

DANYELLA SILVA PEREIRA

**“ESTUDO DE ASSOCIAÇÕES ENTRE O GENE *PER3*
E A SINCRONIZAÇÃO DE RITMOS CIRCADIANOS
PELO CLARO/ESCURO”**

Tese apresentada à Universidade Federal de
São Paulo – Escola Paulista de Medicina, para
obtenção do Título de Doutor em Ciências.

SÃO PAULO

2011

DANYELLA SILVA PEREIRA

**“ESTUDO DE ASSOCIAÇÕES ENTRE O GENE *PER3*
E A SINCRONIZAÇÃO DE RITMOS CIRCADIANOS
PELO CLARO/ESCURO”**

Tese apresentada à Universidade Federal de
São Paulo – Escola Paulista de Medicina, para
obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Mario Pedrazzoli

Co-orientador: Prof. Dr. Sergio Tufik

SÃO PAULO

2011

Pereira, Danyella Silva

Estudo de associações entre o gene *PER3* e a sincronização de ritmos circadianos pelo claro/escuro./ Danyella Silva Pereira. -- São Paulo, 2011.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-graduação em Psicobiologia.

Título em inglês: Study of association between *PER3* gene and circadian rhythms synchronization to light/dark.

1. Gene *PER3*.
2. Ritmos circadianos
3. Latitude
4. Sincronização

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
DEPARTAMENTO DE PSICOBIOLOGIA**

Chefe do Departamento: Profa. Dra. Maria Lúcia Oliveira de Souza Formigoni

Coordenadora do Curso de Pós-graduação: Profa. Dra. Vânia D'Almeida

DANYELLA SILVA PEREIRA

**“ESTUDO DE ASSOCIAÇÕES ENTRE O GENE *PER3*
E A SINCRONIZAÇÃO DE RITMOS CIRCADIANOS
PELO CLARO/ESCURO”**

Banca Examindora:

Profa. Dra. Carolina Virginia Macêdo de Azevedo

Prof. Dr. Fernando Mazzilli Louzada

Profa. Dra. Frida Marina Fischer

Prof. Dr. Luis Menna-Barreto

Suplentes:

Profa. Dra. Claudia Roberta de Castro Moreno

Profa. Dra. Débora Cristina Hipólide

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese aos meus pais, Antonio e Dirce,
a minha irmã, Camylla e ao André simplesmente por tudo.

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientador e co-orientador, Prof. Dr. Mario Pedrazzoli e Prof. Dr. Sergio Tufik por toda a ajuda, por todas as oportunidades concedidas, pelo constante apoio e pela confiança depositada em mim durante todos esses anos de trabalho juntos.

À minha família pelo exemplo de vida e por todo apoio, amor, carinho e educação durante todos estes anos.

Ao meu amor, André, por toda ajuda, que foi de fundamental importância para conclusão da tese, por todo o incentivo, pela compreensão, constante apoio, amor, carinho e paciência durante todos estes anos de convivência.

À Vannia Chiodo (ou tia como eu sempre chamo) por todo apoio, carinho e ajuda com os processos finais de conclusão da tese.

À Nessa pela amizade eterna, por toda força desde sempre e por me ajudar na busca por voluntários na Faculdade Oswaldo Cruz.

À Diva pela ajuda nas milhões de extrações de DNA e genotipagens durante a tese e por compartilhar comigo todos os momentos desde o início da minha carreira científica.

À todos do laboratório de Biologia Molecular do Sono que de alguma forma me ajudaram ou compartilharam comigo momentos importantes.

Ao pessoal da Inglaterra pela colaboração científica, por me receberem de forma agradável e me ajudarem sempre que precisei durante minha jornada fora do país.

Ao pessoal da UFRN (Universidade Federal do Rio Grande do Norte) em Natal, em especial ao Prof. Dr. John Fontenele Araújo, a Bruna e ao Bruno, pela colaboração e ajuda durante a seleção dos voluntários, a coleta de dados e também nas análises dos resultados.

À Profa Vânia D'Almeida por me ajudar na fase de seleção dos voluntários me colocando em contato com vários alunos da UNIFESP de Santos.

Aos professores da USP leste que disponibilizaram tempo de suas aulas para me ajudarem com a seleção dos voluntários.

Ao pessoal da USP leste por todas as discussões nas reuniões de quinta-feira, em especial a Valéria por toda ajuda nas análises dos questionários e diários de sono e o Mario Miguel pela ajuda com as análises no *El Temps*.

À todos do departamento de Psicobiologia que de alguma forma me ajudaram na dissertação desta tese, afinal após 10 anos de convivência seria impossível listar todos que eu gostaria de agradecer.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), ao Conselho Nacional de Fundamento Científico e Tecnológico (CNPq), a *Biotechnology and Biological Sciences Research Council* (BBSRC), a *Royal Society* e à Associação Fundo de Incentivo à Pesquisa (AFIP) pelo apoio financeiro.

À todos os animais que são essenciais para o desenvolvimento da pesquisa básica mundial.

À todos voluntários que participaram deste projeto, sem eles seria impossível a conclusão desta dissertação.

E por fim, à todos que de alguma maneira colaboraram com o desenvolvimento desta dissertação, o meu profundo agradecimento.

Este trabalho recebeu apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Processo n°- 2007/05037-9, CEPID - 98/14303-3), do Conselho Nacional de Fundamento Científico e Tecnológico (CNPq), da *Biotechnology and Biological Sciences Research Council* (BBSRC; BB/E003672/1), da *Royal Society* e da Associação Fundo de Incentivo à Pesquisa (AFIP).

SUMÁRIO

Dedicatória	V
Agradecimentos	VII
Apoio Financeiro	X
Lista de tabelas	XIV
Lista de figuras	XIX
Resumo	XXXI
Abstract	XXXIII
1. Introdução	1
1.1. Os genes relógio.....	3
1.2. Animais Geneticamente Modificados.....	7
1.3. Genética Molecular e os Cronotipos.....	9
1.4. Polimorfismo de repetição do gene PER3 em humanos e hipóteses relacionadas a sua função.....	13
2. Objetivos	17
2.1. Objetivo Geral.....	18
2.2. Objetivos Específicos.....	18
3. Materiais e Métodos	19
3.1. Primeira fase experimental.....	20
3.1.1. Animais.....	20
3.1.2. Regime claro/escuro utilizado no estudo.....	21
3.1.3. Análises dos parâmetros circadianos.....	21
- Ângulo de fase de sincronização ao ciclo CE.....	22
- Total de atividade nas fases de claro e escuro.....	23
3.1.4. Análises Estatísticas.....	23
3.2. Segunda fase experimental.....	23
3.2.1. Sujeitos.....	24

3.2.2. Primeira Fase – Caracterização populacional fenotipagem, genotipagem e caracterização demográfica.....	24
3.2.3. Segunda Fase – Caracterização sub-amostrai e análise dos dados.....	25
- Preparação dos dados para as análises dos parâmetros circadianos.....	26
- Análise dos parâmetros circadianos.....	26
3.2.4. Análises Estatísticas.....	28
4. Resultados.....	29
4.1. Primeira fase experimental.....	30
4.2. Segunda fase experimental.....	39
4.2.1. Primeira Fase: caracterização populacional - fenotipagem, genotipagem e caracterização demográfica.....	39
4.2.2. Segunda Fase – Caracterização amostral.....	41
- Análise dos parâmetros circadianos.....	42
- Sugestão de leitura para os próximos passos das análises dos resultados.....	44
- Tabelas.....	45
- Figuras.....	66
5. Discussão.....	97
5.1. Primeira fase experimental.....	98
5.2. Segunda Fase Experimental.....	101
- Limitações do estudo.....	104
5.3. Considerações finais sobre os dois experimentos.....	105
6. Conclusão.....	107
7. Referências Bibliográficas.....	109
8. Anexos.....	117

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Ângulos de fase calculados em todos os grupos de estudo: São Paulo, Natal, <i>PER3^{4/4}</i> , <i>PER3^{5/5}</i> , agosto e novembro.....	28
Tabela 2: Caracterização da amostra coletada em Natal e em São Paulo.....	40
Tabela 3: Caracterização dos indivíduos selecionados para participarem da segunda fase do estudo.....	42
Tabela 4: Comparações gerais das fases circadianas entre os grupos amostrais em São Paulo e Natal, na primeira fase do estudo (agosto).....	45
Tabela 5: Comparações gerais das fases circadianas entre os grupos amostrais em São Paulo e Natal, na segunda fase do estudo (novembro).....	46
Tabela 6: Comparações das fases circadianas entre os grupos amostrais do genótipo <i>PER3^{4/4}</i> em São Paulo e Natal, na primeira fase do estudo (agosto).....	47
Tabela 7: Comparações das fases circadianas entre os grupos amostrais do genótipo <i>PER3^{4/4}</i> em São Paulo e Natal, na segunda fase do estudo (novembro).....	47
Tabela 8: Comparações das fases circadianas entre os grupos amostrais do genótipo <i>PER3^{5/5}</i> em São Paulo e Natal, na primeira fase do estudo (agosto).....	47
Tabela 9: Comparações das fases circadianas entre os grupos amostrais do genótipo <i>PER3^{5/5}</i> em São Paulo e Natal, na segunda fase do estudo (novembro).....	48
Tabela 10: Comparação das fases das variáveis circadianas entre os genótipos <i>PER3^{4/4}</i> e <i>PER3^{5/5}</i> no grupo amostral em São Paulo, na primeira fase do estudo (agosto).....	48

Tabela 11: Comparação das fases das variáveis circadianas entre os genótipos <i>PER3^{4/4}</i> e <i>PER3^{5/5}</i> no grupo amostral em São Paulo, na segunda fase do estudo (novembro).....	49
Tabela 12: Comparação das fases das variáveis circadianas entre os genótipos <i>PER3^{4/4}</i> e <i>PER3^{5/5}</i> no grupo amostral em Natal, na primeira fase do estudo (agosto).....	49
Tabela 13: Comparação das fases das variáveis circadianas entre os genótipos <i>PER3^{4/4}</i> e <i>PER3^{5/5}</i> no grupo amostral em Natal, na segunda fase do estudo (novembro).....	49
Tabela 14: Comparações das fases das variáveis circadianas do estudo entre os meses de agosto e novembro, no grupo amostral em São Paulo.....	50
Tabela 15: Comparações das fases das variáveis circadianas do estudo entre os meses de agosto e novembro, no grupo amostral do genótipo <i>PER3^{4/4}</i> em São Paulo.....	51
Tabela 16: Comparações das fases das variáveis circadianas do estudo entre os meses de agosto e novembro, no grupo amostral do genótipo <i>PER3^{5/5}</i> em São Paulo.....	51
Tabela 17: Comparações das fases das variáveis circadianas do estudo entre os meses de agosto e novembro, no grupo amostral em Natal.....	52
Tabela 18: Comparações das fases das variáveis circadianas do estudo entre os meses de agosto e novembro, no grupo amostral do genótipo <i>PER3^{4/4}</i> em Natal.....	52

