

**ANNA LÍGIA KORCZAK**

**BASES BIOLÓGICAS DO CRONOTIPO: ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DO  
LOCAL, SEXO, IDADE E FREQUÊNCIA DO POLIMORFISMO C3111T  
DO GENE hCLOCK.**

Monografia apresentada como  
requisito para a obtenção do título  
de Bacharel no Curso de Ciências  
Biológicas da Universidade Federal  
do Paraná.

Orientador(a): Prof. Fernando Louzada

**CURITIBA  
2004**

## TERMO DE APROVAÇÃO

PROFESSOR ORIENTADOR

Prof. Dr. Fernando Mazzilli Louzada

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra Ana Maria Caliman Filadelfi

(Departamento de Fisiologia da Universidade Federal do Paraná)

Prof. MSc Erasto Villa Branco Jr.

(Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná)

Curitiba, 14 de dezembro de 2004

## DEDICATÓRIA

Dedico esta monografia aos meus pais, Ester Maria Lima e Jan Jerzy Korczak, os quais durante todos os momentos foram muito importantes e ao meu filho que ainda nem nasceu mas já faz parte da minha vida.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço inicialmente ao meu orientador Prof. Fernando Louzada que foi fundamental tanto para o desenvolvimento deste projeto quanto para minha formação acadêmica.

Agradeço ao meu namorado Carlos Eduardo Mateus. Aos meus amigos Alessandra Vieira, Gustavo Bomfim Propst, Marco Aurélio Schüler de Oliveira e Raphael Orélis Ribeiro, os quais foram muito importantes durante estes quatro anos de graduação.

Agradeço também a ajuda dos meus colegas e amigos de estágio, aos voluntários que participaram da coleta de dados e a equipe do Departamento de Psicobiologia, Laboratório de Biologia Molecular do Sono da UNIFESP.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>11</b>
<b>3 METODOLOGIA .....</b>	<b>12</b>
3.1 SUJEITOS .....	12
3.2 ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DO LOCAL, SEXO E IDADE NO CRONOTIPO EM ADULTOS .....	12
3.3 VERIFICAÇÃO DA FREQUÊNCIA DO POLIMORFISMO C3111T NOS INDIVÍDUOS EXTREMAMENTE MATUTINOS E VESPERTINOS COM RELAÇÃO ÀS PREFERÊNCIAS DIURNAS .....	13
3.3.1 SUJEITOS .....	13
3.3.2 IDENTIFICAÇÃO E TIPAGEM DO POLIMORFISMO NA POSIÇÃO 3111 DO GENE CLOCK .....	13
3.3.3 ANÁLISE DOS DADOS.....	14
<b>4 RESULTADOS .....</b>	<b>14</b>
4.1 ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DO LOCAL, SEXO E IDADE NO CRONOTIPO EM ADULTOS .....	14
4.2 VERIFICAÇÃO DA FREQUÊNCIA DO POLIMORFISMO C3111T NOS INDIVÍDUOS EXTREMAMENTE MATUTINOS E VESPERTINOS COM RELAÇÃO ÀS PREFERÊNCIAS DIURNAS .....	17
Pontuação.....	18
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>18</b>
<b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>21</b>
<b>7 ANEXO .....</b>	<b>25</b>

## RESUMO

A espécie humana caracteriza-se por ser diurna, concentrando os seus episódios de atividade durante o dia e de repouso durante a noite. O episódio de sono noturno, além de apresentar diferenças individuais em sua duração, não ocorre nas mesmas horas da noite em todos os indivíduos, ou seja, existem diferenças individuais relacionadas à preferência por horários de sono. Estas diferenças nos horários de sono estão associadas a diferenças de fase em outros ritmos biológicos, como o da temperatura corporal e da secreção de melatonina. Estas diferenças de fase existentes entre os indivíduos estão relacionadas ao chamado cronotipo. Inúmeros estudos mostram que o cronotipo é uma propriedade do sistema de temporização circadiana. Entretanto, ainda não se conhece a origem desta diferença. Ela poderia ter origem em diferenças presentes no relógio molecular de controle da ritmicidade circadiana. Os objetivos deste estudo foram analisar a influência do local, sexo e idade no cronotipo em adultos em relação à preferência diurna, através da utilização do questionário desenvolvido por HORNE e ÖSTBERG e verificar a frequência do polimorfismo C3111T nos indivíduos extremamente matutinos e vespertinos com relação às preferências diurnas. 1.101 voluntários responderam ao questionário HO. Para a influência do local, sexo e idade no cronotipo foram analisados os dados dos voluntários adultos de duas localidades, São Paulo e Curitiba. A população de São Paulo apresentou uma pontuação mais elevada em relação à população de Curitiba. Os homens apresentariam uma tendência à vespertinidade. Para a verificação da frequência do polimorfismo, a partir da pontuação obtida com o HO, foram selecionados os indivíduos extremos matutinos e vespertinos para que fosse feita a genotipagem a partir da extração de DNA. A análise de qui-quadrado não detectou diferenças significativas na frequência dos alelos C e T entre matutinos e vespertinos. Nossos resultados sugerem que não existe associação entre o polimorfismo C3111T do gene *Clock* e o cronotipo.

## 1 INTRODUÇÃO

Uma das mudanças mais características no ambiente das espécies é o ciclo dia e noite. Correspondentemente, a maioria das espécies exibe mudanças diárias em sua fisiologia e/ou comportamento (ANOKHIN,1974). Estas mudanças, caracterizadas como a capacidade dos organismos de expressarem seus comportamentos e controlarem sua fisiologia, ocorrem de uma forma cíclica, estável e periódica, podendo então ser chamadas de ritmos biológicos.

