa indispensável na quantificação relativa da expressão diferencial de genes alvo entre duas ou mais condições experimentais. O uso de genes de referência endógenos, teoricamente, consiste em uma tentativa de solucionar o problema de variações metodológicas que poderiam interferir na interpretação das diferenças de expressão. Esses genes de referência são geralmente escolhidos com base no pressuposto de sua expressão constitutiva, de função basal para as células, o que resultaria em pouca variação entre diferentes condições (BUSTIN *et al.*, 2005). Entretanto, vários estudos demonstram que estes genes podem sofrer interferência das condições experimentais (KAMPHUIS *et al.*, 2005; KOSIR *et al.*, 2010; BUENAFE, 2012). Assim, recomenda-se que, antes de proceder com a normalização dos dados de expressão gênica, seja feita uma avaliação da estabilidade de expressão de genes de referência candidatos na condição de estudo.

Na perspectiva de investigação da expressão circadiana de genes, a estabilidade de expressão significa que o gene não varia com o tempo (ciclo circadiano). Entretanto, estima-se que 30% do transcriptoma esteja sob regulação do sistema circadiano, incluindo diversos genes de função basal (TAKIMOTO *et al.*, 2005). Existem apenas três trabalhos publicados que avaliaram a estabilidade de expressão de genes de referência no ciclo circadiano. Entretanto, esses trabalhos foram realizados em glândula adrenal e fígado de camundongos (KOSIR *et al.*, 2010; BUENAFE, 2012), e em retina de ratos (KAMPHUIS *et al.*, 2005). Não existe nenhum estudo sobre a estabilidade de genes de referência em humanos ou em células do sangue para pesquisa de ritmos circadianos.

No nosso estudo, foi avaliada inicialmente a estabilidade de expressão dos genes de referência *B2m*, *Eif2a*, *18S rRNA*, *Gapdh*, *Rpl13a* e *Hprt1*. Estes genes foram selecionados com base em estudos com ritmos circadianos (KAMPHUIS *et al.*, 2005; KOSIR *et al.*, 2010) ou pelo uso frequente na literatura.

Ao realizar as análises de estabilidade dos genes de referência através do software *geNorm*, o programa gerou a combinação da melhor dupla para ser utilizada na normalização. Os genes *Rpl13a* e *Gapdh* mostraram maior estabilidade em sua expressão. Já o gene *Eif2a* foi apontado como o menos estável dentre os seis genes avaliados. Ao avaliarmos o padrão de expressão temporal desses genes, utilizando o teste cosinor, os genes *Eif2a*, *18S rRNA*, *Gapdh* e *Hprt1* apresentaram uma variação ao longo do dia e, por isso, foram excluídos das análises. Diante disso, os genes *B2m* e *Rpl13a* foram utilizados para normalizar os nossos dados.

Quando os dados de expressão de *Per3* foram normalizados com esta dupla, os testes estatísticos demonstraram significância, apontando para uma variação circadiana esperada do gene e a acrofase ocorreu em um momento similar ao relatado na literatura sobre a expressão deste gene em leucócitos (ARCHER *et al.*, 2008; WATANABE *et al.*, 2012). Entretanto, quando os dados foram normalizados com a dupla sugerida pelo *geNorm*, não foi possível observar variação diária de *Per3*. Desta forma, os dados sugerem que a abordagem com *geNorm* comumente utilizada nos ensaios de avaliação de estabilidade pode não ser adequada aos estudos com ritmos circadianos. Uma possível explicação para isto pode residir no fato de que o *geNorm* realiza cálculos de correlação entre os genes endógenos, pressupondo que uma maior correlação entre o perfil de expressão dos genes em diferentes condições experimentais resultaria de variações metodológicas, e não biológicas, apontando, desta forma, para genes com maior estabilidade. Além disto, genes com menor variação entre os sujeitos também seriam considerados mais estáveis.

No entanto, uma alta correlação entre dados dois genes nas condições experimentais de estudos circadianos não implica, obrigatoriamente, em uma maior estabilidade nestas condições, ou seja, ao longo do tempo. Isto porque estes genes podem possuir o mesmo perfil de variação temporal, incluindo acrofase e amplitude. Ainda, uma menor variação no tempo é mais significativa nesta avaliação de estabilidade, do que uma menor variação entre indivíduos, que podem, inclusive, apresentar diferenças na acrofase. A escolha de um gene de referência que apresente variação circadiana nos dados de expressão pode comprometer seriamente a análise dos dados.

Portanto, para estudos sobre a estabilidade de genes de referência na pesquisa de ritmos circadianos, sugerimos uma análise combinada utilizando *geNorm* e *cosinor* com dados brutos de Ct.

6.2 Análise das variações diárias na expressão de genes envolvidos com câncer.

Os resultados obtidos com análise da expressão dos marcadores tumorais mostraram um padrão de expressão gênica circadiana para determinados genes presentes na placa do *PCR Array*. Em um painel de 84 genes, foram identificados 13 genes (15,5%) com um padrão de expressão circadiano em amostras de leucócitos de indivíduos normais. Eles foram separados de acordo com sua função e, dessa forma, podemos observar que cinco deles estão classificados por sua função relacionada com processos de apoptose e senescência celular (*Bad*, *Casp8*, *Cflar*, *Htatip2* e *Fas*), três participam de processos de angiogênese (*Pdgfa* e *Tnf*), um de adesão celular (*Itga1*), outros três estão envolvidos em processos de invasão e metástase (*Mmp9*, *Plaur* e *Nme1*) e, por último, dois genes envolvidos no controle do ciclo celular e reparo do dano ao DNA (*Rb1* e *Tp53*).

É possível que outros genes possuam padrão circadiano de expressão que não tenha sido detectado na análise. Um exemplo são os genes *Myc* e *Mdm2* (FU *et al.*, 2002).

O gene *Tp53* (*p53*) que está envolvido na regulação do ciclo celular e reparo do dano ao DNA está sob controle do relógio circadiano (BJARNASON, JORDAN e SOTHERN, 1999; FU *et al.*, 2002). Alguns estudos demonstraram a variação de *p53* ao longo de 24 horas em amostras de medula óssea de camundongos *nude* (SUN *et al.*, 2002), e em mucosa oral de humanos (MATSUO *et al.*, 2003). Aqui, nós evidenciamos que o gene *Tp53* também apresenta uma variação circadiana em amostras de leucócitos normais de indivíduos saudáveis com pico de expressão durante a fase noturna.

A proteína BAD que é pró-apoptótica e pertence à família das proteínas BCL-2, e codificada pelo gene *Bad* (ANTONSSON e MARTINO, 2000) está associada, bem como outros genes envolvidos na apoptose, ao *Tp53*. Um

estudo mostrou que após um tratamento com agente nocivo ao DNA, o p53 super-regulado se liga à região promotora de diferentes genes-alvo como *Bad*, *Bax* e *Bid* para ativar sua transcrição e esse processo termina com a indução da apoptose através da liberação do citocromo c (JIANG, DU e WU, 2007). Estando o gene *Tp53* associado ao ritmo circadiano, podemos observar uma correlação entre ele e o gene *Bad*, que, em nossos experimentos, apresentou um perfil semelhante de expressão, ambos com acrofase durante o período noturno. Com isso, podemos sugerir que o gene *Bad* é controlado pelo relógio indiretamente através do gene *Tp53*.

Assim como o gene *Tp53*, o gene *Rb1* está envolvido no controle do ciclo celular, inibindo a progressão do ciclo quando hipofosforilado (NEVINS, 2001). Foi descrita uma associação da expressão deste gene com *Per2*, apresentando uma correlação positiva em tecidos tumorais de câncer colorretal em diferentes estágios (STORCELOVA *et al.*, 2013). Desta forma, podemos inferir que nossas análises corroboram a modulação da expressão de *Rb1* pelo sistema circadiano, mostrando que este gene apresenta uma variação circadiana em leucócitos.