Tabela 19: Comparações das fases das variáveis circadianas do estudo entre os meses de agosto e novembro, no grupo amostral do genótipo <i>PER3^{5/5}</i> em Natal.....	53
Tabela 20: Relações de fase entre os grupos amostrais em São Paulo e Natal, na primeira fase do estudo (agosto).....	55
Tabela 21: Relações de fase entre os grupos amostrais em São Paulo e Natal, na segunda fase do estudo (novembro).....	55
Tabela 22: Relações de fase entre os grupos amostrais do genótipo <i>PER3^{4/4}</i> em São Paulo e Natal, na primeira fase do estudo (agosto).....	56
Tabela 23: Relações de fase entre os grupos amostrais do genótipo <i>PER3^{4/4}</i> em São Paulo e Natal, na segunda fase do estudo (novembro).....	56
Tabela 24: Relações de fase entre os grupos amostrais do genótipo <i>PER3^{5/5}</i> em São Paulo e Natal, na primeira fase do estudo (agosto).....	57
Tabela 25: Relações de fase entre os grupos amostrais do genótipo <i>PER3^{5/5}</i> em São Paulo e Natal, na segunda fase do estudo (novembro).....	57
Tabela 26: Relações de fase entre os grupos amostrais dos genótipos <i>PER3^{4/4}</i> e <i>PER3^{5/5}</i> na cidade de São Paulo, na primeira fase do estudo (agosto).....	58
Tabela 27: Relações de fase entre os grupos amostrais dos genótipos <i>PER3^{4/4}</i> e <i>PER3^{5/5}</i> na cidade de São Paulo, na segunda fase do estudo (novembro).....	58
Tabela 28: Relações de fase entre os grupos amostrais dos genótipos <i>PER3^{4/4}</i> e <i>PER3^{5/5}</i> na cidade de Natal, na primeira fase do estudo (agosto).....	59

Tabela 29: Relações de fase entre os grupos amostrais dos genótipos <i>PER3</i> ^{4/4} e <i>PER3</i> ^{5/5} na cidade de Natal, na segunda fase do estudo (novembro).....	59
Tabela 30: Relações de fase entre as duas fases do estudo (agosto e novembro) no grupo amostral em São Paulo.....	60
Tabela 31: Relações de fase entre as duas fases do estudo (agosto e novembro) no grupo amostral do genótipo <i>PER3</i> ^{4/4} em São Paulo.....	61
Tabela 32: Relações de fase entre as duas fases do estudo (agosto e novembro) no grupo amostral do genótipo <i>PER3</i> ^{5/5} em São Paulo.....	62
Tabela 33: Relações de fase entre as duas fases do estudo (agosto e novembro) no grupo amostral em Natal.....	63
Tabela 34: Relações de fase entre as duas fases do estudo (agosto e novembro) no grupo amostral do genótipo <i>PER3</i> ^{4/4} em Natal.....	64
Tabela 35: Relações de fase entre as duas fases do estudo (agosto e novembro) no grupo amostral do genótipo <i>PER3</i> ^{5/5} em Natal.....	65

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Oscilação central e periférica. Esquema representativo da regulação de fase dos osciladores periféricos.....	03
Figura 2: Representação do mecanismo molecular do sistema de temporização circadiano em uma célula.	07
Figura 3: Descrição dos ciclos claro/escuro aos quais os animais ficaram expostos durante o experimento.....	21
Figura 4: Actogramas em duplo plot de 2 animais do grupo <i>Per3^{-/-}</i>	31
Figura 5: Actogramas em duplo plot de 2 animais do grupo <i>Per3^{-/-}</i>	32
Figura 6: Actogramas em duplo plot de 2 animais do grupo <i>Per3^{-/-}</i>	33
Figura 7: Actogramas em duplo plot de 2 animais do grupo selvagem (controles).....	34
Figura 8: Actogramas em duplo plot de 2 animais do grupo selvagem (controles).....	35
Figura 9: Actogramas em duplo plot de 2 animais do grupo selvagem (controles).....	36
Figura 10: Atividade em centímetros dos animais do grupo controle (selvagens) e do grupo <i>Per3^{-/-}</i>	37
Figura 11: Ângulos de fase de sincronização ao CE em cada regime de luz analisado.....	38
Figura 12: Distribuição da população analisada quanto a preferência diurna em São Paulo e no Rio Grande do Norte por meio do questionário HO.....	40
Figura 13: Distribuição da população analisada quanto a preferência diurna em São Paulo e no Rio Grande do Norte por meio do MCTQ.....	41
Figura 14: Representação gráfica das fases expressas no mês de agosto, nos grupos de indivíduos nas cidades de São Paulo e Natal.....	68

Figura 15: Representação gráfica das fases expressas no mês de novembro, nos grupos de indivíduos nas cidades de São Paulo e Natal.....	69
Figura 16: Representação gráfica das fases expressas no mês de agosto, nos grupos de indivíduos do genótipo <i>PER3^{4/4}</i> nas cidades de São Paulo e Natal.....	71
Figura 17: Representação gráfica das fases expressas no mês de novembro, nos grupos de indivíduos do genótipo <i>PER3^{4/4}</i> nas cidades de São Paulo e Natal.....	72
Figura 18: Representação gráfica das fases expressas no mês de agosto, nos grupos de indivíduos do genótipo <i>PER3^{5/5}</i> nas cidades de São Paulo e Natal.....	74
Figura 19: Representação gráfica das fases expressas no mês de novembro, nos grupos de indivíduos do genótipo <i>PER3^{5/5}</i> nas cidades de São Paulo e Natal.....	75
Figura 20: Representação gráfica das fases expressas no grupo de indivíduos em São Paulo, nos meses de agosto e novembro.....	77
Figura 21: Representação gráfica das fases expressas no grupo de indivíduos do genótipo <i>PER3^{4/4}</i> em São Paulo, nos meses de agosto e novembro.....	78
Figura 22: Representação gráfica das fases expressas no grupo de indivíduos do genótipo <i>PER3^{5/5}</i> em São Paulo, nos meses de agosto e novembro.....	79
Figura 23: Representação gráfica das fases expressas no grupo de indivíduos em Natal, nos meses de agosto e novembro.....	80
Figura 24: Representação gráfica das fases expressas no grupo de indivíduos genótipo <i>PER3^{4/4}</i> em Natal, nos meses de agosto e novembro.....	81
Figura 25: Representação gráfica das fases expressas no grupo de indivíduos genótipo <i>PER3^{5/5}</i> em Natal, nos meses de agosto e novembro.....	82

Figura 26: Representação gráfica circular da fases expressas no mês de agosto, nos grupos de indivíduos nas cidades de São Paulo e Natal.....	84
Figura 27: Representação gráfica circular das fases expressas no mês de novembro, nos grupos de indivíduos nas cidades de São Paulo e Natal.....	85
Figura 28: Representação gráfica circular das fases expressas no mês de agosto, nos grupos de indivíduos do genótipo <i>PER3^{4/4}</i> nas cidades de São Paulo e Natal.....	86
Figura 29: Representação gráfica circular das fases expressas no mês de novembro, nos grupos de indivíduos do genótipo <i>PER3^{4/4}</i> nas cidades de São Paulo e Natal.....	87
Figura 30: Representação gráfica circular das fases expressas no mês de agosto, nos grupos de indivíduos do genótipo <i>PER3^{5/5}</i> nas cidades de São Paulo e Natal.....	88
Figura 31: Representação gráfica circular das fases expressas no mês de novembro, nos grupos de indivíduos do genótipo <i>PER3^{5/5}</i> nas cidades de São Paulo e Natal.....	89
Figura 32: Representação gráfica circular das fases expressas no grupo de indivíduos em São Paulo, nos meses de agosto e novembro.....	90
Figura 33: Representação gráfica circular das fases expressas no grupo de indivíduos do genótipo <i>PER3^{4/4}</i> em São Paulo, nos meses de agosto e novembro.....	91

Figura 34: Representação gráfica circular das fases expressas no grupo de indivíduos do genótipo <i>PER3^{5/5}</i> em São Paulo, nos meses de agosto e novembro.....	92
Figura 35: Representação gráfica circular das fases expressas no grupo de indivíduos em Natal, nos meses de agosto e novembro.....	93
Figura 36: Representação gráfica circular das fases expressas no grupo de indivíduos genótipo <i>PER3^{4/4}</i> em Natal, nos meses de agosto e novembro.....	94
Figura 37: Representação gráfica circular das fases expressas no grupo de indivíduos genótipo <i>PER3^{5/5}</i> em Natal, nos meses de agosto e novembro.....	95

Lista de Figuras do Anexo 11

Figura 1: Representação gráfica das fases expressas em relação ao nascer do sol (ponto de referência) no mês de agosto, nos grupos de indivíduos nas cidades de São Paulo e Natal.....	143
Figura 2: Representação gráfica das fases expressas em relação ao nascer do sol (ponto de referência) no mês de novembro, nos grupos de indivíduos nas cidades de São Paulo e Natal.....	144
Figura 3: Representação gráfica das fases expressas em relação ao pôr sol (ponto de referência) no mês de agosto, nos grupos de indivíduos nas cidades de São Paulo e Natal.....	145
Figura 4: Representação gráfica das fases expressas em relação ao pôr do sol (ponto de referência) no mês de novembro, nos grupos de indivíduos nas cidades de São Paulo e Natal.....	146