Os ritmos biológicos não são simplesmente respostas às mudanças que ocorrem em 24 horas. Inicialmente, acreditava-se que os responsáveis pelos ritmos biológicos eram os ciclos da natureza, como alternância do dia e noite, ou seja, dependeriam apenas de fatores externos devido à rotação da Terra em torno do seu eixo. Hoje se sabe que os ritmos biológicos representam um sistema de organização temporal interna aos organismos que tem como características básicas serem controlados por fatores endógenos, capacidade de serem sincronizados por ciclos ambientais e apresentarem compensação às variações de temperatura do ambiente (MARQUES e MENNA-BARRETO, 2003). Este caráter endógeno dos ritmos permite que os organismos antecipem, adaptem e preparem-se para mudanças ambientais (ANOKHIN,1974).

Os ritmos biológicos se manifestam na fisiologia e comportamento de muitos organismos como bactérias, fungos, plantas, insetos, peixes, mamíferos e dentre estes, os seres humanos.

Quando se mantêm animais ou vegetais em um ambiente constantemente iluminado ou escuro, pode-se observar a persistência dos ritmos biológicos, embora estes possam apresentar um período diferente daquele quando o organismo está exposto aos ciclos ambientais. Esses experimentos foram feitos, a partir da década de 50, por ASCHOFF e WEVER (WEVER, 1979) os quais coletaram dados de voluntários que passaram alguns meses em uma caverna totalmente escura, sem informações externas ou pistas ambientais. Os ritmos biológicos sincronizados pelo ciclo claro/escuro, como o ciclo vigília/sono, passaram a apresentar períodos diferentes de 24 horas. Nesta situação, os ritmos estão em situação de livre-curso e o período pode variar entre os indivíduos (DAVIDSON AJ e MENAKER M., 2003; ROENNEBERG T. e MERROW M., 2003).

Basicamente, costuma-se dividir os ritmos biológicos em três categorias diferentes, de acordo com o seu período:

- Ritmos ultradianos, os quais se repetem dentro de um período menor que 20 horas e têm como exemplo o piscar dos olhos, ritmos cardíacos;
- Ritmos infradianos, os quais se repetem dentro de um intervalo maior que 28 horas, tendo como exemplo o ciclo menstrual, ritmo de produção de plaquetas no sangue, cujo período é de 7 dias ;
- Ritmos circadianos, os quais se repetem de 20 a 28 horas, como por exemplo o ciclo sono/vigília, secreção de hormônios como melatonina, cortisol, pico de temperatura corporal.

A maior parte do conhecimento na área de cronobiologia está relacionada aos ritmos circadianos. Por este motivo, neste estudo será dada maior ênfase a estes ritmos.

Ritmos circadianos são oscilações geradas endogenamente nas funções biológicas que ocorrem em um período de aproximadamente 24 horas ou dentro do intervalo entre 20 a 28 horas, e persistem mesmo quando pistas ambientais ou *zeitgebers* estão ausentes, indicando a existência de um mecanismo interno chamado relógio biológico (HALBERG, 1959). Portanto, o controle dos ritmos biológicos endógenos é regulado por processos neurais e hormonais (KÜLLER, 2002).

A demonstração do caráter endógeno dos ritmos biológicos teve início no século XVIII com o cientista francês DE MAIRAN que foi o primeiro a propor a possível existência de um fator interno ao organismo controlando a ritmicidade, (ROTENBERG *et al.*, 2003). DE MAIRAN observou o movimento regular de abertura e fechamento das folhas da planta sensitiva *Mimosa pudica* e constatou que quando a planta era mantida em condições de escuro constante, o movimento de abertura e fechamento das folhas era mantido.

Após trabalhos realizados na década de 70 (WEAVER, 1998), acreditava-se que o relógio biológico, nos mamíferos, inclusive na espécie humana, estava localizado apenas no núcleo supraquiasmático do hipotálamo (IWASE *et al.*, 2002). Estes núcleos são aglomerados de células nervosas do sistema nervoso central e estão localizados na base do cérebro, sobre o cruzamento das fibras

nervosas originárias dos olhos (quiasma óptico). Estudos recentes têm demonstrado que tecidos periféricos (rins, fígado, pulmões) também expressam seus próprios ritmos, havendo interação entre os núcleos do sistema nervoso central e estes tecidos (BRANDSTAETTER, 2004). Podemos considerar que há no organismo um sistema de temporização circadiana, que é formado não só por estruturas do sistema nervoso central, mas por órgãos periféricos.

Os *zeitgebers* ou sincronizadores são os ciclos ambientais que possibilitam o ajuste dos ritmos biológicos. São exemplos de sincronizadores: ciclo claro/escuro, alimentação e fatores sociais (horário de aulas, trabalho, lazer, etc). A sincronização do ritmo circadiano é um processo ativo chamado arrastamento, sendo o ciclo claro/escuro o principal *zeitgeber* (ROENNEBERG e MERROW, 2003).

A espécie humana caracteriza-se por ser diurna, concentrando os seus episódios de atividade durante o dia e o repouso durante a noite (KLEITMAN, 1963). O episódio de sono noturno, além de apresentar diferenças em sua duração, não ocorre nas mesmas horas da noite em todos os indivíduos, ou seja, existem diferenças individuais relacionadas à preferência por horários de sono, constituindo o chamado cronotipo. Inúmeros estudos mostram que o cronotipo é uma propriedade do sistema de temporização circadiana (VAN DONGEN, 1998). Indivíduos que preferem dormir mais cedo e acordar mais cedo são chamados de matutinos. Aqueles que preferem dormir mais tarde e acordar mais tarde são denominados vespertinos.

Cronotipos, característica que pode ser chamada de preferência diurna ou preferência pelos horários de sono e vigília, podem ser identificados, em humanos, pelo questionário desenvolvido por HORNE e ÖSTBERG (Questionário para Identificação de Indivíduos Matutinos e Vespertinos – MEQ ou HO). São avaliadas 19 questões relatando horários de sono e vigília entre outros hábitos como preferências pelos horários de atividade física e mental dos indivíduos avaliados (HORNE e ÖSTBERG,1976). O questionário foi traduzido em várias línguas e usado em diferentes culturas e países (SMITH,1998).