O gene *Tnf* também já foi descrito por seu envolvimento com ritmo circadiano. O estudo de Liu e colaboradores (2010) demonstrou que *Tnfa* induz a expressão dos genes controlados pelo relógio *Dec1* e *Dec2* em células MCF-7 de câncer de mama (LIU *et al.*, 2010). Também já foi descrita uma variação circadiana na expressão do *Tnfa* em células *Natural killer* (NK) e em cérebro de ratos (BREDOW *et al.*, 1997; ARJONA e SARKAR, 2005). TNF α tem um importante papel no processo inflamatório e possui uma ação anti-tumoral por apresentar efeitos tóxicos nas células tumorais (SUGARMAN *et al.*, 1985). Por conta dessa atividade, o TNF α tem sido investigado como potencial agente anti-câncer para o tratamento de pacientes com câncer em estágio avançado, no entanto, alguns estudos clínicos de fase 1 indicaram que essa substância apresenta elevada toxicidade (FEINBERG *et al.*, 1988; CREAVER *et al.*, 1989). É interessante que a toxicidade dessas substâncias seja diminuída e o seu efeito seja aumentado e, para isso, podem ser realizados testes para avaliar o efeito da administração dessas substâncias em diferentes horários. Hrushesky e colaboradores (1994) fizeram uma pesquisa para observar a correlação entre a dose de TNF α e o horário de administração, avaliando a toxicidade em

camundongos BALB/c (HRUSHESKY *et al.*, 1994). Eles concluíram que a toxicidade da substância é altamente dependente do horário de administração, pois baixas doses em determinados horários causaram maior índice de letalidade que altas doses em outros horários (HRUSHESKY *et al.*, 1994).

Existe uma relação entre os genes *Tnf*, *Cflar* (*c-Flip*) e *Casp8* a qual já foi descrita. TNF α bloqueia a ação da proteína FLIP, que, por sua vez é capaz de inibir a ação das caspases 8 e 10 inibindo, assim, o processo apoptótico (URBANO, SOCCOL e AZEVEDO, 2014). Quando super-expresso, *Cflar* pode impedir que as células cancerígenas sofram apoptose, pois apresenta uma regulação negativa nesse processo, impedindo que ele aconteça nessas células (SAFA, DAY e WU, 2008; BAGNOLI, CANEVARI e MEZZANZANICA, 2010). Ao observar os resultados do nosso estudo, percebemos que há uma variação circadiana de maneira oposta entre *Tnf* e *Cflar*. Sabendo que *Tnf* é um gene controlado pelo relógio, podemos sugerir que, de alguma forma, *Cflar* também está sendo regulado por essa maquinaria de maneira oposta ao *Tnf*. Possivelmente, quando os níveis de *Tnf* caem, a expressão de *Cflar* aumente potencializando a ação desta proteína.

Já os níveis de expressão de *Casp8* apresentaram um padrão de expressão parecido com os de *Cflar*, com pico de expressão durante o dia. Entretanto, não foi possível identificar o padrão de expressão circadiano deste gene nos testes de validação com os seis sujeitos. Se uma substância fosse administrada em um paciente com câncer em um determinado horário do dia em que não causasse um alto nível de toxicidade, onde houvesse a inibição de FLIP e consequente indução da via apoptótica através das caspases nas células tumorais, seria uma forma interessante de coordenar a administração da droga de maneira circadiana.

O gene *Htatip2*, também conhecido como *Tip30* ou *Cc3*, codifica proteínas com função anti-tumoral pois induzem apoptose nessas células (EL OMARI *et al.*, 2005). Ele é bem descrito em vários trabalhos na literatura por sua atividade de supressão de tumor e sua sub-regulação é descrita como responsável pela promoção de metástase em câncer de pulmão e também no desenvolvimento de outros cânceres como melanoma, câncer de cólon, câncer de mama, neuroblastoma e carcinoma hepatocelular (SHTIVELMAN, 1997; NICAMHLAOIBH e SHTIVELMAN, 2001; ITO *et al.*, 2003; TONG *et al.*, 2009).

Até onde sabemos, nenhum estudo foi realizado com esse gene associando seu perfil de expressão com análises circadianas. Os nossos dados mostraram consistentemente um perfil de expressão circadiana deste gene.

Em tumores sólidos, a sinalização do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) participa na indução e angiogênese do tumor, estimulação autócrina no crescimento das células tumorais e outros (BETSHOLTZ, KARLSSON e LINDAHL, 2001). Um estudo demonstrou que a atividade de tirosina quinase do receptor de PDGF varia de acordo com o período do dia (NAKAGAWA *et al.*, 2006). Outra pesquisa com camundongos mostrou que a administração contínua de um inibidor de receptor de tirosina quinase PDGF diminuiu a fosforilação do receptor acompanhado pela modulação da ritmicidade da síntese de DNA em células tumorais (NAKAGAWA *et al.*, 2008). A ativação cíclica desses receptores de PDGF em células tumorais parece modular o ritmo da proliferação das células do tumor através da indução da expressão de vários tipos de reguladores do ciclo celular (NAKAGAWA *et al.*, 2008).

As integrinas são receptores de superfície que desempenham uma atividade importante na migração e adesão celular (HYNES, 1992). A integrina alfa 1 (ITGA1) está relacionada com doenças inflamatórias mediadas por células T (CHAPMAN e TOPHAM, 2010; CHEN *et al.*, 2014). O estudo de Yim e colaboradores (2013) mostraram a associação de um polimorfismo no gene *Itga1* com risco de câncer gástrico, sugerindo que as integrinas alfa 1 estejam envolvidas podem estar envolvidos no desenvolvimento desse tipo de câncer (YIM *et al.*, 2013).

As metaloproteinases de matriz (MMPs) são as principais proteinases que participam da degradação da matriz extracelular (NAGASE e WOESSNER, 1999) e atuam de diferentes formas nos processos biológicos normais dos organismos, participando do desenvolvimento embrionário, morfogênese e remodelamento de tecidos, migração celular, cicatrização de feridas, dentre outros. (VU e WERB, 2000). Conseguimos observar que, embora o teste de cosinor com a média dos sujeitos não tenha apresentado variação para o gene *Mmp9*, uma variação foi vista entre os pontos 0 e 16 horas, utilizando ANOVA. As análises realizadas através do teste ANOVA foram utilizadas para visualizar

a diferença entre os pontos de coleta (horários), já que o perfil de expressão pode não ser ajustado ao de uma curva coseno.

Outro gene que também está envolvido em processos de invasão e metástase é o *Nme1* (*Nm23-H1*). O estudo de Koppers e colaboradores (2005) demonstrou que a associação entre EBNA3C (*Epstein-Barr virus latent protein*) e o supressor de metástase NME1 (NM23-H1) pode levar ao aumento da atividade metastática de células tumorais através da elevação da expressão de MMP9. Isso acontece devido ao aumento da degradação de colágeno IV, maior componente da membrana basal e isso, possivelmente resulta no aumento da metástase em sítios de tumores primários (KUPPERS *et al.*, 2005). Os genes *Mmp9* e *Nme1* estão expressos em anti-fase na análise dos nossos dados. Estes genes pode, assim, ter uma expressão coordenada pelo ritmo circadiano, contribuindo para a atividade destes genes no controle migratório celular.