Figura 5: Representação gráfica das fases expressas em relação a MFM6 da temperatura (ponto de referência) no mês de agosto, nos grupos de indivíduos nas cidades de São Paulo e Natal.....	147
Figura 6: Representação gráfica das fases expressas em relação a MFM6 da temperatura (ponto de referência) no mês de novembro, nos grupos de indivíduos nas cidades de São Paulo e Natal.....	148
Figura 7: Representação gráfica das fases expressas em relação ao início da atividade (ponto de referência) no mês de agosto, nos grupos de indivíduos nas cidades de São Paulo e Natal.....	149
Figura 8: Representação gráfica das fases expressas em relação ao início da atividade (ponto de referência) no mês de novembro, nos grupos de indivíduos nas cidades de São Paulo e Natal.....	150
Figura 9: Representação gráfica das fases expressas em relação ao meio da fotofase (ponto de referência) no mês de agosto, nos grupos de indivíduos nas cidades de São Paulo e Natal.....	151
Figura 10: Representação gráfica das fases expressas em relação ao meio da fotofase (ponto de referência) no mês de novembro, nos grupos de indivíduos nas cidades de São Paulo e Natal.....	152
Figura 11: Representação gráfica das fases expressas em relação ao nascer do sol (ponto de referência) no mês de agosto, nos grupos de indivíduos do genótipo <i>PER3^{4/4}</i> nas cidades de São Paulo e Natal.....	154
Figura 12: Representação gráfica das fases expressas em relação ao nascer do sol (ponto de referência) no mês de novembro, nos grupos de indivíduos do genótipo <i>PER3^{4/4}</i> nas cidades de São Paulo e Natal.....	155

Figura 13: Representação gráfica das fases expressas em relação ao pôr do sol (ponto de referência) no mês de agosto, nos grupos de indivíduos do genótipo <i>PER3^{4/4}</i> nas cidades de São Paulo e Natal.....	156
Figura 14: Representação gráfica das fases expressas em relação ao pôr do sol (ponto de referência) no mês de novembro, nos grupos de indivíduos do genótipo <i>PER3^{4/4}</i> nas cidades de São Paulo e Natal.....	157
Figura 15: Representação gráfica das fases expressas em relação a MFM6 da temperatura (ponto de referência) no mês de agosto, nos grupos de indivíduos do genótipo <i>PER3^{4/4}</i> nas cidades de São Paulo e Natal.....	158
Figura 16: Representação gráfica das fases expressas em relação a MFM6 da temperatura (ponto de referência) no mês de novembro, nos grupos de indivíduos do genótipo <i>PER3^{4/4}</i> nas cidades de São Paulo e Natal.....	159
Figura 17: Representação gráfica das fases expressas em relação ao início da atividade (ponto de referência) no mês de agosto, nos grupos de indivíduos do genótipo <i>PER3^{4/4}</i> nas cidades de São Paulo e Natal.....	160
Figura 18: Representação gráfica das fases expressas em relação ao início da atividade (ponto de referência) no mês de novembro, nos grupos de indivíduos do genótipo <i>PER3^{4/4}</i> nas cidades de São Paulo e Natal.....	161
Figura 19: Representação gráfica das fases expressas em relação ao meio da fotofase (ponto de referência) no mês de agosto, nos grupos de indivíduos do genótipo <i>PER3^{4/4}</i> nas cidades de São Paulo e Natal.....	162
Figura 20: Representação gráfica das fases expressas em relação ao meio da fotofase (ponto de referência) no mês de novembro, nos grupos de indivíduos do genótipo <i>PER3^{4/4}</i> nas cidades de São Paulo e Natal.....	163

Figura 21: Representação gráfica das fases expressas em relação ao nascer do sol (ponto de referência) no mês de agosto, nos grupos de indivíduos do genótipo <i>PER3^{5/5}</i> nas cidades de São Paulo e Natal.....	164
Figura 22: Representação gráfica das fases expressas em relação ao nascer do sol (ponto de referência) no mês de novembro, nos grupos de indivíduos do genótipo <i>PER3^{5/5}</i> nas cidades de São Paulo e Natal.....	165
Figura 23: Representação gráfica das fases expressas em relação ao pôr do sol (ponto de referência) no mês de agosto, nos grupos de indivíduos do genótipo <i>PER3^{5/5}</i> nas cidades de São Paulo e Natal.....	166
Figura 24: Representação gráfica das fases expressas em relação ao pôr do sol (ponto de referência) no mês de novembro, nos grupos de indivíduos do genótipo <i>PER3^{5/5}</i> nas cidades de São Paulo e Natal.....	167
Figura 25: Representação gráfica das fases expressas em relação a MFM6 da temperatura (ponto de referência) no mês de agosto, nos grupos de indivíduos do genótipo <i>PER3^{5/5}</i> nas cidades de São Paulo e Natal.....	168
Figura 26: Representação gráfica das fases expressas em relação a MFM6 da temperatura (ponto de referência) no mês de novembro, nos grupos de indivíduos do genótipo <i>PER3^{5/5}</i> nas cidades de São Paulo e Natal.....	169
Figura 27: Representação gráfica das fases expressas em relação ao início da atividade (ponto de referência) no mês de agosto, nos grupos de indivíduos do genótipo <i>PER3^{5/5}</i> nas cidades de São Paulo e Natal.....	170
Figura 28: Representação gráfica das fases expressas em relação ao início da atividade (ponto de referência) no mês de novembro, nos grupos de indivíduos do genótipo <i>PER3^{5/5}</i> nas cidades de São Paulo e Natal.....	171

Figura 29: Representação gráfica das fases expressas em relação ao meio da fotofase (ponto de referência) no mês de agosto, nos grupos de indivíduos do genótipo <i>PER3^{5/5}</i> nas cidades de São Paulo e Natal.....	172
Figura 30: Representação gráfica das fases expressas em relação ao meio da fotofase (ponto de referência) no mês de novembro, nos grupos de indivíduos do genótipo <i>PER3^{5/5}</i> nas cidades de São Paulo e Natal.....	173
Figura 31: Representação gráfica das fases expressas em relação ao nascer do sol (ponto de referência) no grupo de indivíduos em São Paulo, nos meses de agosto e novembro.....	175
Figura 32: Representação gráfica das fases expressas em relação ao pôr do sol (ponto de referência) no grupo de indivíduos em São Paulo, nos meses de agosto e novembro.....	176
Figura 33: Representação gráfica das fases expressas em relação a MFM6 da temperatura (ponto de referência) no grupo de indivíduos em São Paulo, nos meses de agosto e novembro.....	177
Figura 34: Representação gráfica das fases expressas em relação ao início da atividade (ponto de referência) no grupo de indivíduos em São Paulo, nos meses de agosto e novembro.....	178
Figura 35: Representação gráfica das fases expressas em relação ao meio da fotofase (ponto de referência) no grupo de indivíduos em São Paulo, nos meses de agosto e novembro.....	179
Figura 36: Representação gráfica das fases expressas em relação ao nascer do sol (ponto de referência) no grupo de indivíduos do genótipo <i>PER3^{4/4}</i> em São Paulo, nos meses de agosto e novembro.....	180

Figura 37: Representação gráfica das fases expressas em relação ao pôr do sol (ponto de referência) no grupo de indivíduos do genótipo <i>PER3^{4/4}</i> em São Paulo, nos meses de agosto e novembro.....	181
Figura 38: Representação gráfica das fases expressas em relação a MFM6 da temperatura (ponto de referência) no grupo de indivíduos do genótipo <i>PER3^{4/4}</i> em São Paulo, nos meses de agosto e novembro.....	182
Figura 39: Representação gráfica das fases expressas em relação ao início da atividade (ponto de referência) no grupo de indivíduos do genótipo <i>PER3^{4/4}</i> em São Paulo, nos meses de agosto e novembro.....	183
Figura 40: Representação gráfica das fases expressas em relação ao meio da fotofase (ponto de referência) no grupo de indivíduos do genótipo <i>PER3^{4/4}</i> em São Paulo, nos meses de agosto e novembro.....	184
Figura 41: Representação gráfica das fases expressas em relação ao nascer do sol (ponto de referência) no grupo de indivíduos do genótipo <i>PER3^{5/5}</i> em São Paulo, nos meses de agosto e novembro.....	185
Figura 42: Representação gráfica das fases expressas em relação ao pôr do sol (ponto de referência) no grupo de indivíduos do genótipo <i>PER3^{5/5}</i> em São Paulo, nos meses de agosto e novembro.....	186
Figura 43: Representação gráfica das fases expressas em relação a MFM6 da temperatura (ponto de referência) no grupo de indivíduos do genótipo <i>PER3^{5/5}</i> em São Paulo, nos meses de agosto e novembro.....	187
Figura 44: Representação gráfica das fases expressas em relação ao início da atividade (ponto de referência) no grupo de indivíduos do genótipo <i>PER3^{5/5}</i> em São Paulo, nos meses de agosto e novembro.....	188

Figura 45: Representação gráfica das fases expressas em relação ao meio da fotofase (ponto de referência) no grupo de indivíduos do genótipo <i>PER3^{5/5}</i> em São Paulo, nos meses de agosto e novembro.....	189
Figura 46: Representação gráfica das fases expressas em relação ao nascer do sol (ponto de referência) no grupo de indivíduos em Natal, nos meses de agosto e novembro.....	190
Figura 47: Representação gráfica das fases expressas em relação ao pôr do sol (ponto de referência) no grupo de indivíduos em Natal, nos meses de agosto e novembro.....	191
Figura 48: Representação gráfica das fases expressas em relação a MFM6 da temperatura (ponto de referência) no grupo de indivíduos em Natal, nos meses de agosto e novembro.....	192
Figura 49: Representação gráfica das fases expressas em relação ao início da atividade (ponto de referência) no grupo de indivíduos em Natal, nos meses de agosto e novembro.....	193
Figura 50: Representação gráfica das fases expressas em relação ao meio da fotofase (ponto de referência) no grupo de indivíduos em Natal, nos meses de agosto e novembro.....	194
Figura 51: Representação gráfica das fases expressas em relação ao nascer do sol (ponto de referência) no grupo de indivíduos do genótipo <i>PER3^{4/4}</i> em Natal, nos meses de agosto e novembro.....	195
Figura 52: Representação gráfica das fases expressas em relação ao pôr do sol (ponto de referência) no grupo de indivíduos do genótipo <i>PER3^{4/4}</i> em Natal, nos meses de agosto e novembro.....	196