Os cronotipos são classificados em matutinos e vespertinos os quais são considerados extremos cronotipos. Entre estes extremos existem os intermediários matutinos e vespertinos e ainda os indivíduos considerados indiferentes em relação aos extremos. Esta classificação dos cronotipos é atribuída por uma pontuação que se estende de 16 até 86, com pontuação acima de 58 os sujeitos são classificados como matutinos e com uma pontuação abaixo de 41 são classificados com vespertinos. De acordo com HORNE e ÖSTBERG, sujeitos com pontuação abaixo de 70 são classificados como moderadamente matutinos e o restante como matutinos. Os vespertinos são classificados com pontuação abaixo de 31 e o restante como moderadamente vespertino (ADAN e NATALE, 2002).

O período circadiano endógeno, ou seja, aquele que o indivíduo apresenta em situações de livre-curso ou isolamento temporal, foi investigado em indivíduos matutinos e vespertinos (DUFFY *et al.*, 2001). Na maioria dos indivíduos a fase endógena é de aproximadamente 25 horas (WEVER, 1979). Tem sido hipotetizado que indivíduos matutinos apresentariam o período endógeno um pouco menor quando comparados aos indivíduos vespertinos (KERKHOF, 1985).

Os extremos cronotipos matutino e vespertino apresentam diferenças significativas em relação à fase endógena dos ritmos biológicos circadianos. Os indivíduos matutinos têm seus ritmos apresentando um avanço de fase quando comparados a indivíduos vespertinos os quais apresentam um atraso de fase em seus ritmos endógenos (KERKHOF, 1985). Sucintamente, nos indivíduos matutinos os picos de secreção de hormônios, alerta subjetivo e temperatura corporal acontecem mais cedo do que nos ritmos circadianos dos vespertinos. Segundo alguns autores (LANCEL e KERKHOF, 1991; VINK *et al.*, 2001), a temperatura corporal máxima, o alerta subjetivo, secreção de melatonina e cortisol ocorrem, em média, 1,2 horas antes nos indivíduos matutinos. Outros autores (KERKHOF, 1985; CZEISLER *et al.*, 1985) encontraram valores para temperatura máxima corporal em matutinos ocorrendo adiantadas 2,1 horas em relação aos vespertinos. E segundo LAVIE e SEGAL (1989) foi observado que entre indivíduos matutinos e vespertinos há, em média, uma diferença nos ritmos circadianos do sono e vigília de 2 horas.

Essas diferenças nas fases dos ritmos circadianos entre os cronotipos podem ser observadas pelo comportamento ou preferências expressadas pelos

indivíduos. Os matutinos sentem-se sonolentos, adormecem e acordam mais cedo do que os vespertinos. A duração do sono é menos variável e o despertar tem um horário mais fixo ou constante em relação aos vespertinos (LANCEL e KERKHOF,1991). Os vespertinos são associados com grande necessidade de dormir, permanecem menos tempo do que o necessário na cama durante a semana, pois os fatores sociais são predominantes ou determinam os horários de sono. Permanecem por um tempo maior na cama durante os finais de semana, têm horários tardios para dormir e acordar principalmente nos finais de semana, hábitos irregulares de sono e vigília. Estes sujeitos têm um débito de sono durante a semana, estendendo-o durante os finais de semana (ASCHOFF, 1979; ISHIHARA, 1988; KERKHOF, 1985).

As bases biológicas das diferenças de fase na ritmicidade circadiana endógena dos extremos cronotipos não são conhecidas (WEVER, 1979; DUFFY *et al.*, 2001).

Mesmo que os fatores determinantes para as diferenças individuais dos ritmos circadianos sejam endógenos, fatores exógenos também influenciam na expressão dos cronotipos mascarando-os com as condições ambientais como temperatura do ambiente, exposição a luz, comportamentos social e alimentar, horários de sono e vigília (VAN DONGEN,1998).

Embora não se conheçam ainda as bases das diferenças individuais dos ritmos circadianos, pesquisas indicam que poderiam ter origem em diferenças

presentes no relógio molecular de controle da ritmicidade circadiana. A partir de 1998, surgiram trabalhos com o objetivo de estabelecer relações entre polimorfismos de alguns genes de reconhecida função no sistema de temporização e as diferenças individuais do cronotipo (KATZEMBERG *et al.*, 1998).

Estudos em animais e em humanos têm demonstrado a existência de polimorfismos genéticos que atuam sobre os ritmos circadianos. Provavelmente um grande número de fatores genéticos estejam relacionados às variações entre indivíduos na expressão dos ritmos circadianos na população em geral.

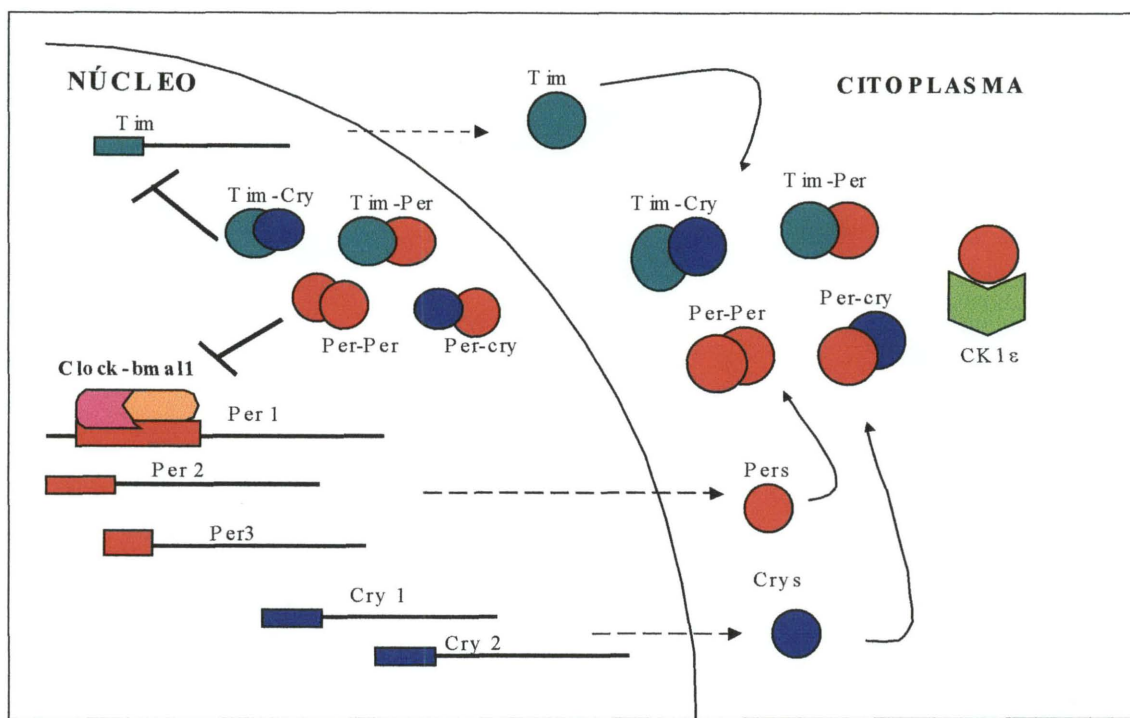
Estudando-se a mosca de fruta *Drosophila melanogaster*, cinco genes indispensáveis às atividades circadianas foram isolados. São eles: os genes reguladores *Period (per)*, *Timeless (tim)*, *dClock (clk)*, *Cycle (cyc)* *Doubletime (dbt)*. Genes de mamíferos homólogos aos de *Drosophila melanogaster* também têm sido estudados para que se possa entender mais sobre os ritmos circadianos em relação às bases moleculares da ritmicidade biológica (PANDA *et al.*, 2002).