O receptor de uroquinase *Plaur* é um dos reguladores do ativador de plasminogênio tipo uroquinase (uPA), que está envolvido na degradação de proteínas da matriz extracelular, destruição de tecido e migração celular (HOYER-HANSEN *et al.*, 1992). Essa ativação de uPA acontece nas células que expressam PLAUR, como monócitos, granulócitos, células endoteliais, dentre outras (PLESNER *et al.*, 1994). Já foi demonstrado que PLAUR é necessário para o recrutamento de leucócitos dependentes de β 2-integrina em locais de inflamação aguda, indicando seu importante papel para adesão de leucócitos (MAY *et al.*, 1998). Lanza e colaboradores (1998) conseguiram detectar a expressão de PLAUR em neutrófilos e monócitos de sangue periférico de indivíduos saudáveis e foi possível detectar diferentes níveis de expressão em células de leucemia mielóide aguda e leucemia linfoblástica, sugerindo que PLAUR pode ser considerado um marcador sensível para detectar células leucêmicas comprometidas com a linhagem mielóide (LANZA *et al.*, 1998).

O conjunto de dados mostra que diversos marcadores tumorais presentes em diferentes tipos de câncer podem ser modulados pelo ritmo circadiano. Embora este padrão de expressão tenha sido identificado em leucócitos normais, ele deve ser também encontrado em outros tecidos, tendo em vista a expressão ubíqua dos genes circadianos. Desta forma, considerar o padrão temporal de expressão destes genes pode ser relevante para o

diagnóstico de tumores, considerando que os níveis de expressão destes genes variam no tempo, e identificar um limiar normal de expressão pode depender do momento da análise. Ainda, estas informações podem contribuir para o entendimento dos mecanismos que levam ao desenvolvimento de diferentes tumores, além de potencialmente contribuir para o estabelecimento de novas abordagens terapêuticas. De fato, a Cronofarmacologia tem sido estudada, principalmente com o intuito de diminuir os efeitos colaterais da administração de determinadas substâncias, principalmente em pacientes com câncer (LEVI *et al.*, 2008). A relevância da expressão circadiana destes genes no contexto normal da hematopoiese e do funcionamento destas células ainda precisa ser esclarecido.

7. CONCLUSÕES

- O estudo mostra genes candidatos para serem utilizados como normalizadores em estudos de ritmicidade circadiana em amostras de leucócitos totais humanos;
- Os dados de estabilidade obtidos com o programa *geNorm*, comumente utilizado para este fim na pesquisa de genes endógenos, pode não ser adequado para estudos de ritmos circadianos, tendo em vista que um dos genes mais estáveis sugeridos pelo programa apresentou variação circadiana, de acordo com teste cosinor. Além disto, os dados de expressão do gene circadiano *Per3* apresentaram significância na análise de variação diurna apenas quando foi normalizado com a dupla que não apresentou variação no teste cosinor:
- Sete dos treze genes com variação diurna apresentaram um padrão de expressão com acrofase durante o período noturno, enquanto seis apresentaram acrofase durante o período diurno;
- O perfil de expressão observado de alguns genes pode indicar uma coordenação da expressão, modulada pelo ritmo circadiano, com impacto funcional.
- Dos 3 genes selecionados para validação do padrão circadiano de expressão, os genes *Htatip2* e *Mmp9* mostraram variação estatística significativa nas avaliações em um ou mais sujeitos;
- O estudo descreve pela primeira vez a expressão rítmica de alguns genes relacionados com câncer, servindo como base para estudos posteriores.

REFERÊNCIAS

- AARDAL, N. P.; LAERUM, O. D. Circadian variations in mouse bone marrow. **Exp Hematol**, v. 11, n. 9, p. 792-801, 1983.
- AKASHI, M. et al. Control of intracellular dynamics of mammalian period proteins by casein kinase I epsilon (CKIepsilon) and CKIdelta in cultured cells. **Mol Cell Biol**, v. 22, n. 6, p. 1693-703, 2002.
- ANTLE, M. C.; SILVER, R. Orchestrating time: arrangements of the brain circadian clock. **Trends Neurosci**, v. 28, n. 3, p. 145-51, 2005.
- ANTONSSON, B.; MARTINOU, J. C. The Bcl-2 protein family. **Exp Cell Res**, v. 256, n. 1, p. 50-7, 2000.
- ARCHER, S. N. et al. Inter-individual differences in habitual sleep timing and entrained phase of endogenous circadian rhythms of BMAL1, PER2 and PER3 mRNA in human leukocytes. **Sleep**, v. 31, n. 5, p. 608-17, 2008.
- ARJONA, A.; SARKAR, D. K. Circadian oscillations of clock genes, cytolytic factors, and cytokines in rat NK cells. **J Immunol**, v. 174, n. 12, p. 7618-24, 2005.
- BAGNOLI, M.; CANEVARI, S.; MEZZANZANICA, D. Cellular FLICE-inhibitory protein (c-FLIP) signalling: a key regulator of receptor-mediated apoptosis in physiologic context and in cancer. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 42, n. 2, p. 210-3, 2010.
- BARTOK, O. et al. Adaptation of molecular circadian clockwork to environmental changes: a role for alternative splicing and miRNAs. **Proc Biol Sci**, v. 280, n. 1765, p. 20130011, 2013.
- BEERSMA, D. G.; GORDIJN, M. C. Circadian control of the sleep-wake cycle. **Physiol Behav**, v. 90, n. 2-3, p. 190-5, 2007.
- BERGER, J. A two-clock model of circadian timing in the immune system of mammals. **Pathol Biol (Paris)**, v. 56, n. 5, p. 286-91, 2008.
- BESEDOVSKY, L.; LANGE, T.; BORN, J. Sleep and immune function. **Pflugers Arch**, v. 463, n. 1, p. 121-37, 2012.
- BETSHOLTZ, C.; KARLSSON, L.; LINDAHL, P. Developmental roles of platelet-derived growth factors. **Bioessays**, v. 23, n. 6, p. 494-507, 2001.
- BJARNASON, G. A.; JORDAN, R. C.; SOTHERN, R. B. Circadian variation in the expression of cell-cycle proteins in human oral epithelium. **Am J Pathol**, v. 154, n. 2, p. 613-22, 1999.

BOIVIN, D. B. et al. Circadian clock genes oscillate in human peripheral blood mononuclear cells. **Blood**, v. 102, n. 12, p. 4143-5, 2003.

BREDOW, S. et al. Diurnal variations of tumor necrosis factor alpha mRNA and alpha-tubulin mRNA in rat brain. **Neuroimmunomodulation**, v. 4, n. 2, p. 84-90, 1997.

BUENAFE, A. C. Diurnal rhythms are altered in a mouse model of multiple sclerosis. **J Neuroimmunol**, v. 243, n. 1-2, p. 12-7, 2012.

BUHR, E. D.; TAKAHASHI, J. S. Molecular components of the Mammalian circadian clock. **Handb Exp Pharmacol**, n. 217, p. 3-27, 2013.

BUSTIN, S. A. et al. Quantitative real-time RT-PCR--a perspective. **J Mol Endocrinol**, v. 34, n. 3, p. 597-601, 2005.

CANAPLE, L.; KAKIZAWA, T.; LAUDET, V. The days and nights of cancer cells. **Cancer Res**, v. 63, n. 22, p. 7545-52, 2003.

CARDONE, L. et al. Circadian clock control by SUMOylation of BMAL1. **Science**, v. 309, n. 5739, p. 1390-4, 2005.

CHAPMAN, T. J.; TOPHAM, D. J. Identification of a unique population of tissue-memory CD4+ T cells in the airways after influenza infection that is dependent on the integrin VLA-1. **J Immunol**, v. 184, n. 7, p. 3841-9, 2010.

CHEN, S. T. et al. Deregulated expression of the PER1, PER2 and PER3 genes in breast cancers. **Carcinogenesis**, v. 26, n. 7, p. 1241-6, 2005.

CHEN, Y. et al. CD49a promotes T-cell-mediated hepatitis by driving T helper 1 cytokine and interleukin-17 production. **Immunology**, v. 141, n. 3, p. 388-400, 2014.