Figura 53: Representação gráfica das fases expressas em relação a MFM6 da temperatura (ponto de referência) no grupo de indivíduos do genótipo <i>PER3^{4/4}</i> em Natal, nos meses de agosto e novembro.....	197
Figura 54: Representação gráfica das fases expressas em relação ao início da atividade (ponto de referência) no grupo de indivíduos do genótipo <i>PER3^{4/4}</i> em Natal, nos meses de agosto e novembro.....	198
Figura 55: Representação gráfica das fases expressas em relação ao meio da fotofase (ponto de referência) no grupo de indivíduos do genótipo <i>PER3^{4/4}</i> em Natal, nos meses de agosto e novembro.....	199
Figura 56: Representação gráfica das fases expressas em relação ao nascer do sol (ponto de referência) no grupo de indivíduos do genótipo <i>PER3^{5/5}</i> em Natal, nos meses de agosto e novembro.....	200
Figura 57: Representação gráfica das fases expressas em relação ao pôr do sol (ponto de referência) no grupo de indivíduos do genótipo <i>PER3^{5/5}</i> em Natal, nos meses de agosto e novembro.....	201
Figura 58: Representação gráfica das fases expressas em relação a MFM6 da temperatura (ponto de referência) no grupo de indivíduos do genótipo <i>PER3^{5/5}</i> em Natal, nos meses de agosto e novembro.....	202
Figura 59: Representação gráfica das fases expressas em relação ao início da atividade (ponto de referência) no grupo de indivíduos do genótipo <i>PER3^{5/5}</i> em Natal, nos meses de agosto e novembro.....	203
Figura 60: Representação gráfica das fases expressas em relação ao meio da fotofase (ponto de referência) no grupo de indivíduos do genótipo <i>PER3^{5/5}</i> em Natal, nos meses de agosto e novembro.....	204

RESUMO

O gene *Per3* está envolvido na regulação de mecanismos de temporização circadiana. Sua real função ainda não está totalmente elucidada. Algumas hipóteses atuais nos levam a crer que este gene tenha algum papel no mecanismo de sincronização ao estímulo luminoso em ciclos claro/escuro. O principal objetivo deste trabalho foi investigar as possíveis associações entre o gene *Per3* e a regulação da ritmicidade circadiana dependente da duração da fotofase. A parte experimental foi dividida em duas etapas: 1. Trabalhamos com camundongos *knockout* para o gene (*Per3^{-/-}*) e avaliamos os possíveis mecanismos pelos quais o gene poderia estar envolvido na adaptação e duração da fotofase, expondo esses animais a regimes de claro/escuro diferenciados de forma que houvesse fotofases muito curtas ou longas. 2. Foi feito um experimento em humanos, em duas localidades (Natal e São Paulo) situadas em diferentes latitudes (05°47'S e 23°32'S, respectivamente). O protocolo experimental foi realizado em estações do ano diferentes de forma que pudéssemos mimetizar a variação de fotofase usada em condições laboratoriais. O experimento em humanos foi feito com o intuito de verificar se as inferências feitas a partir do modelo animal eram de alguma forma aplicáveis. Sugerimos a partir dos resultados obtidos na primeira fase do estudo que os animais *Per3^{-/-}* sejam menos sensíveis ao mascaramento à luz e os resultados da segunda etapa mostram, um atraso nas fases das variáveis circadianas analisadas (início e final da atividade, meia fase de M10 da atividade e meia fase de M6 da temperatura) em Natal, principalmente no grupo de indivíduos do genótipo *PER3^{5/5}* durante o mês de novembro. De maneira geral, os dados nos camundongos apontam um caminho relacionado com estudos de mascaramento à luz para elucidação da função do gene e os dados em humanos mostram que é possível associá-lo aos ajustes de fase derivados de características específicas do ciclo claro/escuro dados por diferentes latitudes.

ABSTRACT

Per3 gene is a component of the circadian molecular mechanism. Its function is not completely understood. One of the hypotheses is that *Per3* gene may be involved in light synchronization mechanism. The aim of this project was investigate the association between *Per3* gene and circadian rhythmicity dependent of the photophase duration in different light/dark cycle regimens. The experimental protocol was divided in two parts: 1. We investigated the possible mechanisms of association between *Per3* gene and adaptation/duration of the photophase in *Per3*^{-/-} mice by exposing the animals to different light/dark cycles with long or short photophases 2. Based on the results of experiment 1, we developed an experiment in humans in order to investigate if the results in mice were somehow applicable to our population. Subjects from two locations with different latitudes were selected (Natal and São Paulo) and the experiment was carried out in two different seasons of the year to mimic photophase variation. The first part of our results suggested that *Per3* gene is associated with sensitivity of masking by light. In the second part of the study, we found a phase delay in the circadian parameters analyzed (beginning and end of activity, markers of activity (M10) and temperature (M6)) in the *PER3*^{5/5} group from Natal on November, when compared to the São Paulo group. Our data in mice point out a new hypothesis related to masking effect that may contribute to the understanding of *Per3* gene function in the regulation of circadian rhythms and the human data show that it is possible to associate *Per3* gene with the phase adjustments derived from specific characteristics of light/dark cycle in different latitudes.

1. INTRODUÇÃO

Cronobiologia é a ciência que estuda a temporalidade na matéria viva, o que inclui o estudo de ritmos biológicos. É uma ciência multidisciplinar, que engloba diversas áreas de estudo como: fisiologia, métodos moleculares e medicina.

Os ritmos biológicos são oscilações das variáveis biológicas em determinado intervalo de tempo. Podem ser divididos em três grandes categorias: ritmos ultradianos, ritmos circadianos e ritmos infradianos. Os ritmos ultradianos, são ritmos com período menor de 20h e de alta frequência, como exemplo, os batimentos cardíacos. Os ritmos infradianos são ritmos com período maior de 28h e de baixa frequência, como exemplo, o ciclo menstrual. Os ritmos circadianos (*"circa diem"* = cerca de um dia) são ritmos que duram aproximadamente $24 \pm 4h$, exemplo, ritmo de atividade/repouso. Neste trabalho, teremos como foco principal o estudo dos ritmos circadianos.

Os ritmos circadianos são gerados endogenamente e sincronizados por pistas externas como o ciclo claro/escuro, as pistas sociais, o ritmo de alimentação, entre outros. Existem diversos osciladores circadianos espalhados pelo nosso organismo tanto na periferia como no sistema nervoso central. Os núcleos supraquiasmáticos (NSQs) do hipotálamo são, de forma geral, considerados os osciladores circadianos mestres, no entanto, cada tecido e cada célula do nosso organismo tem a capacidade intrínseca de oscilar circadianamente. Todos estes osciladores trabalham em conjunto e deste trabalho emergem nossos ritmos circadianos, como por exemplo, o ciclo sono-vigília, os ritmos de alimentação, de temperatura e inúmeros outros. O oscilador mestre tem como uma de suas principais funções sincronizar ou regular a fase dos osciladores periféricos, contribuindo para a organização temporal interna, além de contribuir na sincronização aos ciclos ambientais (Brandstaetter, 2004; Stratmann & Schibler, 2006) (Figura 1).

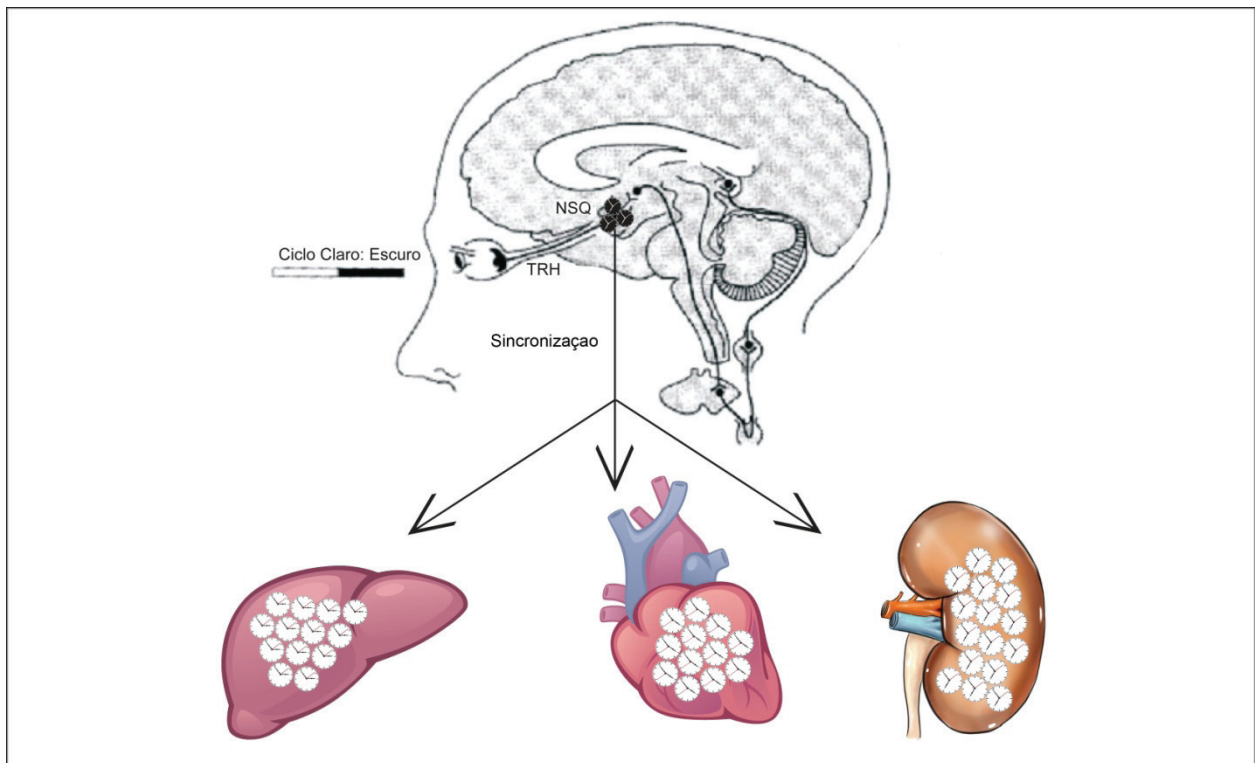


Figura 1: Oscilação central e periférica. Esquema representativo da regulação de fase dos osciladores periféricos. NSQ = núcleos supraquiasmáticos do hipotálamo, TRH = trato retino hipotalâmico.

O cerne do sistema de temporização é composto por alguns genes que estão envolvidos com o controle dos ritmos circadianos celulares, o chamado mecanismo molecular de temporização. Alterações nestes genes podem atrasar ou adiantar a fase da expressão dos ritmos gerados endogenamente (para revisão, Pereira e col.,2009).