Vários estudos foram publicados mostrando que mutações genéticas podem alterar a ritmicidade circadiana em uma grande variedade de organismos incluindo mamíferos (RALPH e MENAKER, 1988; VITATERNA, 1994; TAKAHASHI, 1995).

Atualmente, os principais genes conhecidos por controlar o ritmo circadiano nos mamíferos são os genes: *Clock*, *Bmal1*, *Period (per)* e *Timeless (tim)*. Estes

são genes altamente conservados desde a *Drosophila melanogaster* até os mamíferos, incluindo o homem. Os mesmos genes encontrados também em roedores têm mecanismos semelhantes de expressão e repressão gênica os quais provavelmente estariam presentes na espécie humana (PANDA *et al.*, 2002). Mutações em genes que fazem parte do controle da ritmicidade em roedores são capazes de alterar o ciclo de sono e vigília destes animais. Estes genes podem estar associados a síndromes relacionadas a alterações da ritmicidade circadiana humana (TOH *et al.*, 2001) assim como polimorfismos naturais existentes nestes mesmos genes estariam relacionados a diferenças nos fenótipos como dificuldades de sincronização às pistas externas, como por exemplo, as síndromes de atraso e avanço de fase. Já foram descritos na literatura casos de famílias em que essas doenças ocorrem, sugerindo que tais distúrbios estão, pelo menos em parte, sob controle genético (FINK e ANCOLI-ISRAEL, 1997).

Um modelo de mecanismo foi proposto para explicar o papel de cada um desses genes no controle do ritmo circadiano. Os genes *Clock* e *Bmal1* codificam proteínas que, quando sintetizadas, se unem formando uma estrutura denominada *heterodímero*. Este promove, então, a transcrição dos genes *Per1*, *Per2*, *Per3*, *Tim*, *Cry1* e *Cry2* enquanto os dímeros *Per-Tim*, *Per-Per*, *Tim-Cry* e *Per-Cry* bloqueiam o efeito do heterodímero *Clock-Bmal1*, formando assim, um “loop” autoregulatório de transcrição-tradução que dura, aproximadamente, 24 horas. O papel da *Cke* (caseína quinase) seria de regular a atividade da proteína *Per* através de *fosforilação* (SANGORAM *et al.*, 1998; LOWREY. *et al.*, 2000).



**Figura 1.** Adaptado de LOWREY *et al.*; 2000. Esquema do relógio molecular. O heterodímero clock-bmal1 (em rosa e laranja) ativa a transcrição dos genes *Per 1*, *Per 2* e *Per 3*, *Cry 1* e *Cry 2* e *Tim*. As proteínas codificadas por estes genes interagem no citoplasma (círculos vermelhos, verdes e azuis), onde também a proteína *Per 2* é fosforilada por CK1ε (em verde claro). Estas proteínas formam dímeros que retornarão depois ao núcleo para inibir a ação do heterodímero clock-bmal1 na transcrição de seus próprios genes, formando assim um "loop" autoregulatório negativo de duração aproximada de 24h. O esquema do relógio molecular é constantemente atualizado com estudos sobre possíveis genes os quais fazem parte do relógio biológico (HIROTA e FUKADA, 2004).

Pesquisas mostraram que o gene *Clock*, acrônimo de *Circadian Locomotor Output Kaput*, pertencente ao cromossomo 4q12, é responsável pela regulação de duas propriedades fundamentais do sistema do relógio circadiano na determinação da duração do período endógeno e na persistência do desenvolvimento do ritmo circadiano. Isto pôde ser comprovado através de estudos nos quais camundongos com mutações no gene *Clock* não eram capazes de desenvolver o ritmo circadiano

normal em escuro constante, e o período circadiano em livre curso deles era mais longo que em animais selvagens (VITATERNA *et al.*, 1994).

Um exemplo de controle genético de um componente do ritmo circadiano é o fenômeno da matutividade-vespertividade. Em 1998, KATZEMBERG e cols publicaram um trabalho no qual descreveram uma associação entre um polimorfismo de um único nucleotídeo (modificação de um nucleotídeo em uma determinada posição, que causa efeitos mais brandos do que uma mutação) na região não-codificadora no flanco 3' do gene *Clock* e o cronotipo ou preferência diurna em humanos, avaliado pelo questionário de HORNE-OSTBERG. Indivíduos que apresentaram uma mudança de citosina para timina na posição 3111 do gene *Clock* apresentavam uma tendência à matutividade.