CHEN, Y. G. et al. Expression of mPer1 and mPer2, two mammalian clock genes, in murine bone marrow. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 276, n. 2, p. 724-8, 2000.

CREAVEN, P. J. et al. A phase I clinical trial of recombinant human tumor necrosis factor given daily for five days. **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 23, n. 3, p. 186-91, 1989.

DRUZD, D.; DE JUAN, A.; SCHEIERMANN, C. Circadian rhythms in leukocyte trafficking. **Semin Immunopathol**, 2014.

EL OMARI, K. et al. Crystal structure of CC3 (TIP30): implications for its role as a tumor suppressor. **J Biol Chem**, v. 280, n. 18, p. 18229-36, 2005.

FEINBERG, B. et al. A phase I trial of intravenously-administered recombinant tumor necrosis factor-alpha in cancer patients. **J Clin Oncol**, v. 6, n. 8, p. 1328-34, 1988.

FIGUEREDO, D.S., *Identificação de microRNAs candidatos a modulação de ritmos circadianos: análise in silico e de expressão gênica diferencial em leucócitos humanos isolados ao longo do período circadiano*. 2013. 96f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2013.

FU, L. et al. The circadian gene *Period2* plays an important role in tumor suppression and DNA damage response in vivo. **Cell**, v. 111, n. 1, p. 41-50, 2002.

FUKUYA, H. et al. Circadian expression of clock genes in human peripheral leukocytes. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 354, n. 4, p. 924-8, 2007.

GERY, S.; KOEFFLER, H. P. Circadian rhythms and cancer. **Cell Cycle**, v. 9, n. 6, p. 1097-103, 2010.

GIMBLE, J. M.; FLOYD, Z. E.; BUNNELL, B. A. The 4th dimension and adult stem cells: Can timing be everything? **J Cell Biochem**, v. 107, n. 4, p. 569-78, 2009.

GOLOMBEK, D. A.; ROSENSTEIN, R. E. Physiology of circadian entrainment. **Physiol Rev**, v. 90, n. 3, p. 1063-102, 2010.

GRECHEZ-CASSIAU, A. et al. The circadian clock component *BMAL1* is a critical regulator of *p21WAF1/CIP1* expression and hepatocyte proliferation. **J Biol Chem**, v. 283, n. 8, p. 4535-42, 2008.

GUAY, C. et al. Diabetes mellitus, a microRNA-related disease? **Transl Res**, v. 157, n. 4, p. 253-64, 2011.

HALBERG, F. Some physiological and clinical aspects of 24-hour periodicity. **J Lancet**, v. 73, n. 1, p. 20-32, 1953.

HANSEN, J. Increased breast cancer risk among women who work predominantly at night. **Epidemiology**, v. 12, n. 1, p. 74-7, 2001.

HARMER, S. L.; PANDA, S.; KAY, S. A. Molecular bases of circadian rhythms. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v. 17, p. 215-53, 2001.

HASTINGS, M. H.; REDDY, A. B.; MAYWOOD, E. S. A clockwork web: circadian timing in brain and periphery, in health and disease. **Nat Rev Neurosci**, v. 4, n. 8, p. 649-61, 2003.

HAUS, E.; SMOLENSKY, M. H. Biologic rhythms in the immune system. **Chronobiol Int**, v. 16, n. 5, p. 581-622, 1999.

HERZOG, E. D.; TAKAHASHI, J. S.; BLOCK, G. D. Clock controls circadian period in isolated suprachiasmatic nucleus neurons. **Nat Neurosci**, v. 1, n. 8, p. 708-13, 1998.

HEUSTON, E. F.; LEMON, K. T.; ARCECI, R. J. The Beginning of the Road for Non-Coding RNAs in Normal Hematopoiesis and Hematologic Malignancies. **Front Genet**, v. 2, p. 94, 2011.

HIROTA, T. et al. High-throughput chemical screen identifies a novel potent modulator of cellular circadian rhythms and reveals CKIalpha as a clock regulatory kinase. **PLoS Biol**, v. 8, n. 12, p. e1000559, 2010.

HOFFMAN, A. E. et al. The circadian gene NPAS2, a putative tumor suppressor, is involved in DNA damage response. **Mol Cancer Res**, v. 6, n. 9, p. 1461-8, 2008.

HONMA, S. et al. Circadian periods of single suprachiasmatic neurons in rats. **Neurosci Lett**, v. 250, n. 3, p. 157-60, 1998.

HOYER-HANSEN, G. et al. Urokinase plasminogen activator cleaves its cell surface receptor releasing the ligand-binding domain. **J Biol Chem**, v. 267, n. 25, p. 18224-9, 1992.

HRUSHESKY, W. J. et al. Circadian dynamics of tumor necrosis factor alpha (cachectin) lethality. **J Exp Med**, v. 180, n. 3, p. 1059-65, 1994.

HUISMAN, S. A. et al. Colorectal liver metastases with a disrupted circadian rhythm phase shift the peripheral clock in liver and kidney. **Int J Cancer**, 2014.

HYNES, R. O. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. **Cell**, v. 69, n. 1, p. 11-25, 1992.

ITO, M. et al. TIP30 deficiency increases susceptibility to tumorigenesis. **Cancer Res**, v. 63, n. 24, p. 8763-7, 2003.

JIANG, P.; DU, W.; WU, M. p53 and Bad: remote strangers become close friends. **Cell Res**, v. 17, n. 4, p. 283-5, 2007.

KAMPHUIS, W. et al. Circadian expression of clock genes and clock-controlled genes in the rat retina. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 330, n. 1, p. 18-26, 2005.

KARATSOREOS, I. N. et al. Phenotype matters: identification of light-responsive cells in the mouse suprachiasmatic nucleus. **J Neurosci**, v. 24, n. 1, p. 68-75, 2004.

KEENE, J. D. Minireview: global regulation and dynamics of ribonucleic Acid. **Endocrinology**, v. 151, n. 4, p. 1391-7, 2010.

KELLEHER, F. C.; RAO, A.; MAGUIRE, A. Circadian molecular clocks and cancer. **Cancer Lett**, v. 342, n. 1, p. 9-18, 2014.

KENNAWAY, D. J. et al. Functional central rhythmicity and light entrainment, but not liver and muscle rhythmicity, are Clock independent. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 291, n. 4, p. R1172-80, 2006.

KENNAWAY, D. J. et al. Melatonin in mice: rhythms, response to light, adrenergic stimulation, and metabolism. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 282, n. 2, p. R358-65, 2002.

KOK, P. et al. Increased circadian prolactin release is blunted after body weight loss in obese premenopausal women. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 290, n. 2, p. E218-24, 2006.

KONDRATOV, R. V. et al. BMAL1-dependent circadian oscillation of nuclear CLOCK: posttranslational events induced by dimerization of transcriptional activators of the mammalian clock system. **Genes Dev**, v. 17, n. 15, p. 1921-32, 2003.

KONOPKA, R. J.; BENZER, S. Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 68, n. 9, p. 2112-6, 1971.

KOSIR, R. et al. Determination of reference genes for circadian studies in different tissues and mouse strains. **BMC Mol Biol**, v. 11, p. 60, 2010.

KRONFOL, Z. et al. Circadian immune measures in healthy volunteers: relationship to hypothalamic-pituitary-adrenal axis hormones and sympathetic neurotransmitters. **Psychosom Med**, v. 59, n. 1, p. 42-50, 1997.

KUBO, T. et al. Prospective cohort study of the risk of prostate cancer among rotating-shift workers: findings from the Japan collaborative cohort study. **Am J Epidemiol**, v. 164, n. 6, p. 549-55, 2006.

KUO, S. J. et al. Disturbance of circadian gene expression in breast cancer. **Virchows Arch**, v. 454, n. 4, p. 467-74, 2009.