1.1. Os genes relógio

A primeira evidência genética da regulação de ritmos biológicos foi publicada em 1971 por Konopka e Benzer. Estes pesquisadores mostraram que moscas do gênero *Drosophila* mutantes apresentaram uma ritmicidade circadiana anormal de atividade locomotora e eclosão de pupas. Estes animais colocados em livre-curso, ou seja, sem a presença de pistas temporais ambientais externas apresentaram basicamente três

fenótipos aberrantes: animais arrítmicos, moscas com período circadiano de locomoção e eclosão curtos (19h), e moscas *Drosophilas* com período longo (28h). A partir destes diferentes fenótipos foi sugerido que a mutação presente estava localizada em algum gene funcional, no entanto, nesta época não existiam ferramentas suficientes para identificar qual o gene envolvido com este comportamento.

Somente em 1988 foi publicada a primeira evidência da regulação genética do ritmo circadiano de atividade/repouso em mamíferos (Ralph e Menaker, 1998). Estes pesquisadores observaram que um dos animais de seu laboratório tinha uma regulação anormal do ritmo circadiano de atividade/repouso e quando colocado em livre-curso apresentava um curto período de atividade locomotora/repouso e uma sincronização anormal ao ciclo claro/escuro (CE). Este animal tinha um ângulo de fase de sincronização à luz muito diferente dos outros animais. Sua atividade começava muito antes das luzes apagarem e terminava antes das luzes acenderem. Alguns cruzamentos foram feitos entre o animal mutante e animais do tipo selvagem, e três fenótipos diferentes foram obtidos: animais com período médio de 24,1h, hamsters com período médio de 22h, e outro grupo com período médio de 20h. O cruzamento entre estes fenótipos mostrou que a mutação ocorreu em um único locus autossômico e é parcialmente dominante, seguindo um padrão de herança mendeliano. Nesta época, esta mutação foi denominada de mutação *tau* (por alterar o tamanho do período dos animais) e somente no ano de 2000, Lowrey e col. clonaram o gene *tau* em camundongos e demonstraram ser de fato, o gene da caseína quinase I épsilon, uma importante enzima envolvida com o sistema de temporização humano.

As investigações moleculares da ritmicidade circadiana em mamíferos evoluíram rapidamente e diversos genes foram identificados como participantes do sistema de temporização.

O primeiro gene do sistema de temporização em mamíferos foi descoberto em 1994 por Vitaterna e col. Utilizando um agente mutagênico, os pesquisadores induziram mutações em camundongos que resultaram em alterações na duração do período endógeno e perda da ritmicidade circadiana. O cruzamento entre animais heterozigotos mutantes produziu três fenótipos diferentes para a geração F2, indicando que a mutação estava localizada em um único gene que está envolvido na regulação do comportamento circadiano de atividade/reposo em mamíferos. Análises posteriores demonstraram que este gene está localizado no cromossomo 5 em camundongos (região equivalente ao cromossomo 4 humano), sendo denominado *Clock* (do inglês, **C**ircadian **L**ocomotor **O**utput **C**ycle **K**aput).

Apartir de então, diversos genes do sistema de temporização foram identificados em mamíferos. Estes genes foram então chamados de genes relógio. São eles: gene *Bmal1*, *Period 1 (Per1)*, *Period 2 (Per2)*, *Period 3 (Per3)*, *Cryptocromo 1 (Cry1)*, *Cryptocromo 2 (Cry2)*, *Caseína Quinase I épsilon (CKI ϵ)*, *Caseína Quinase I delta (CKI δ)*, *Rev-Erba*, *Rora* (Akiyama e col., 1999; Darlington e col., 1998; Gallego e Virshup, 2007; Gekakis e col., 1998; Lowrey e col., 2000; Sangoram e col., 1998; Shearman e col., 2000A; Yagita e col., 2000; Zylka e col., 1998).

Com a descoberta de alguns dos genes relógio foi possível demonstrar a interação complexa existente entre eles, e assim a ideia de um mecanismo molecular de temporização foi aos poucos sendo construída. Em 1998, foi demonstrado que as proteínas CLOCK e BMAL1 se unem, formando um heterodímero que é responsável por promover a transcrição dos genes *Per1*, *Per2* e *Per3* (Gekakis e col., 1998). Neste mesmo ano, Sangoram e col., identificaram o gene *Timeless (Tim)* em camundongos e humanos, e observaram que elementos positivos (CLOCK e BMAL1) e elementos negativos (PER e TIM) estão envolvidos na alça de retroalimentação circadiana e geram oscilações circadianas nas células de mamíferos. Esse mecanismo é muito semelhante ao observado em *Drosophila*. No entanto, Gotter e col. em 2000, verificaram que o gene

Tim é essencial para o relógio circadiano em *Drosophila*, mas em camundongos este gene é importante para o desenvolvimento embrionário e não para a função circadiana.

Após estas descobertas foi proposto um mecanismo para explicar o papel de cada gene relógio no mecanismo de temporização: os genes *Clock* e *Bmal1*, que fazem parte da alça de retroalimentação positiva, codificam proteínas que quando sintetizadas se unem formando o heterodímero CLOCK-BMAL1. Este heterodímero regula a expressão dos componentes negativos da alça de retroalimentação, que são os genes *Per1*, *Per2*, *Per3*, *Cry1*, *Cry2*. Estes codificam proteínas as quais se dimerizam no citoplasma e são fosforiladas pelas enzimas CKI ϵ e CKI δ . Regulados pela fosforilação, estes dímeros e heterodímeros interagem com o complexo CLOCK-BMAL1 inibindo a transcrição de seus próprios genes. Esta cascata de reações gera uma alça autorregulatória de transcrição-tradução que dura aproximadamente 24h. (Akiyama e col., 1999; Darlington e col., 1998; Gallego e Virshup, 2007; Gekakis e col., 1998; Lowrey e col., 2000; Sangoram e col., 1998; Shearman e col., 2000A; Yagita e col., 2000; Zylka e col., 1998) (Figura 2).

Em 2003, Allada propôs uma segunda alça autorregulatória de transcrição-tradução em *Drosophila* que supostamente poderia esclarecer melhor o mecanismo de ativação e inibição já descrito anteriormente pela primeira alça. Em mamíferos esta alça adicional teria a função de estabilizar o mecanismo de transcrição e tradução, controlando a expressão e oscilações do gene *Bmal1*. Para auxiliar estes mecanismos de controle, o gene *Rora* ativa a transcrição do gene *Bmal1*, enquanto o gene *Rev-Erba* inibe a transcrição do mesmo (Gallego e Virshup, 2007) (Figura 2).

As alças de retroalimentação positivas e negativas que regulam os processos de transcrição e tradução dos genes relógio mostram de maneira geral como estes genes interagem para controlar o ritmo circadiano de atividade/repouso. Experimentos com animais geneticamente modificados esclarecem um pouco mais o papel que cada gene relógio exerce neste sistema.

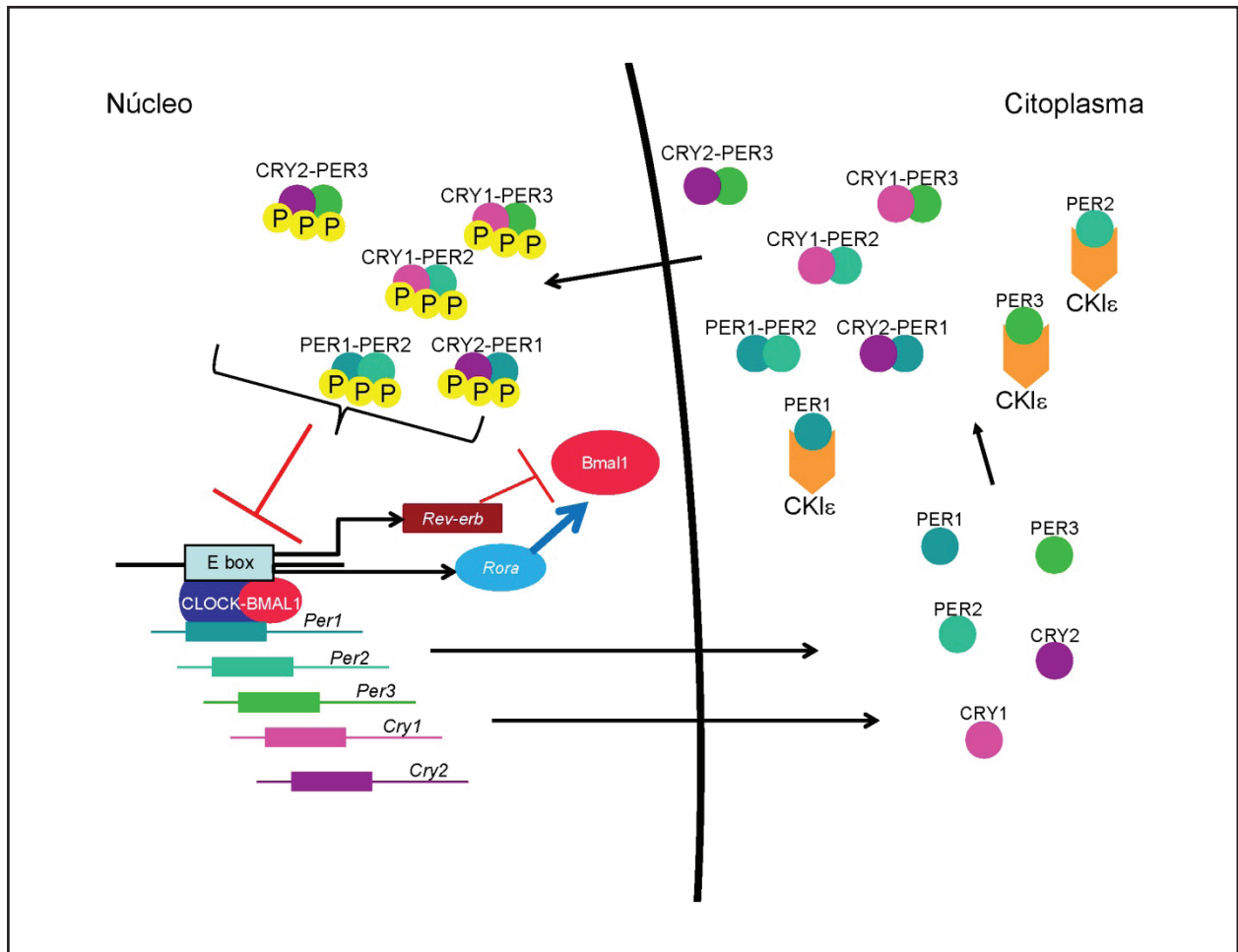


Figura 2: Representação do mecanismo molecular do sistema de temporização circadiano em uma célula. Os círculos em amarelo com um P no interior são os fosfatos adicionados durante a fosforilação pela CKIε. O símbolo ⊥ representa a inibição do heterodímero CLOCK-BMAL1 pelos dímeros formados pelas proteínas PERs e CRYs e a inibição do gene *Bmal1* pelo gene *Rev-erb* (figura retirada do artigo Pereira e col., 2009).