## 2 OBJETIVOS

- Analisar a influência do local, sexo e idade no cronotipo em adultos em relação à preferência diurna, através da utilização do questionário desenvolvido por HORNE e ÖSTBERG.
- Verificar a frequência do polimorfismo C3111T nos indivíduos extremamente matutinos e vespertinos com relação às preferências diurnas. Este polimorfismo refere-se a uma substituição do nucleotídeo C para T na posição 3111 da região não-codificadora 3' do gene *Clock* da seqüência de DNAc.

### **3 METODOLOGIA**

O trabalho foi desenvolvido em conjunto pelo Departamento de Fisiologia da Universidade Federal do Paraná e pelo Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Psicobiologia da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP).

#### **3.1 SUJEITOS**

Houve a participação de 1.101 voluntários alunos de graduação e pós-graduação do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná e alunos de graduação da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP).

Os voluntários responderam ao questionário proposto por HORNE-ÖSTBERG (1976) para a determinação da preferência diurna (Questionário para Identificação de Indivíduos Matutinos e Vespertinos - MEQ ou HO) (**Anexo 1**).

#### **3.2 ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DO LOCAL, SEXO E IDADE NO CRONOTIPO EM ADULTOS**

Foram analisados os dados dos voluntários adultos de duas localidades, São Paulo e Curitiba. As médias da pontuação foram comparadas através da análise de variância (ANOVA), sendo considerados como fatores o local e o sexo. A correlação entre a pontuação e a idade foi pesquisada através do coeficiente de Spearman.

### 3.3 VERIFICAÇÃO DA FREQUÊNCIA DO POLIMORFISMO C3111T NOS INDIVÍDUOS EXTREMAMENTE MATUTINOS E VESPERTINOS COM RELAÇÃO ÀS PREFERÊNCIAS DIURNAS

#### 3.3.1 SUJEITOS

A partir da pontuação obtida com o questionário HO, foram selecionados os indivíduos extremos matutinos e vespertinos para que fosse feita a análise do DNA.

#### 3.3.2 IDENTIFICAÇÃO E TIPAGEM DO POLIMORFISMO NA POSIÇÃO 3111 DO GENE CLOCK

ETAPA 1 - O DNA foi extraído dos leucócitos a partir da doação de sangue dos voluntários caracterizados com cronotipos extremos.

ETAPA 2 - Após a extração, o DNA foi amplificado nas regiões de interesse usando-se os "primers" *Clock F2* (TCCAGCAGTTTCATGAGATGC) e *Clock R2* (GAGGTCATTTTCATAGCTGAGC). Para PCR: 2 minutos 95 °C; 30 ciclos 30 s - 95 °C, 30 s 59 °C, 1 min - 72 °C; 5 min - 72 °C. O resultado do PCR foi submetido à digestão com a enzima *BSP 1286I* por 5 horas a uma temperatura de 37 °C. O produto da digestão foi observado em gel de acrilamida. Para homocigotos (TT), uma banda com 220 pb apareceu; para homocigotos (CC), duas bandas (uma com 97 pb e outra com 123 pb); para heterocigotos, apareceram três bandas no gel.

A etapa 1 foi realizada no Departamento de Fisiologia da Universidade Federal do Paraná e a etapa 2 foi realizada pelo Laboratório de Biologia Molecular

do Departamento de Psicobiologia da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP).

### **3.3.3 ANÁLISE DOS DADOS**

A frequência alélica e genotípica nos dois grupos extremos foi comparada através do teste do qui-quadrado, com o objetivo de verificar a existência de associação com o caráter matutividade/vespertividade.

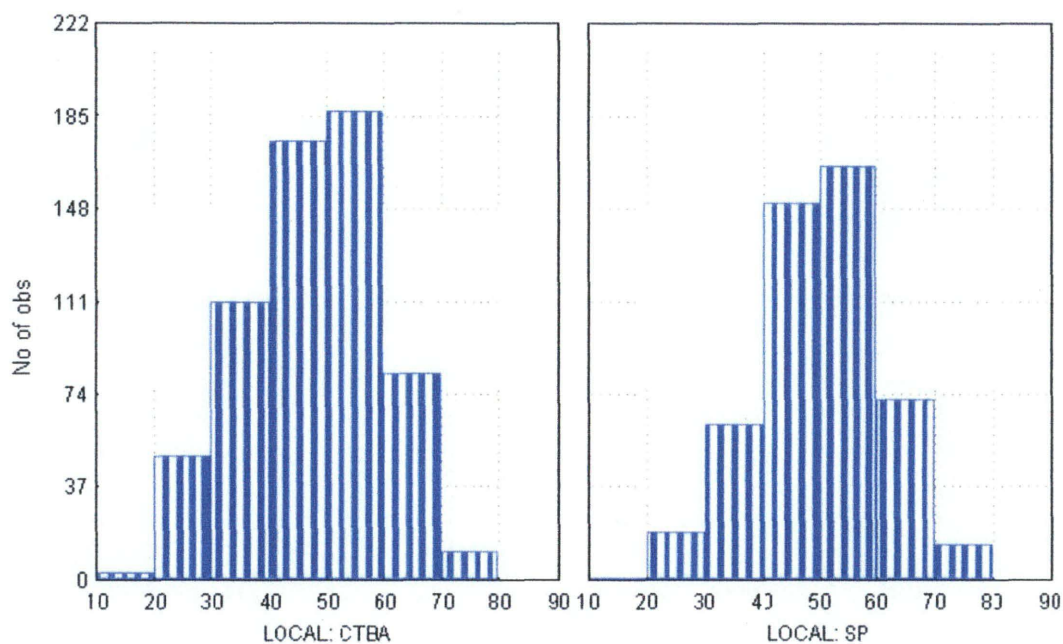
A comparação das médias dos 3 genótipos foi feita pela análise de variância das médias do resultado do questionário HO.

## **4 RESULTADOS**

### **4.1 ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DO LOCAL, SEXO E IDADE NO CRONOTIPO EM ADULTOS**

Foram analisados dados de 1.101 adultos de duas localidades, São Paulo com idade média de  $22,9(\pm 5,8)$  e Curitiba com idade média de  $21,6(\pm 7,4)$ , sendo 423 homens e 678 mulheres.