KUPPERS, D. A. et al. Regulation of matrix metalloproteinase 9 expression by Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C and the suppressor of metastasis Nm23-H1. **J Virol**, v. 79, n. 15, p. 9714-24, 2005.

LAERUM, O. D. Hematopoiesis occurs in rhythms. **Exp Hematol**, v. 23, n. 11, p. 1145-7, 1995.

LANZA, F. et al. Expression and functional role of urokinase-type plasminogen activator receptor in normal and acute leukaemic cells. **Br J Haematol**, v. 103, n. 1, p. 110-23, 1998.

LEE, C. et al. Posttranslational mechanisms regulate the mammalian circadian clock. **Cell**, v. 107, n. 7, p. 855-67, 2001.

LEE, J. et al. Dual modification of BMAL1 by SUMO2/3 and ubiquitin promotes circadian activation of the CLOCK/BMAL1 complex. **Mol Cell Biol**, v. 28, n. 19, p. 6056-65, 2008.

LEHMAN, M. N. et al. Circadian rhythmicity restored by neural transplant. Immunocytochemical characterization of the graft and its integration with the host brain. **J Neurosci**, v. 7, n. 6, p. 1626-38, 1987.

LEVI, F. et al. Implications of circadian clocks for the rhythmic delivery of cancer therapeutics. **Philos Trans A Math Phys Eng Sci**, v. 366, n. 1880, p. 3575-98, 2008.

LEVI, F.; BLAZSEK, I.; FERLE-VIDOVIC, A. Circadian and seasonal rhythms in murine bone marrow colony-forming cells affect tolerance for the anticancer agent 4'-O-tetrahydropyranlyadriamycin (THP). **Exp Hematol**, v. 16, n. 8, p. 696-701, 1988.

LI, J. C.; XU, F. Influences of light-dark shifting on the immune system, tumor growth and life span of rats, mice and fruit flies as well as on the counteraction of melatonin. **Biol Signals**, v. 6, n. 2, p. 77-89, 1997.

LI, X. M. et al. A circadian clock transcription model for the personalization of cancer chronotherapy. **Cancer Res**, v. 73, n. 24, p. 7176-88, 2013.

LIU, C. et al. Cellular construction of a circadian clock: period determination in the suprachiasmatic nuclei. **Cell**, v. 91, n. 6, p. 855-60, 1997.

LIU, Y. et al. Anti-apoptotic effect of the basic helix-loop-helix (bHLH) transcription factor DEC2 in human breast cancer cells. **Genes Cells**, v. 15, n. 4, p. 315-25, 2010.

LOWREY, P. L. et al. Positional syntenic cloning and functional characterization of the mammalian circadian mutation tau. **Science**, v. 288, n. 5465, p. 483-92, 2000.

LUO, W.; SEHGAL, A. Regulation of circadian behavioral output via a MicroRNA-JAK/STAT circuit. **Cell**, v. 148, n. 4, p. 765-79, 2012.

MASRI, S.; CERVANTES, M.; SASSONE-CORSI, P. The circadian clock and cell cycle: interconnected biological circuits. **Curr Opin Cell Biol**, v. 25, n. 6, p. 730-4, 2013.

MATSUO, T. et al. Control mechanism of the circadian clock for timing of cell division in vivo. **Science**, v. 302, n. 5643, p. 255-9, 2003.

MAY, A. E. et al. Urokinase receptor (CD87) regulates leukocyte recruitment via beta 2 integrins in vivo. **J Exp Med**, v. 188, n. 6, p. 1029-37, 1998.

MEGDAL, S. P. et al. Night work and breast cancer risk: a systematic review and meta-analysis. **Eur J Cancer**, v. 41, n. 13, p. 2023-32, 2005.

MERROW, M.; SPOELSTRA, K.; ROENNEBERG, T. The circadian cycle: daily rhythms from behaviour to genes. **EMBO Rep**, v. 6, n. 10, p. 930-5, 2005.

MINAMI, Y. et al. Measurement of internal body time by blood metabolomics. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 24, p. 9890-5, 2009.

MOORE, R. Y.; EICHLER, V. B. Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. **Brain Res**, v. 42, n. 1, p. 201-6, 1972.

NAGASE, H.; WOESSNER, J. F., JR. Matrix metalloproteinases. **J Biol Chem**, v. 274, n. 31, p. 21491-4, 1999.

NAKAGAWA, H. et al. Modulation of circadian rhythm of DNA synthesis in tumor cells by inhibiting platelet-derived growth factor signaling. **J Pharmacol Sci**, v. 107, n. 4, p. 401-7, 2008.

NAKAGAWA, H. et al. Basis for dosing time-dependent change in the anti-tumor effect of imatinib in mice. **Biochem Pharmacol**, v. 72, n. 10, p. 1237-45, 2006.

NEVINS, J. R. The Rb/E2F pathway and cancer. **Hum Mol Genet**, v. 10, n. 7, p. 699-703, 2001.

NICAMHLAOIBH, R.; SHTIVELMAN, E. Metastasis suppressor CC3 inhibits angiogenic properties of tumor cells in vitro. **Oncogene**, v. 20, n. 2, p. 270-5, 2001.

OKAMURA, H. et al. Mammalian circadian clock system: Molecular mechanisms for pharmaceutical and medical sciences. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 62, n. 9-10, p. 876-84, 2010.

PALMA, C. A. et al. MicroRNA control of myelopoiesis and the differentiation block in acute myeloid leukaemia. **J Cell Mol Med**, v. 16, n. 5, p. 978-87, 2012.

PANDA, S. et al. Coordinated transcription of key pathways in the mouse by the circadian clock. **Cell**, v. 109, n. 3, p. 307-20, 2002.

PERPOINT, B. et al. In vitro chronopharmacology of recombinant mouse IL-3, mouse GM-CSF, and human G-CSF on murine myeloid progenitor cells. **Exp Hematol**, v. 23, n. 4, p. 362-8, 1995.

PLESNER, T. et al. Expression of the receptor for urokinase-type plasminogen activator in normal and neoplastic blood cells and hematopoietic tissue. **Am J Clin Pathol**, v. 102, n. 6, p. 835-41, 1994.

RALPH, M. R.; MENAKER, M. A mutation of the circadian system in golden hamsters. **Science**, v. 241, n. 4870, p. 1225-7, 1988.

RANA, S.; MAHMOOD, S. Circadian rhythm and its role in malignancy. **J Circadian Rhythms**, v. 8, p. 3, 2010.

RANA, S. et al. Deregulated expression of circadian clock and clock-controlled cell cycle genes in chronic lymphocytic leukemia. **Mol Biol Rep**, v. 41, n. 1, p. 95-103, 2014.

REPPERT, S. M.; WEAVER, D. R. Molecular analysis of mammalian circadian rhythms. **Annu Rev Physiol**, v. 63, p. 647-76, 2001.

RUDIC, R. D. et al. BMAL1 and CLOCK, two essential components of the circadian clock, are involved in glucose homeostasis. **PLoS Biol**, v. 2, n. 11, p. e377, 2004.

SAFA, A. R.; DAY, T. W.; WU, C. H. Cellular FLICE-like inhibitory protein (C-FLIP): a novel target for cancer therapy. **Curr Cancer Drug Targets**, v. 8, n. 1, p. 37-46, 2008.

SAHAR, S.; SASSONE-CORSI, P. Metabolism and cancer: the circadian clock connection. **Nat Rev Cancer**, v. 9, n. 12, p. 886-96, 2009.

SAVVIDIS, C.; KOUTSILIERIS, M. Circadian rhythm disruption in cancer biology. **Mol Med**, v. 18, p. 1249-60, 2012.