1.2. Animais Geneticamente Modificados

Já foram desenvolvidos inúmeros animais com os genes relógio modificados (Bunger e col., 2000; Zheng e col., 1999; Shearman e col., 2000B, Van Der Horst e col., 1999, Van Der Veen e Archer, 2010). Dependendo do gene, os animais respondem de maneira completamente diferente ao estímulo luminoso ou ao escuro.

Animais com o gene *Bmal1* não funcional (animais *knock-out* - KO para o gene *Bmal1*) tornaram-se totalmente arrítmicos em escuro constante e tiveram a atividade locomotora prejudicada em condições normais de luminosidade, não sendo capazes de responder a um pulso de luz (Bunger e col., 2000).

Em 1999, Zheng e col. analisaram camundongos mutantes com deleção de um domínio de heterodimerização altamente conservado no gene *Per2* (PAS Domain) e verificaram que animais homozigotos mutantes em livre-curso têm uma diminuição do período circadiano endógeno ($22,1 \pm 0,4$ h) quando comparados aos animais do tipo selvagem ($23,7 \pm 0,4$ h). A expressão de alguns genes relógio (*Per1*, *Per2*, *Per3* e *Clock*) também foi verificada nos NSQs do hipotálamo e a mutação no gene *Per2* reduziu a expressão rítmica dos genes *Per1* e *Per2*, sugerindo assim, que o gene *Per2* tenha capacidade de regular o gene *Per1* in vivo.

Experiências com camundongos KO *Per3* mostraram uma diminuição do período circadiano (30 minutos mais curto que os animais selvagens) em escuro constante (Shearman e col., 2000B). Em claro constante os animais KO *Per3* também tiveram uma diminuição do tamanho do período endógeno em relação aos animais selvagens (Van Der Veen e Archer, 2010). Com o aumento da intensidade luminosa esta diferença tornou-se ainda mais proeminente.

Em 1999, Van Der Horst e col. analisaram a atividade locomotora de camundongos KO para os genes *Cry1* e *Cry2*. Os resultados mostraram que camundongos do tipo selvagem têm um ritmo normal de $23,77 \pm 0,07$ h em escuro constante, já os mutantes para o gene *Cry1* apresentaram um período mais curto ($22,51 \pm 0,06$ h) e mutantes para o gene *Cry2* exibiram um pequeno aumento do período endógeno ($24,63 \pm 0,06$ h). Animais duplo KO tornaram-se arrítmicos em escuro constante.

Estes trabalhos com animais KO tentaram esclarecer um pouco melhor a função de cada gene no mecanismo de temporização, no entanto, alguns resultados ainda são

bastante controversos e dependendo da linhagem do animal a resposta é diferente ao estímulo dado.

Uma série de pesquisas realizadas em animais e humanos têm demonstrado que mutações nos genes relógio podem estar envolvidas com a suscetibilidade para distúrbios de ritmo e em humanos podem regular fenótipos circadianos (Archer e col., 2003; Carpen e col., 2006; Ebisawa e col., 2001; Katzenberg e col., 1998; Pedrazzoli e col., 2007; Pereira e col., 2005; Robilliard e col., 2002).

1.3. Genética Molecular e os Cronotipos

Os cronotipos são fenótipos circadianos que caracterizam os indivíduos de acordo com sua preferência diurna. Existem alguns questionários descritos na literatura que caracterizam os indivíduos de acordo com sua preferência diurna (Horne e Ostberg, 1976; Roenneberg e col., 2003). Dependendo da pontuação ou fase que os indivíduos se encontram ao responder os questionários, podemos classificá-los em: matutinos extremos, matutinos moderados, intermediários, vespertinos moderados e vespertinos extremos. Os chamados matutinos, preferem realizar suas atividades pela manhã e os vespertinos durante à tarde ou noite. A maior parte da população é considerada intermediária, ou seja, escolhe horários intermediários entre os dois extremos. Existem medidas fisiológicas cujas temporalidades de expressão estão associadas à matutividade ou vespertividade, como a secreção de melatonina e também a variação da temperatura corporal (Duffy e col., 1999; Gibertini e col., 1999; Liu e col., 2000).

Além da distribuição normal da população nesta faixa que vai dos extremos matutinos aos extremos vespertinos, existe também uma minoria da população que se encaixa numa faixa mais extrema do que a matutividade ou a vespertividade. Muitas vezes estes indivíduos têm certa dificuldade de sincronizar aos horários sociais comuns e ficam desalocados temporalmente da atividade social, existindo um conflito entre a

ordem temporal interna e externa (Menna-Barreto e Díez-Noguera, 2012). Nos casos em que os indivíduos não conseguem se adaptar e se queixam da dificuldade em se alocar temporalmente à sociedade, estes podem ser inseridos em uma pequena porcentagem da população com distúrbios de ritmo.

A Síndrome de Fase Atrasada do Sono (SFAS) é um distúrbio no qual o principal episódio de sono é atrasado, resultando em episódios de insônia no início do sono ou dificuldade de levantar no horário desejado. A Síndrome de Fase AVançada do Sono (SFAVS) é um distúrbio no qual o principal episódio de sono é avançado, resultando em sintomas de sonolência ao anoitecer, começo do sono antecipado e um levantar mais cedo do que o desejado. A síndrome do ciclo sono-vigília diferente de 24h consiste de um padrão constante crônico, com atrasos diários de uma a duas horas no início do sono e no horário de acordar (American Sleep Disorders Association, 1997).

Existem vários estudos na literatura correlacionando polimorfismos nos genes relógio com os cronotipos. O primeiro estudo foi publicado em 1998 (Katzenberg e col.) e mostrou uma associação de um polimorfismo localizado na região 3' do gene *CLOCK* (C3111T) com a vespertinidade. Indivíduos com o alelo C na posição 3111 do gene *CLOCK* tem um tendência maior a serem vespertinos.

Após este primeiro estudo, outros foram publicados na tentativa de replicar os dados publicados por Katzenberg e col. (1998), no entanto, os resultados mostram-se controversos. Em 2005, Mishima e col. estudaram o polimorfismo C3111T em uma amostra da população japonesa e os resultados encontrados foram os mesmos que Katzenberg e col., 1998. Por outro lado, em 2002, Robilliard e col. não encontraram a mesma associação em uma amostra da população inglesa e alguns dados obtidos em nosso laboratório também não mostram a associação do polimorfismo no gene *CLOCK* com a preferência diurna em uma amostra da população brasileira (Pedrazzoli e col., 2007).

Diversos estudos já foram publicados mostrando associações de outros polimorfismos ou mutações nos genes relógio com os cronotipos ou distúrbios de ritmo

(Carpen e col., 2005; Carpen e col., 2006; Iwase e col., 2002; Ebisawa e col., 2001; Archer e col., 2003; Pereira e col., 2005; Archer e col., 2010).

Estudos realizados em famílias demonstram que o adiantamento e o atraso de fase (deslocamento da fase de sono) podem ter um caráter hereditário. A identificação de famílias com distúrbios de ritmo é uma importante ferramenta na identificação de genes responsáveis pela regulação do ritmo circadiano do ciclo sono-vigília em humanos (Reid e col., 2001).

Na SFAS os pacientes apresentam o começo do sono e horário de levantar mais tardios que o normal e o momento do início do sono ocorre quase sempre no mesmo horário. Apresentam também pouca ou nenhuma dificuldade em manter o sono uma vez que este tenha começado, extrema dificuldade em levantar de manhã no horário desejado e uma incapacidade absoluta para avançar a fase do sono em relação à manutenção do momento de levantar e dormir habitual. O horário de início de secreção da melatonina é atrasado em relação ao normal, e ainda apresentam um atraso no horário em que a temperatura corporal atinge seu valor mínimo (Nadir da temperatura) no período de 24 horas do ciclo sono-vigília (American Sleep Disorders Association, 1997).

Em 2002, Iwase e col. realizaram um estudo em pacientes com SFAS e pacientes com síndrome do ciclo sono-vigília diferente de 24h (N-24), além de indivíduos controles. Neste estudo, os pesquisadores fizeram uma busca de polimorfismos e mutações no gene *CLOCK*. Três polimorfismos foram encontrados sendo que dois causavam alteração na sequência de aminoácidos na proteína *CLOCK* (R533Q e H542R). A frequência dos polimorfismos R533Q e H542R no grupo de pacientes com SFAS e N-24 não foi significativamente diferente da frequência do grupo controle. O polimorfismo T3111C também foi analisado, e os resultados mostraram que a frequência do alelo 3111C diminuiu, mas não significativamente em pacientes com SFAS. Em 2007, Wakatsuki e col. desenvolveram um camundongo mutante com a presença do polimorfismo T3111C do

gene *CLOCK* humano e verificaram que os animais homozigotos CC quando colocados em claro constante na fase de lactação tornam-se um modelo de animal com fase atrasada do sono. Este modelo de animal será importante em pesquisas futuras para entendermos melhor o mecanismo fisiopatológico da SFAS, bem como seu tratamento.

Toh e col. em 2001, analisaram uma família com SFAVS e observaram que existia uma mutação no éxon 17 do gene *PER2* (A2106G), que causa uma mudança de aminoácido Serina que é substituído por Glicina na posição 662 da proteína *PER2* codificada, exatamente no local de ligação da CK1 ϵ com esta proteína. Essa mutação foi associada com a SFAVS e tem como consequência causar uma hipofosforilação, da proteína *PER2*, adiantando assim a fase do sono. Em 2007, Xu e col. desenvolveram um camundongo *Knockin* com a mesma alteração encontrada nos humanos (S662G) e observaram o mesmo fenótipo de avanço de fase nos animais e conseqüentemente a diminuição do período endógeno, reforçando a associação desta mutação com a SFAVS.

Com o desenvolvimento científico na área de animais geneticamente modificados, podemos investigar de forma alternativa a função de um gene ou um polimorfismo ou mutação, e atualmente os pesquisadores tem seguido este caminho para estudo de mutações existentes somente em humanos.