A distribuição dos sujeitos em relação ao local e pontuação do questionário HO esta representada na figura 2.



**Figura 2:** Distribuição dos sujeitos em relação ao local e pontuação.

As médias da pontuação foram comparadas através da análise de variância, tendo como fatores o local e o sexo. A tabela 1 apresenta os resultados.

**Tabela 1** – Valores médios do resultado do questionário HO por local e sexo.

<b>Local</b>	<b>São Paulo (n=477)</b>		<b>Curitiba (n=573)</b>	
<b>Pontuação</b>	50,8(±10,7)		48,1(±11,8)	
	<b>Homens</b> (n=125)	<b>Mulheres</b> (n=358)	<b>Homens</b> (n=298)	<b>Mulheres</b> (n=320)
	49,8(±10,4)	51,1(±10,7)	47,3(±11,7)	48,8 (±11,8)

A análise mostrou a influência do local sobre o cronotipo ( $p < 0,001$ ). A população de São Paulo apresenta uma pontuação mais elevada em relação à população de Curitiba. Ou seja, a população de Curitiba tem a tendência de ser mais vespertina.

A influência do fator sexo apresentou resultados no limite de significância ( $p = 0,051$ ). Os homens apresentariam uma tendência à vespertinidade.

A correlação entre a pontuação e a idade foi pesquisada através do coeficiente de Spearman ( $R = 0,147$ ;  $p < 0,001$ ), mostrando a já descrita tendência à matutuidade com o envelhecimento.

#### 4.2 VERIFICAÇÃO DA FREQUÊNCIA DO POLIMORFISMO C3111T NOS INDIVÍDUOS EXTREMAMENTE MATUTINOS E VESPERTINOS COM RELAÇÃO ÀS PREFERÊNCIAS DIURNAS

A partir da pontuação obtida, foram selecionados os indivíduos matutinos (n=71) e vespertinos (n=51), para que fosse feita a genotipagem a partir de coleta de sangue e extração de DNA dos leucócitos. A tabela 2 apresenta o sexo, a média e o respectivo desvio-padrão da idade dos indivíduos:

**Tabela 2** – Sexo, média e o respectivo desvio-padrão da idade dos indivíduos:

<b>Sexo</b>	<b>N</b>	<b>Média da Idade</b>
Mulheres	81	26,32(±7,81)
Homens	41	25,41(±7,31)
Total	122	26,02(±7,63)

A tabela 3 apresenta o número de indivíduos em cada genótipo.

**Tabela 3** – Número de indivíduos em cada genótipo:

	<b>TT</b>	<b>CT</b>	<b>CC</b>
<b>VESPERTINOS</b>	26	21	4
<b>MATUTINOS</b>	32	32	7

A análise de qui-quadrado (Pearson) não detectou diferenças significativas na frequência dos alelos C e T entre matutinos e vespertinos ( $p=0,80$ ).

A tabela 4 apresenta a média e o respectivo desvio-padrão da pontuação dos indivíduos em cada genótipo:

**Tabela 4** – Média e desvio padrão do resultado do questionário HO para cada genótipo.

	<b>Pontuação</b>	<b>N</b>
<b>TT</b>	50,26( $\pm 20,08$ )	58
<b>CT</b>	53,04( $\pm 19,36$ )	53
<b>CC</b>	51,27( $\pm 20,32$ )	11
<b>Total</b>		122

A análise de variância não detectou diferentes nas médias do resultado do questionário HO entre os genótipos ( $p=0,76$ ).

## 5 DISCUSSÃO

Nossos objetivos foram analisar a influência do local, sexo e idade no cronotipo em adultos em relação à preferência diurna e associar a frequência do polimorfismo C3111T no gene *CLOCK* em uma população de extremos para preferência diurna.

Em relação à análise da influência do local e sexo no cronotipo, foi encontrado influência significativa do local. Os participantes de Curitiba apresentaram valores menores nas médias da pontuação quando comparados aos valores de São Paulo ( $p < 0,001$ ). Os participantes de Curitiba apresentaram-se mais vespertinos quando comparados aos participantes de São Paulo. Especula-se que isso se deve ao fato de que a média de idade dos participantes de Curitiba seja mais baixa do que a média de idade dos participantes de São Paulo. Na adolescência há um atraso de fase em relação aos horários de sono (CARSKADON *et al.*, 1993). Já na fase adulta, há um avanço de fase e quanto maior a idade, maior é este avanço (WATERHOUSE JM e MINORS DS, 1996). A influência do local no cronotipo pode estar relacionada com a latitude. Cidades com diferentes latitudes têm diferentes fotoperíodos e, quanto mais próximo à linha do Equador, maior o fotoperíodo da região. Os hábitos sociais destas duas cidades também podem estar influenciando o resultado obtido no cronotipo.

A possível influência do sexo, com os homens apresentando-se mais vespertinos, é corroborada por estudo recente de ADAN e NATALE (2002), que sugere a presença de uma maior vespertinidade em homens.

Foi identificada correlação significativa entre a pontuação e a idade ( $p < 0,001$ ). Estes dados confirmam os estudos de MARQUES e MENNA-BARRETO (2003).

Em relação à associação da frequência do polimorfismo C3111T no gene *CLOCK* em uma população de extremos para preferência diurna, nossos

resultados sugerem, ao contrário do proposto por KATZEMBERG e cols (1998), que não existe associação entre o polimorfismo C3111T do gene *CLOCK* e o cronotipo. Ou seja, não foram encontradas diferenças na frequência do alelo 3111C em vespertinos. Ao contrário, foram encontrados em nossas amostras 7 sujeitos matutinos homozigotos para o alelo 3111C. Estes resultados são corroborados pelo recente estudo que também não achou associação entre o gene *CLOCK* e preferência diurna (ROBILLIARD *et al.*, 2002).

A confirmação de nossos resultados poderia ocorrer a partir da análise do genótipo de um número maior de sujeitos com cronotipo extremo.