SCHEIERMANN, C.; KUNISAKI, Y.; FRENETTE, P. S. Circadian control of the immune system. **Nat Rev Immunol**, v. 13, n. 3, p. 190-8, 2013.

SCHERNHAMMER, E. S. et al. Night-shift work and risk of colorectal cancer in the nurses' health study. **J Natl Cancer Inst**, v. 95, n. 11, p. 825-8, 2003.

SCHIBLER, U.; SASSONE-CORSI, P. A web of circadian pacemakers. **Cell**, v. 111, n. 7, p. 919-22, 2002.

SCHOELLER, D. A. et al. Entrainment of the diurnal rhythm of plasma leptin to meal timing. **J Clin Invest**, v. 100, n. 7, p. 1882-7, 1997.

SHTIVELMAN, E. A link between metastasis and resistance to apoptosis of variant small cell lung carcinoma. **Oncogene**, v. 14, n. 18, p. 2167-73, 1997.

SMAALAND, R. Circadian rhythm of cell division. **Prog Cell Cycle Res**, v. 2, p. 241-66, 1996.

STEPHAN, F. K.; ZUCKER, I. Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 69, n. 6, p. 1583-6, 1972.

STORCELOVA, M. et al. Expression of cell cycle regulatory factors *hus1*, *gadd45a*, *rb1*, *cdkn2a* and *mre11a* correlates with expression of clock gene *per2* in human colorectal carcinoma tissue. **Mol Biol Rep**, v. 40, n. 11, p. 6351-61, 2013.

STORCH, K. F. et al. Extensive and divergent circadian gene expression in liver and heart. **Nature**, v. 417, n. 6884, p. 78-83, 2002.

SUGARMAN, B. J. et al. Recombinant human tumor necrosis factor-alpha: effects on proliferation of normal and transformed cells in vitro. **Science**, v. 230, n. 4728, p. 943-5, 1985.

SUN, J. et al. [Circadian rhythms of DNA synthesis and apoptosis correlated gene expression in bone marrow cells of nude mice bearing human nasopharyngeal carcinoma]. **Ai Zheng**, v. 21, n. 8, p. 833-7, 2002.

SUZUKI, S. et al. Circadian rhythm of leucocytes and lymphocytes subsets and its possible correlation with the function of the autonomic nervous system. **Clin Exp Immunol**, v. 110, n. 3, p. 500-8, 1997.

TAKAHASHI, J. S. et al. The genetics of mammalian circadian order and disorder: implications for physiology and disease. **Nat Rev Genet**, v. 9, n. 10, p. 764-75, 2008.

TAKAHASHI, Y.; KIPNIS, D. M.; DAUGHADAY, W. H. Growth hormone secretion during sleep. **J Clin Invest**, v. 47, n. 9, p. 2079-90, 1968.

TAKIMOTO, M. et al. Daily expression of clock genes in whole blood cells in healthy subjects and a patient with circadian rhythm sleep disorder. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 289, n. 5, p. R1273-9, 2005.

TONG, X. et al. Decreased TIP30 expression promotes tumor metastasis in lung cancer. **Am J Pathol**, v. 174, n. 5, p. 1931-9, 2009.

URBANO, P. C.; SOCCOL, V. T.; AZEVEDO, V. F. Apoptosis and the FLIP and NF-kappa B proteins as pharmacodynamic criteria for biosimilar TNF-alpha antagonists. **Biologics**, v. 8, p. 211-20, 2014.

VANDESOMPELE, J. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biol**, v. 3, n. 7, p. RESEARCH0034, 2002.

VIELHABER, E. et al. Nuclear entry of the circadian regulator mPER1 is controlled by mammalian casein kinase I epsilon. **Mol Cell Biol**, v. 20, n. 13, p. 4888-99, 2000.

VU, T. H.; WERB, Z. Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. **Genes Dev**, v. 14, n. 17, p. 2123-33, 2000.

WATANABE, M. et al. Rhythmic expression of circadian clock genes in human leukocytes and beard hair follicle cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 425, n. 4, p. 902-7, 2012.

WELSH, D. K. et al. Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing rhythms. **Neuron**, v. 14, n. 4, p. 697-706, 1995.

WINTER, S. L. et al. Expression of the circadian clock genes Per1 and Per2 in sporadic and familial breast tumors. **Neoplasia**, v. 9, n. 10, p. 797-800, 2007.

WOOD, P. A.; HRUSHESKY, W. J.; KLEVECZ, R. Distinct circadian time structures characterize myeloid and erythroid progenitor and multipotential cell clonogenicity as well as marrow precursor proliferation dynamics. **Exp Hematol**, v. 26, n. 6, p. 523-33, 1998.

YAGITA, K. et al. Nucleocytoplasmic shuttling and mCRY-dependent inhibition of ubiquitylation of the mPER2 clock protein. **EMBO J**, v. 21, n. 6, p. 1301-14, 2002.

YANG, M. Y. et al. Downregulation of circadian clock genes in chronic myeloid leukemia: alternative methylation pattern of hPER3. **Cancer Sci**, v. 97, n. 12, p. 1298-307, 2006.

YIM, D. H. et al. ITGA1 polymorphisms and haplotypes are associated with gastric cancer risk in a Korean population. **World J Gastroenterol**, v. 19, n. 35, p. 5870-6, 2013.

YU, E. A.; WEAVER, D. R. Disrupting the circadian clock: gene-specific effects on aging, cancer, and other phenotypes. **Aging (Albany NY)**, v. 3, n. 5, p. 479-93, 2011.

ZEHRING, W. A. et al. P-element transformation with period locus DNA restores rhythmicity to mutant, arrhythmic *Drosophila melanogaster*. **Cell**, v. 39, n. 2 Pt 1, p. 369-76, 1984.

ZIENOLDDINY, S. et al. Analysis of polymorphisms in the circadian-related genes and breast cancer risk in Norwegian nurses working night shifts. **Breast Cancer Res**, v. 15, n. 4, p. R53, 2013.

GLOSSÁRIO

Acrofase	Medida do tempo transcorrido entre um instante (fase) de referência e a fase na qual é maior a probabilidade de ser encontrado o valor mais elevado de uma variável, a partir da curva senoidal ajustada aos dados.
Amplitude	Valor da diferença entre os valores máximo (ou mínimo) e médio (mesor) da curva ajustada de um ritmo biológico qualquer.
Ciclo	Intervalo de tempo (período) no qual uma seqüência de eventos ocorre. O tempo ciclo implica repetição dos eventos.
Circadiano	Ritmo com período de 24 ± 4 h.
Cosinor	Método de análise de ritmos biológicos que consiste no ajuste da curva cosseno aos dados.
Cronotipo	Preferência pelo período de atividades.
Fase	Momento determinado de um ciclo. Pode referir-se a uma metade do ciclo, por exemplo, a fase clara do ciclo claro/escuro, ou a um momento pontual, como o valor máximo de uma variável.
Jet lag	Efeito de alteração de fases devido a mudanças de fuso horário provocadas por viagens transmeridianas rápidas.
Marca-passo	Estrutura biológica capaz de gerar uma oscilação regular espontaneamente, como, por exemplo, os núcleos supraquiasmáticos e os marca-passos cardíacos.

Oscilação	Mudança de estado ou de valor de uma variável.
Período	Duração de um evento. Em Cronobiologia, utiliza-se para identificar a duração de um ciclo.
Primer	Pequenas seqüências, ou iniciadores nucleotídeos complementares a ácidos nucléicos de interesse.
Ritmo	Qualquer evento que se repete regularmente.
Sincronização	Manutenção de relação de fase estável entre ciclos, podendo ocorrer através de arrastamento ou mascaramento.
Zeitgeber	Termo alemão de uso consagrado. Literalmente “doador de tempo”.