O gene *PER3* possui um polimorfismo interessante para estudos científicos. Em humanos, existe um polimorfismo de repetição neste gene (VNTR, do inglês “*Variable Number of Tandem Repeats*”) que é caracterizado por uma sequência de 54pb que se repete quatro ou cinco vezes, dependendo do genótipo do indivíduo (Ebisawa e col., 2001; Archer e col., 2003). Este polimorfismo está localizado no éxon 18 do gene *PER3* em humanos e teoricamente, um indivíduo com 4 repetições possui 18 aminoácidos a menos na proteína do que um indivíduo com 5 repetições. A função deste gene ainda não foi totalmente desvendada, mas diversos estudos têm sido publicados investigando seu papel no sistema de temporização e na regulação circadiana de ritmos biológicos.

1.4. Polimorfismo de repetição do gene *PER3* em humanos e hipóteses relacionadas a sua função.

O primeiro estudo que identificou polimorfismos no gene *PER3* foi publicado em 2001 por Ebisawa e col. Foram analisados os 21 éxons do gene *PER3* e encontradas 20 variações neste gene em 4 haplótipos diferentes. Um desses haplótipos foi associado à suscetibilidade para SFAS nessa amostra da população japonesa, entretanto, não foi demonstrado qual dos 5 polimorfismos existentes neste haplótipo está associado a SFAS. O VNTR do gene *PER3*, descrito anteriormente, é um dos 5 polimorfismos do haplótipo associado com a SFAS.

Em 2003, Archer e col. analisaram especificamente o VNTR do gene *PER3*. As análises foram feitas em indivíduos matutinos, intermediários e vespertinos, além de pacientes com SFAS. A frequência para o alelo com 5 repetições é elevada em indivíduos matutinos quando comparada com o grupo de vespertinos e intermediários. No grupo de pacientes com SFAS, a frequência alélica de 4 repetições foi significativamente alta, mostrando haver uma forte ligação deste polimorfismo com a SFAS e também com a tendência a vespertinidade (Archer e col., 2003).

Em 2005, nosso grupo (Pereira e col.) replicou o trabalho realizado por Archer e col. (2003). Obtivemos os mesmos resultados em relação à preferência diurna, associando o alelo de 4 repetições com a vespertinidade. No entanto, ao analisarmos os pacientes com SFAS obtivemos um resultado interessante e totalmente diferente dos resultados publicados por Archer e col. (2003), na Inglaterra. Em contraste com Archer e col. (2003), que descreveram a associação do alelo de 4 repetições com a SFAS, nós encontramos uma associação do alelo de 5 repetições com essa síndrome.

Uma grande diferença entre os dois estudos é a posição geográfica onde foram feitos os estudos (Londres e São Paulo) e conseqüentemente a pista ambiental (o *zeitgeber*) para a sincronização do sistema de temporização circadiano. Os habitantes de

Londres vivem na latitude 51°30'N, cuja variação de temperatura ambiental e a duração do dia é muito grande, aproximadamente 8h durante o ano, com o dia mais curto no inverno durando 8h e o dia mais longo no verão 16h. Em São Paulo, a latitude é de 23°32'S, cuja variação das condições climáticas é muito menor do que em Londres. No verão o dia mais longo dura aproximadamente 13:30h e o mais curto no inverno dura 10:40h. Assim, sugerimos a partir de nossos resultados que a latitude (que traz embutida variações sazonais na duração da fotofase) seja levada em conta nas estratégias dos organismos para a sincronização ao ciclo claro/escuro ambiental.

Um estudo analisando padrões de expressão dos genes relógio no NSQ mostrou que a expressão de todos os genes relógio são afetados pela mudança da fotofase ao qual o animal é submetido (Tournier e col., 2003). Se considerarmos nossos dados em humanos (Pereira e col., 2005), tendo em vista os dados de alteração da expressão dos genes relógio dependentes do tamanho da fotofase em modelos animais, faria sentido supor que as diferenças de variação da fotofase ao longo do ano existentes entre Londres (Inglaterra) e São Paulo (Brasil), levariam o organismo a usar estratégias diferentes de sincronização que seriam dependentes destas latitudes. Desta forma, hipotetizamos que o gene *PER3* teria um papel neste processo.

Se este conjunto de dados estiver correto, é possível prever que uma pessoa com a SFAS que vive em latitudes altas de um dos hemisférios terá uma melhora de sua condição se mudar para uma região de baixa latitude, mais próxima da Linha do Equador. Interessantemente, Gottesmann (2000) publicou um relato de caso no qual mostra a melhora de um paciente com SFAS que morava em Paris (latitude: 48°52 N) e mudou-se para o Rio de Janeiro (latitude 22°54'S).

Os exatos mecanismos fisiopatológicos da SFAS ainda são desconhecidos. O gene *PER3* tem um papel no estabelecimento da SFAS, embora não se aponte com clareza qual é este papel.

Estudos utilizando modelos animais sob regimes de luz longos e curtos são necessários para investigar o papel do VNTR do gene *PER3* na regulação circadiana dependente da fotofase. No entanto, este VNTR do gene *PER3* parece ser uma alteração exclusiva de primatas (Jenkins e col., 2005).

Jenkins e col. (2005) analisaram um gorila (*Gorilla gorilla*), um gibão (*Hylobates lar*), um langur (*Presbytis entellus*) e um sagui (*Callitrix jacchus*) e encontraram 4 repetições no gorila e no gibão, 3 repetições no langur e 7 no sagui. Dados ainda não publicados de nosso laboratório mostram que existem 6 ou 7 repetições no sagui. Análises feitas em camundongos, ratos e nos cães mostraram que nestas espécies, embora o gene *Per3* seja muito conservado nos mamíferos, este VNTR não está presente, sendo que só se encontra uma cópia de 54pb (Jenkins e col., 2005). Dados não publicados de um trabalho em conjunto do nosso laboratório e o grupo de Simon Archer e Malcolm Von Schantz (Universidade de Surrey, Inglaterra) encontraram somente animais com 4 repetições em 40 chimpanzés analisados.

O VNTR do gene *PER3* parece ser exclusivo dos primatas, impossibilitando a utilização de roedores como um modelo animal para analisar a influência da luz no comportamento dos animais.

Como a latitude e as diferenças ambientais nela embutidas parecem influenciar diretamente a estratégia de sincronização dos organismos, desenvolvemos um projeto em colaboração com vários laboratórios no Brasil e na América do Sul, cujo objetivo foi analisar a correlação da latitude com o cronotipo. Neste projeto obtivemos 16 mil questionários de matutuidade – vespertinidade (HO, Horne e Ostberg, 1976) respondidos no território brasileiro (entre latitude 0° e 32°33'S e longitudes entre 34°50' e 57°05').

Em diferentes latitudes, além do comprimento do dia variar bastante ao longo do ano, o nível de insolação também varia bastante dependendo da região, por exemplo, na latitude 0° a variação da insolação é muito pequena ao longo do ano (de 388 a 439 Wm²), já na

latitude 32°S a variabilidade de insolação ao longo do ano é muito maior (de 200 Wm² em junho a 500 Wm² em Dezembro). Os resultados deste estudo mostram uma clara tendência à vespertinidade em direção as latitudes mais altas ou níveis de insolação menores, ou seja, indivíduos que vivem no Rio Grande do Sul tem tendência a serem mais vespertinos do que indivíduos que vivem no Rio Grande do Norte (dados não publicados).

Até agora, os dois resultados descritos anteriormente (as associações de diferentes alelos do polimorfismo de repetição do gene *PER3* com a SFAS dependendo da região estudada e a tendência à expressão de diferentes fenótipos circadianos ou cronotipos dependendo da latitude) nos levam a crer que existe uma possível relação entre estes dois fenômenos e, portanto, o gene *PER3* e provavelmente o polimorfismo de repetição devem ter pelo menos em parte, um papel importante neste efeito. No entanto, o exato mecanismo pelo qual este efeito se processa ainda deve ser esclarecido.

Com o intuito de esclarecer melhor o papel do gene *PER3* e do polimorfismo de repetição no mecanismo de sincronização pela luz, a proposta deste trabalho foi estudar o efeito de resposta ao ciclo claro/escuro (CE) em animais KO para o gene *Per3* e verificar o papel deste polimorfismo no processo de sincronização aos diferentes desafios temporais impostos pelo meio ambiente em diferentes latitudes do Brasil.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Investigar possíveis associações entre o gene *Per3* e a regulação da ritmicidade circadiana dependente da duração da fotofase em humanos e camundongos.

2.2. Objetivos Específicos

1. Analisar a resposta comportamental de atividade/repouso de camundongos *knockout Per3* (*Per3*^{-/-}) submetidos à diferentes regimes do ciclo claro/escuro (CE).
2. Analisar o ciclo de atividade/repouso e a temperatura periférica no inverno (Agosto) e no verão (Novembro), em Natal (Rio Grande do Norte, RN, latitude 05°47'S) e em São Paulo (São Paulo, SP, latitude 23°32'S), em indivíduos selecionados pelo genótipo do gene *PER3* (homozigotos de 4 e 5 repetições).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi realizado em duas fases: na primeira fase utilizamos camundongos geneticamente modificados *Per3^{-/-}* como modelo experimental e avaliamos os possíveis mecanismos pelos quais o gene poderia estar envolvido na adaptação à duração da fotofase. Baseado nos resultados obtidos e nas inferências feitas a partir destes resultados, desenhamos na segunda fase do estudo, um experimento em humanos com o intuito de verificar se as inferências feitas a partir do modelo animal eram de alguma forma aplicáveis. A seguir serão descritos os métodos separadamente para cada uma das fases do estudo.

3.1. Primeira fase experimental: Análise do ritmo circadiano da atividade locomotora em animais selvagens e *Per3^{-/-}* submetidos a diferentes fotofases.

3.1.1. Animais

Foram utilizados 6 animais selvagens e 6 animais *Per3^{-/-}* ambos da linhagem C57Bl6, todos machos, com 3 meses de idade. Os animais ficaram alocados em gaiolas individuais localizadas dentro de um armário isolado de som e luz externa. O registro de atividade foi feito a cada minuto por meio de roda de atividade (ClockLab, Actimetrics, Wilmette, EUA). Durante todo o experimento os animais receberam água e comida (*Transgenic mouse diet, B & K Universal Ltd, Hull, Inglaterra*) *ad libitum*. A intensidade de luz utilizada na fase clara foi cerca de 230 lux. A temperatura da sala variou de 19 a 22 °C e a umidade relativa do ar foi 55% ± 10%.