Outros genes do relógio molecular têm sido estudados. Um dos genes candidatos do relógio biológico é o gene *Per3* cujo polimorfismo tem sido associado com síndrome da fase do sono atrasada e preferência diurna extrema (ARCHER *et al.*, 2003)

A associação de outros genes que fazem parte do relógio biológico são as perspectivas para o futuro. O estudo da influência conjunta dos genes *Per3* e *Clock* ou ainda de outros genes do relógio molecular pode mostrar resultados promissores.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAN A, NATALE V. Gender differences in morningness-eveningness preference. *Chronobiol Int*, 2002;19: 709-720.

ARCHER SN, ROBILLIARD DL, SKENE DJ, SMITS M, WILLIAMS A, ARENDT J, AND VON SCHANTZ M. A length polymorphism in the circadian clock gene Per3 is linked to delayed sleep phase syndrome and extreme diurnal preference. *Sleep*, 2003; 26:413-415.

ANOKHIN P. Biology and neurophysiology of the conditioned reflex and its role in adaptive behavior. **Oxford, Pergamon Press**, 1974; p.1-24.

ASCHOFF J. Circadian rhythms: influences of internal and external factors on the period measured in constant conditions. *Z. Tierpsychol*, 1979; 49:225-49.

BRANDSTAETTER R. Circadian lessons from peripheral clocks: Is the time of the mammalian pacemaker up? *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, 2004 101: 5699-5700.

CARSKADON MA, VIEIRA C, ACEBO C. Association between puberty and delayed phase preference. *Sleep*, 1993;16(3), 258-262.

CZEISLER CA, BROWN EN, RONDA JM, KRONAUER RE, RICHARDSON GS, FREITAG WO. A clinical method to assess the endogenous circadian phase (ECP) of the deep circadian oscillator in man. *Sleep Res*, 1985;14; p. 295.

DAVIDSON AJ, MENAKER M. Birds of a feather clock together-sometimes: social synchronization of circadian rhythms. *Curr Opin Neurobiol*. 2003 Dec; 13(6):765-9.

DUFFY JF, RIMMER DW, CZEISLER CA. Association of intrinsic period with morningness-eveningness, usual wake time, and circadian phase. *Behav. Neurosci*. 2001; 115(4):895-9.

FINK R, ANCOLI-ISRAEL S. Pedigree of one family with delayed sleep phase syndrome. *J Sleep Res* 1997; 26: 713.

HALBERG F. Physiologic 24-hour periodicity: General and procedural considerations with reference to the adrenal cycle. **Z. Vitamin, horm. Fermentforsch.** 1959; v. 10, p. 225-296.

HIROTA T, FUKADA Y. Resetting mechanism of central and peripheral circadian clocks in mammals. **Zoolog Sci.** 2004; 21(4):359-68.

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

ISHIHARA K, MIYAKE S, MIYASITA A, MIYATA Y. Comparisons of sleep-wake habits of morning and evening types in Japanese worker sample. **Journal of Human Ergology** 1988; 17,111-118.

IWASE T, KAJIMURA N, UCHIYAMA M, EBISAWA T, YOSHIMURA K, KAMEI Y *et al.* Mutation screening of the human Clock gene in circadian rhythm sleep disorders. **Psychiatry Res.** 2002; 109(2):121-8.

KATZENBERG D, YOUNG T, FINN L, LIN L, KING DP, TAKAHASHI JS, MIGNOT E. A CLOCK polymorphism associated with human diurnal preference. **Sleep** 1998; 21(6): 569-76.

KERKHOF GA. Inter-individual differences in the human circadian system: a review. **Biol Psychol** 1985; 20: 83-112.

KERKHOF GA, VAN DONGEN HPA: Morning-type and evening-type individuals differ in the phase position of their endogenous circadian oscillator. **Neuroscience Letters** 1996; 218:153-156.

KLEITMAN, N. Sleep and wakefulness, The University of Chicago Press, Chicago, 1963, 552 pp.

KULLER R. The influence of light on circarhythms in humans. **J Physiol Anthropol Appl Human Sci.** 2002 Mar;21(2):87-91.

LANCEL M, KERKHOF GA. Sleep structure and EEG power density in morning types and evening types during a simulated day and night shift. **Physiology and Behavior** 1991; 49, 1195-1201.

LAVIE P, SEGAL S. Twenty-four-hour structure of sleepiness in morning and evening persons investigated by ultrashort sleep-wake cycle. **Sleep** 1989;12:522-28.

LOWREY PL, SHIMOMURA K, ANTOCH MP, YAMAZAKI S, ZEMEIDES PD, RALPH MR *et al.* Positional Syntetic Cloning and Functional Characterization of the Mammalian Circadian Mutation TAU. **Science** 2000; 288(5465):483-91.

MARQUES N E MENNA-BARRETO L. **Cronobiologia: princípios e aplicações.** EDUSP, São Paulo, 2003.

PANDA S, HOGENESCH JB, KAY, SA. Circadian Rhythms from Flies to Human. **Nature** 2002; n.417, p.329-335.

RALPH MR E MENAKER M. A mutation of the circadian system in golden hamsters. **Science** 1989; 241: 1125-1127.

ROBILLIARD DL, ARCHER S N, ARENDT J, LOCKLEY SW, HACK LM, ENGLISH J, LEGER D, SMITS MG, WILLIAMS A, SKENE DJ, VON SCHANTZ M. The 3111 *Clock* gene polymorphism is not associated with sleep and circadian rhythmicity in phenotypically characterized human subjects. **J.Sleep** 2002 *Res.*;11;305-312

ROENNEBERG T & MERROW M. The Network of Time: Understanding the molecular circadian system. **Curr. Biol.**,2003, 13: R198-R207.

SANGORAM AM, SAEZ L, ANTOCH MP, GEKAKIS N, STAKNIS D, WHITELEY A, FRUECHTE EM, VITATERNA MH, SHIMOMURA K, KING DP, YOUNG MW, WEITZ CJ, TAKAHASHI JS. Mammalian circadian autoregulatory loop: a timeless ortholog and mPer1 interact and negatively regulate CLOCK-BMAL1-induced transcription. **Neuron** 1998; 21, 1101-1113.