ANEXOS

ANEXO 1. Quantificação das amostras de RNA de leucócito total obtidas com *kit miRNeasy*. São demonstradas as concentrações, em ng/μL obtidas a partir de seis sujeitos e o grau de pureza das amostras em 260nm/280nm.

Leucócito Total									
Sujeito 1					Sujeito 4				
Amostrar	260nm/280nm	OD (260nm)	Concentração final		Amostra	260nm/280nm	OD (260nm)	Concentração final	
00	1,5	0,188	71,44	ng/μL	00	1,8	0,501	190,3	ng/μL
04	1,5	0,243	92,34	ng/μL	04	1,8	0,361	137,1	ng/μL
08	1,6	0,193	73,34	ng/μL	08	1,7	0,299	113,6	ng/μL
12	1,7	0,088	33,44	ng/μL	12	1,7	0,416	158,0	ng/μL
16	2,0	0,192	72,96	ng/μL	16	1,7	0,422	160,3	ng/μL
20	1,6	0,209	79,42	ng/μL	20	1,7	0,443	168,3	ng/μL
Sujeito 2					Sujeito 5				
Amostra	260nm/280nm	OD (260nm)	Concentração final		Amostra	260nm/280nm	OD (260nm)	Concentração final	
00	1,8	0,181	68,78	ng/μL	00	2,1	0,272	103	ng/μL
04	1,8	0,206	78,28	ng/μL	04	1,7	0,892	339	ng/μL
08	1,7	0,157	59,66	ng/μL	08	1,7	0,976	371	ng/μL
12	2,5	0,211	80,18	ng/μL	12	1,6	0,998	379	ng/μL
16	1,7	0,299	113,62	ng/μL	16	1,6	0,779	296	ng/μL
20	1,6	0,171	64,98	ng/μL	20	1,7	1,116	424	ng/μL
Sujeito 3					Sujeito 6				
Amostra	260nm/280 nm	OD (260nm)	Concentração final		Amostra	260nm/280 nm	OD (260nm)	Concentração final	
00	1,7	0,467	177,46	ng/μL	00	2,1	0,489	186	ng/μL
04	2,0	0,444	168,72	ng/μL	04	1,6	0,591	224	ng/μL
08	1,8	0,391	148,58	ng/μL	08	2,2	0,356	135	ng/μL
12	1,4	0,83	315,4	ng/μL	12	1,6	0,531	202	ng/μL
16	1,9	0,549	208,62	ng/μL	16	2,1	0,480	182	ng/μL
20	1,9	0,629	239,02	ng/μL	20	1,4	0,719	273	ng/μL

FONTE: FIGUEREDO. D.S.. 2013.

ANEXO 2

Descrição dos genes da placa de *PCR Array*

Gene	Símbolo	Número de Acesso (NCBI)
<i>v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1</i>	<i>Akt1</i>	NM_005163
<i>angiopoietin 1</i>	<i>Angpt1</i>	NM_001146
<i>angiopoietin 2</i>	<i>Angpt2</i>	NM_001147
<i>apoptotic peptidase activating factor 1</i>	<i>Apaf1</i>	NM_001160
<i>ATM serine/threoninekinase</i>	<i>Atm</i>	NM_000051
<i>BCL2-associated agonist of cell death</i>	<i>Bad</i>	NM_004322
<i>BCL2-associated X protein</i>	<i>Bax</i>	NM_004324
<i>B-cell CLL/lymphoma2</i>	<i>Bcl2</i>	NM_000633
<i>BCL2-like 1</i>	<i>Bcl2l1</i>	NM_138578
<i>Breast cancer 1, early on set</i>	<i>Brca1</i>	NM_007294
<i>caspase 8, apoptosis-related cysteine peptidase</i>	<i>Casp8</i>	NM_001228
<i>cyclin E1</i>	<i>Ccne1</i>	NM_001238
<i>Cell division cycle 25A</i>	<i>Cdc25a</i>	NM_001789
<i>cyclin-dependent kinase 2</i>	<i>Cdk2</i>	NM_001798
<i>cyclin-dependent kinase 4</i>	<i>Cdk4</i>	NM_000075
<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)</i>	<i>Cdkn1a</i>	NM_000389
<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 2A</i>	<i>Cdkn2a</i>	NM_000077
<i>CASP8 and FADD-like apoptosis regulator</i>	<i>Cflar</i>	NM_003879
<i>Checkpoint kinase 2</i>	<i>Chek2</i>	NM_007194

<i>collagen, type XVIII, alpha 1</i>	<i>Col18a1</i>	NM_030582
<i>E2F transcription factor1</i>	<i>E2f1</i>	NM_005225
<i>V-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog2, neuro/glioblastoma derived oncogene homolog (avian)</i>	<i>ErbB2</i>	NM_004448
<i>V-Ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog2 (avian)</i>	<i>Ets2</i>	NM_005239
<i>Fas (TNF receptor superfamily, member6)</i>	<i>Fas</i>	NM_000043
<i>Fibroblast growth factor receptor 2</i>	<i>Fgfr2</i>	NM_000141
<i>FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog</i>	<i>Fos</i>	NM_005252
<i>Granzyme A (granzyme1, cytotoxic T-lymphocyte-associated serine esterase 3)</i>	<i>Gzma</i>	NM_006144
<i>HIV-1 Tat interactive protein2, 30kDa</i>	<i>Htatip2</i>	NM_006410
<i>Interferon, alpha 1</i>	<i>Ifna1</i>	NM_024013
<i>Interferon, beta 1, fibroblast</i>	<i>Ifnb1</i>	NM_002176
<i>Insulin-like growth factor1 (somatomedin C)</i>	<i>Igf1</i>	NM_000618
<i>Interleukin8</i>	<i>Il8</i>	NM_000584
<i>Integrin, alpha 1</i>	<i>Itga1</i>	NM_181501
<i>Integrin, alpha 2 (CD49B, alpha 2 subunit of VLA-2 receptor)</i>	<i>Itga2</i>	NM_002203
<i>Integrin, alpha 3 (antigen CD49C, alpha 3 subunit of VLA-3 receptor)</i>	<i>Itga3</i>	NM_002204
<i>Integrin, alpha 4 (antigen CD49D, alpha 4 subunit of VLA-4 receptor)</i>	<i>Itga4</i>	NM_000885
<i>Integrin, alpha V (vitronectin receptor, alpha polypeptide, antigen CD51)</i>	<i>ItgaV</i>	NM_002210
<i>Integrin, beta 1 (fibronectin receptor, beta polypeptide, antigen CD29 includes MDF2, MSK12)</i>	<i>Itgb1</i>	NM_002211

<i>Integrin, beta 3 (platelet glycoprotein IIIa, antigen CD61)</i>	<i>Itgb3</i>	NM_000212
<i>Integrin, beta 5</i>	<i>Itgb5</i>	NM_002213
<i>Jun proto-oncogene</i>	<i>Jun</i>	NM_002228
<i>Mitogen-activated protein kinase kinase 1</i>	<i>Map2k1</i>	NM_002755
<i>Melanoma cell adhesion molecule</i>	<i>Mcam</i>	NM_006500
<i>Mdm2 p53 binding protein homolog (mouse)</i>	<i>Mdm2</i>	NM_002392
<i>Met proto-oncogene (hepatocyte growth factor receptor)</i>	<i>Met</i>	NM_000245
<i>Matrix metalloproteinase1 (interstitial collagenase)</i>	<i>Mmp1</i>	NM_002421
<i>Matrix metalloproteinase2 (gelatinase A, 72kDa gelatinase, 72kDa type IV collagenase)</i>	<i>Mmp2</i>	NM_004530
<i>Matrix metalloproteinase9 (gelatinase B, 92kDa gelatinase, 92kDa type IV collagenase)</i>	<i>Mmp9</i>	NM_004994
<i>Metastasis associated1</i>	<i>Mta1</i>	NM_004689
<i>Metastasis associated1 family, member 2</i>	<i>Mta2</i>	NM_004739
<i>Metastasis suppressor 1</i>	<i>Mtss1</i>	NM_014751
<i>V-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)</i>	<i>Myc</i>	NM_002467
<i>Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells1</i>	<i>Nfkb1</i>	NM_003998
<i>Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha</i>	<i>Nfkbia</i>	NM_020529
<i>Non-metastatic cells1, protein (NM23A) expressed in</i>	<i>Nme1</i>	NM_000269
<i>Non-metastatic cells 4, protein expressed in</i>	<i>Nme4</i>	NM_005009
<i>Platelet-derived growth factor alpha polypeptide</i>	<i>Pdgfa</i>	NM_002607
<i>Platelet-derived growth factor beta polypeptide</i>	<i>Pdgfb</i>	NM_002608