Este experimento foi desenvolvido na Universidade de Surrey, na Inglaterra, em colaboração com o Prof. Dr. Simon N. Archer e aprovado pelo comitê de ética animal da University of Surrey e pelo comitê de ética da Universidade Federal de São Paulo (CEP n° 1202/07, anexo 1).

Os animais *Per3^{-/-}* foram gerados na Vanderbilt University, Nashville, TN, EUA, como descrito por Van Der Veen e Archer, 2010.

3.1.2. Regime claro/escuro utilizado no estudo

Os animais foram expostos a uma sequência de diferentes ciclos claro/escuro e também a blocos de dias em escuro constante ao longo de 73 dias consecutivos como segue; 12C/12E, 8C/16E, EE, 12C/12E, 16C/8E, EE. O número de dias que os animais passaram em cada regime CE não foi simétrico ao longo da série por razões circunstanciais do experimento, mas de forma geral permaneceram por entre duas a três semanas sob os regimes CE e entre 4 a 8 dias em escuro constante como pode ser observado na figura 3.

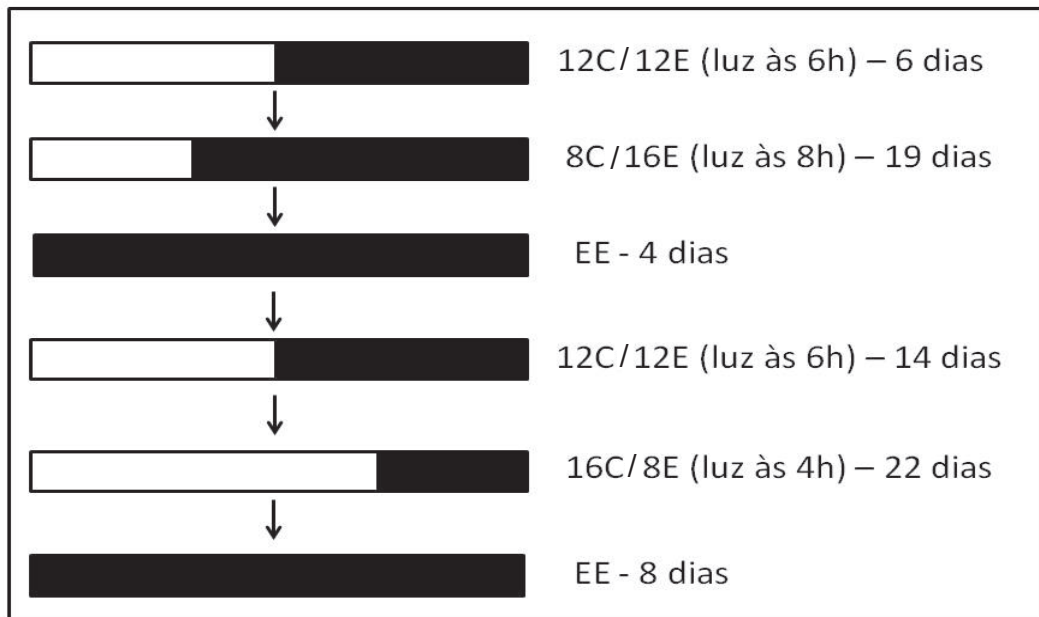


Figura 3: Descrição dos ciclos claro/escuro aos quais os animais ficaram expostos durante o experimento.

3.1.3. Análises dos parâmetros circadianos

Utilizamos o programa *El Temps* (programa desenvolvido por Antoni Díez Noguera, 1999, Espanha) para analisar os actogramas, periodogramas e início da atividade locomotora dos animais. O início da atividade dos animais foi também analisado baseado

em fórmulas criadas no Excel. Para tal, foi feita uma média móvel de 24h e uma média móvel de 2h para cada animal. Os dados foram analisados a cada minuto.

Nas análises no Excel, a fase de atividade foi determinada no momento no qual a média móvel de 2h era maior que a média móvel de 24h e a fase de repouso quando a média móvel de 2h era menor que a média móvel de 24h. Os detalhes sobre as regras criadas para determinar o exato momento do início da atividade encontram-se no anexo 2.

Comparando os resultados obtidos baseados nas fórmulas feitas no Excel, na análise serial feita no *El Temps* e nos actogramas, calculamos o início da atividade.

Não foi possível calcular o final da atividade pois esta fase é muito fragmentada, tornando muito difícil a determinação do exato momento no qual o animal entrava em repouso.

- Ângulo de fase de sincronização ao ciclo CE

O ângulo de fase entre o início do escuro e o começo da atividade foi calculado diariamente, em todas as fotofases analisadas. Foi feita uma média por animal e por fotofase para compararmos os dois grupos (animais selvagens – controle e *Per3^{-/-}*). Utilizamos o teste *t* de Student para comparar os ângulos de fase de sincronização ao CE do grupo controle e do grupo *Per3^{-/-}* em cada regime de CE. Foram excluídos destas análises os transientes entre os diferentes regimes de CE e os dias que as rodas de atividade travaram (dados em branco nos actogramas, vide resultados). O número de dias em transientes foi calculado por meio da visualização dos actogramas para cada animal.

Ângulos de fase de sincronização à luz com valores positivos significam que os animais começaram a atividade antes do início do escuro e os valores negativos significam que os animais começaram a atividade depois do início do escuro.

- Total de atividade nas fases de claro e escuro

Baseados no tamanho do raio da roda de atividade, calculamos quanto os animais andaram em centímetros tanto nas fases claras como nas fases escuras. Foram feitas as médias da quantidade de atividade nas fases clara e escura por animal e em cada regime de CE analisado (12C/12E 1, 8C/16E, EE1, 12C/12E 2, 16C/8E, EE2). Foram excluídos destas análises os transientes, assim como dados em branco nos actogramas por travamento da roda de atividade.

3.1.4. Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram feitas no programa STATISTICA (StatSoft Inc., 1984-2007, USA). O nível de significância adotado foi $p < 0,05$. Baseado nos resultados do teste de normalidade de Kolmogorov-Sminorv, utilizamos o teste *t* de student (quando $p > 0,05$ para o teste de normalidade) ou o teste Mann-Whitney (quando $p < 0,05$ para o teste de normalidade) para fazer as comparações entre os grupos de animais selvagens e *Per3*^{-/-}.

3.2. Segunda fase experimental: Organização temporal dos indivíduos em função da latitude e do genótipo *PER3*.

Este experimento foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da Universidade Federal de São Paulo (CEP n°0565/10, anexo 3).

A segunda fase experimental foi dividida em duas fases: na primeira, foram selecionados indivíduos na cidade de São Paulo e em Natal (latitudes: 23°32'S e 05°47'S, respectivamente). Estes sujeitos responderam diversos questionários, que serão descritos a seguir, e coletaram células da mucosa oral por meio de swab estéril para genotipagem do VNTR do gene *PER3*. Na segunda fase, foram selecionados somente

alguns indivíduos em São Paulo e Natal para utilizarem o tempatilumi (actímetro que registra atividade/reposo, temperatura do punho e intensidade luminosa, desenvolvido pelo Grupo Multidisciplinar de Desenvolvimento e Ritmos Biológicos, GMDRB da Universidade de São Paulo, USP, Brasil) em duas épocas do ano (agosto e novembro).

3.2.1. Sujeitos

Primeiramente, foram selecionados 198 estudantes universitários da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN) em Natal e 237 estudantes em 3 universidades diferentes na cidade de São Paulo (Universidade de São Paulo, Universidade Federal de São Paulo e Faculdade Oswaldo Cruz).

3.2.2. Primeira Fase – Caracterização populacional: fenotipagem, genotipagem e caracterização demográfica

Na primeira fase deste experimento, os estudantes: responderam o questionário de matutividade-vespertinidade (HO) descrito por Horne e Ostberg, em 1976 e adaptado para a língua portuguesa por Benedito-Silva e col. em 1990 (anexo 4, este questionário também está disponível no site www.crono.icb.usp.br/cronotipo); o questionário de Cronotipos de Munique (MCTQ), criado por Roenneberg e col., 2003 e adaptado para a língua portuguesa pelo mesmo grupo (anexo 5); assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (anexo 6); responderam o questionário de hábitos de sono criado por nós, que foi importante para conhecermos melhor os indivíduos e seus hábitos de sono (anexo 7); e foram feitas também coletas de tecido da mucosa oral por meio de *swab* estéril para extração de DNA e genotipagem do polimorfismo de repetição do gene *PER3* (homozigotos de 4 repetições - *PER3*^{4/4}, heterozigotos - *PER3*^{4/5} e homozigotos de 5 repetições - *PER3*^{5/5}). Os *swabs* foram congelados (-20°C) logo após a coleta e mantidos nesta temperatura até o momento da extração do DNA.

Para extração de DNA utilizamos o protocolo descrito no anexo 8. A genotipagem do polimorfismo de repetição do gene *PER3* foi realizada como descrito por Archer e col., 2003.

3.2.3. Segunda Fase – Caracterização sub-amostrai e análise dos dados

Após a realização de todas as genotipagens e análise dos questionários selecionamos 14 indivíduos em Natal e 15 indivíduos em São Paulo para participarem da segunda fase do estudo. Nesta fase, os indivíduos utilizaram o tempatilumi em duas épocas do ano: agosto e novembro e responderam o diário de sono. Os dados dos tempatilumis foram coletados a cada minuto por 21 dias em cada fase (agosto e novembro). Os critérios de inclusão e exclusão para escolha dos indivíduos que participaram da segunda fase do estudo foram:

1) Critérios de inclusão:

- Homozigoto 4 ou 5 repetições para o polimorfismo de repetição do gene *PER3*.
- Idade 18-30 anos.

2) Critérios de exclusão:

- Uso de medicamentos ou drogas que interfiram na qualidade do sono do indivíduo.
- Trabalho em turno nos últimos 3 anos.
- Viagens transmeridionais no último mês.
- Sono muito irregular durante os 5 dias da semana, sem considerar os finais de semana (variação de mais de 2h no horário de dormir e acordar de um dia para outro).
- Apresente qualquer queixa de sono (verificado por meio de questionário, anexo 7).
- Cronotipo extremo (extremos matutinos e vespertinos).
- Morar no mesmo local menos de 6 meses.