SMITH C S, FOLKARD S, SCHMEIDER R, PARRA L F, SPELTEN E, ALMIRAL H, SEN R, SAHU S, PEREZ L M, TISAK J. Investigation of morning-evening orientation in six countries using the preferences scale. *Personality & Individual Differences*. **Science** 2002 32, 949-968.

TAKAHASHI JS. Molecular neurobiology and genetics of circadian rhythms in mammals. **Annu Rev Neurosci** 1995; 18:531-553.

TOH KL, JONES CR, HE Y, EIDE EJ, HINZ WA, VIRSHUP DM *et al.* An hPer2 phosphorylation site mutation in familial advanced sleep phase syndrome. **Science** 2001; 291(5506):1040-3.

VAN DONGEN HP. **Inter and Intra-individual Differences in Circadian Phase**. Leiden: Leiden University, 1998.

VINK JM, GROOT AS, KERKHOF GA AND BOOMSMA DI. Genetic analysis of morningness and eveningness. **Chronobiology International** 2001; 18(5): 809-822.

VITATERNA MH, KING DP, CHANG A-M, KORNHAUSER JM, LOWREY PL, MCDONALD JD, DOVE WF, PINTO LH, TUREK FW, TAKAHASHI JS . Mutagenesis and mapping of a mouse gene, Clock, essential for circadian behavior. **Science** 1994; 264:719-725.

WATERHOUSE JM, MINORS DS. Circadian rhythms in the neonate and in old age: what do they tell us about the development and decay of the body clock in humans? **Braz J Med Biol Res** 1996 Jan;29(1):87-94.

WEVER, R A. The circadian system of man. Results of experiments under temporal isolation. Topics in environmental physiology and medicine. **New York: Spring-Verlag** 1979.

## 7 ANEXO

### ANEXO 1

#### QUESTIONÁRIO PARA IDENTIFICAÇÃO DE INDIVÍDUOS MATUTINOS E VESPERTINOS

##### INSTRUÇÕES:

1. Leia com atenção cada questão antes de responder.
2. Responda todas as questões na ordem numérica.
3. Assinale apenas uma resposta para cada questão.
4. Responda a cada questão com toda a honestidade possível.
5. Se você quiser escrever algum comentário, faça-o em folha separada.
6. Não esqueça de preencher os dados pessoais na última folha.

1. Se você pudesse acordar na hora que você quisesse, a que horas você se levantaria?



2. Se você pudesse ir dormir na hora que você quisesse, a que horas você se deitaria?



3. Até que ponto você é dependente do despertador ou de outra pessoa para acordar de manhã?

Nada dependente

Um pouco dependente

Dependente

Muito dependente

4. Você acha fácil acordar de manhã?

Muito difícil

Um pouco difícil

Fácil

Muito fácil

5. Como você se sente durante a primeira meia hora depois de acordar?

Nada atento

Pouco atento

Atento

Muito atento

6. Como é seu apetite durante a primeira hora depois de acordar?

Muito ruim

Ruim

Bom

Muito bom

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

Muito cansado

Pouco cansado

Em forma

Em plena forma

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

No horário de sempre

Uma hora mais tarde do que o horário de sempre

Duas horas mais tarde do que o horário de sempre

Mais do que duas horas mais tarde do que o horário de sempre

9. Você decidiu fazer exercícios físicos. Um amigo sugeriu o horário das 7:00 às 8:00 horas da manhã, duas vezes por semana. Como você se sentiria?

Estaria em forma

Estaria razoavelmente em forma

Acharia isso difícil

Acharia isso muito difícil

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



11. Você quer estar no máximo de sua forma para fazer um teste que é mentalmente cansativo (por exemplo, uma prova na escola). Qual desses horários você escolheria para fazer esse teste?

Das 8:00 às 10:00

Das 11:00 às 13:00

Das 15:00 às 17:00

Das 19:00 às 21:00

12. Se você fosse se deitar às 23:00 horas, como você se sentiria:

Nada cansado

Um pouco cansado

Cansado

Muito cansado

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

Acordaria na hora de sempre, sem sono

Acordaria na hora de sempre, com sono

Acordaria na hora sempre e dormiria novamente

Acordaria mais tarde do que de costume

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

Só dormiria depois de realizar a tarefa

Tiraria uma soneca antes da tarefa e dormiria depois

Dormiria bastante antes e tiraria uma soneca depois

Só dormiria antes de fazer a tarefa

15. Se você tivesse que fazer duas horas de exercício físico pesado, em qual destes horários você se sentiria melhor?

Das 8:00 às 10:00

Das 11:00 às 13:00

Das 15:00 às 17:00

Das 19:00 às 21:00

16. Você decidiu fazer exercícios físicos. Um amigo sugeriu o horário das 22:00 às 23:00 horas, duas vezes por semana. Pensando apenas na sua disposição, o que você acha de fazer exercícios nesse horário?

Estaria em boa forma

Estaria razoavelmente em forma

Acharia isso difícil

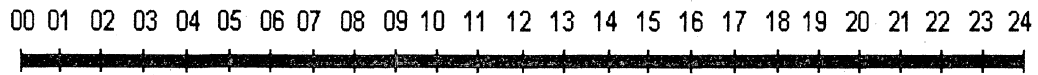
Acharia isso muito difícil

17. Suponha que você pudesse escolher o seu próprio horário da escola e que você tivesse que ficar 5 horas seguidas por dia. Pensando no seu desempenho, qual horário você escolheria?

00 01 02 03 04 05 06 07 08 09 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24



18. A que hora do dia você atinge o seu momento de maior disposição?



19. Fala-se em pessoas matutinas, aquelas que gostam de acordar cedo e dormir cedo e pessoas vespertinas, aquelas que gostam de acordar tarde e dormir tarde. Com qual destes dois tipos você é mais parecido?

Tipo matutino

Mais matutino que vespertino

Mais vespertino que matutino

Tipo vespertino