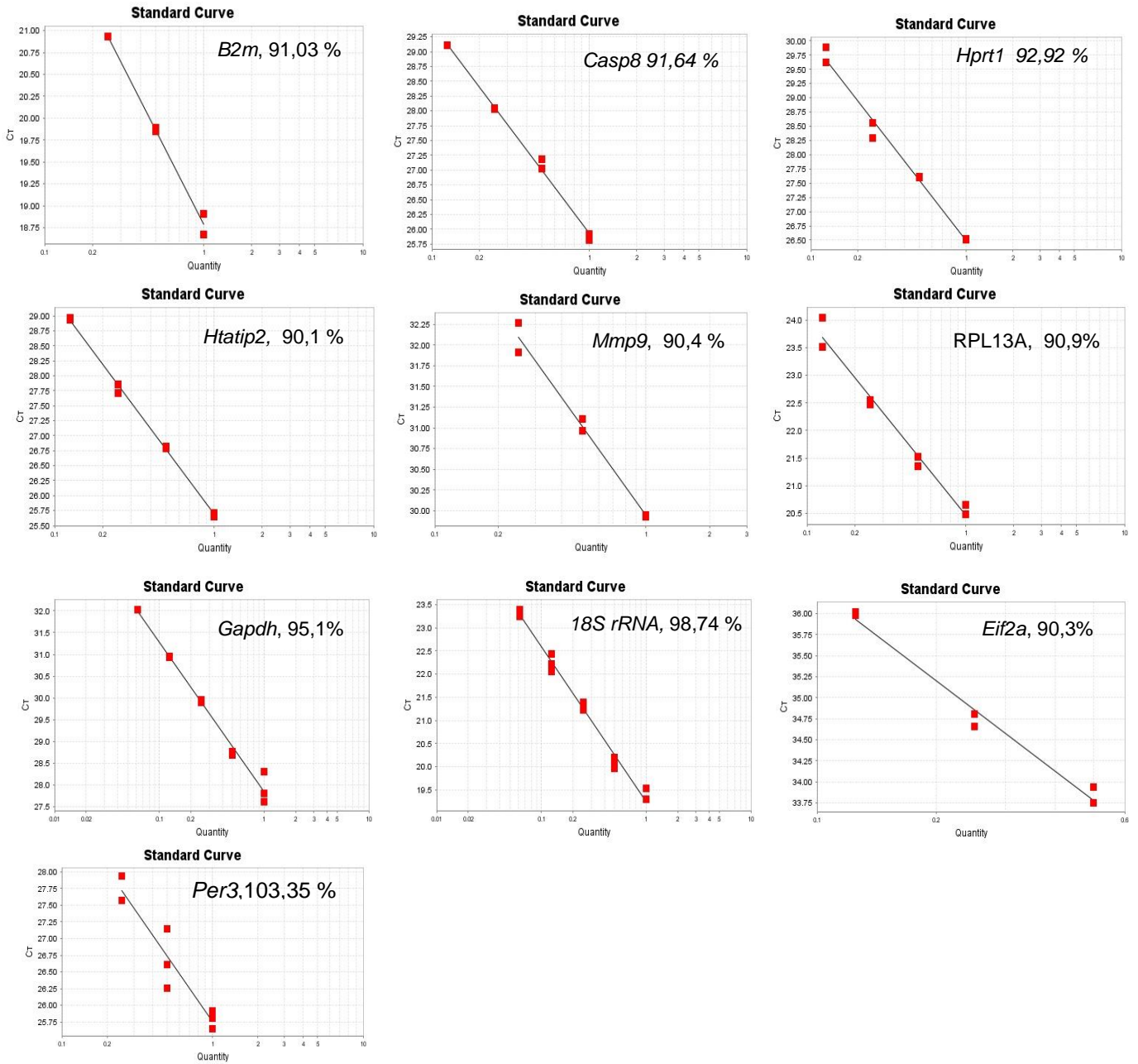
<i>Phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 1 (alpha)</i>	<i>Pik3r1</i>	NM_181504
<i>Plasminogen activator, urokinase</i>	<i>Plau</i>	NM_002658
<i>Plasminogen activator, urokinase receptor</i>	<i>Plaur</i>	NM_002659
<i>Pinin, desmosome associated protein</i>	<i>Pnn</i>	NM_002687
<i>V-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog1</i>	<i>Raf1</i>	NM_002880
<i>Retinoblastoma1</i>	<i>Rb1</i>	NM_000321
<i>S100 calcium binding protein A4</i>	<i>S100a4</i>	NM_002961
<i>Serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member5</i>	<i>Serpinb5</i>	NM_002639
<i>Serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type1), member 1</i>	<i>Serpine1</i>	NM_000602
<i>Synuclein, gamma (breast cancer-specific protein1)</i>	<i>Sncg</i>	NM_003087
<i>Spleen tyrosine kinase</i>	<i>Syk</i>	NM_003177
<i>TEK tyrosine kinase, endothelial</i>	<i>Tek</i>	NM_000459
<i>Telomerase reverse transcriptase</i>	<i>Tert</i>	NM_198253
<i>Transforming growth factor, beta 1</i>	<i>Tgfb1</i>	NM_000660
<i>Transforming growth factor, beta receptor 1</i>	<i>Tgfb1</i>	NM_004612
<i>Thrombospondin1</i>	<i>Thbs1</i>	NM_003246
<i>TIMP metalloproteinase inhibitor1</i>	<i>Timp1</i>	NM_003254
<i>TIMP metalloproteinase inhibitor3</i>	<i>Timp3</i>	NM_000362
<i>Tumor necrosis factor</i>	<i>Tnf</i>	NM_000594
<i>Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b</i>	<i>Tnfrsf10b</i>	NM_003842
<i>Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1A</i>	<i>Tnfrsf1a</i>	NM_001065

<i>Tumor necrosis factor receptor superfamily, member25</i>	<i>Tnfrsf25</i>	NM_003790
<i>Tumor protein p53</i>	<i>Tp53</i>	NM_000546
<i>Twist homolog1 (Drosophila)</i>	<i>Twist1</i>	NM_000474
<i>Ependymin related protein1 (zebrafish)</i>	<i>Epdr1</i>	NM_017549
<i>Vascular endotelial growth factor A</i>	<i>Vegfa</i>	NM_003376
<i>Beta-2-microglobulin</i>	<i>B2m</i>	NM_004048
<i>Hypoxanthine phosphoribosyl transferase1</i>	<i>Hprt1</i>	NM_000194
<i>Ribosomal protein L13a</i>	<i>Rpl13a</i>	NM_012423
<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	<i>Gapdh</i>	NM_002046
<i>Actin, beta</i>	<i>Actb</i>	NM_001101

Fonte: <http://www.sabiosciences.com/genetable.php?pcatn=PAHS-03>

ANEXO 3

Eficiência de amplificação das reações de RT-qPCR



ANEXO 4

Curvas de Melt

