



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS-BACHARELADO**



AVALIAÇÃO CRONOBiolÓGICA, ATRAVÉS DA ANÁLISE DA PREFERÊNCIA DIURNA E DA DISTRIBUIÇÃO DO VNTR DO GENE *PER3*, EM UMA AMOSTRA DE ESTUDANTES DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

BETÂNIA RODRIGUES DOS SANTOS

Monografia de conclusão de curso



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Campus Universitário s/nº

Caixa Postal: 354 CEP: 96010-900

Pelotas – RS – Brasil

betaniabio@yahoo.com.br

2008

Betânia Rodrigues dos Santos

**AVALIAÇÃO CRONBIOLÓGICA, ATRAVÉS DA ANÁLISE DA PREFERÊNCIA
DIURNA E DA DISTRIBUIÇÃO DO VNTR DO GENE *PER3*, EM UMA AMOSTRA
DE ESTUDANTES DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**

Trabalho apresentado ao
Colegiado do Curso de
Bacharelado em
Ciências Biológicas
como requisito parcial
para a obtenção do
Título de Bacharel em
Ciências Biológicas.

Orientadora: Dr^a. Isabel Oliveira de Oliveira

Pelotas, 2008

Banca examinadora:

Mestre Marilene Farias Alam - Universidade Federal de Pelotas

Doutor Heden Luiz Marques Moreira - Universidade Federal de Pelotas

Doutora Isabel Oliveira de Oliveira - Universidade Federal de Pelotas

AGRADECIMENTOS

À minha família pelo carinho, amor, apoio e incentivo que nunca faltaram em toda esta jornada.

À minha mãe, Patrícia Terra Rodrigues, por vivenciar meus momentos de dificuldade me auxiliando sempre que possível.

Ao meu pai, Antônio Carlos dos Santos, que mesmo distante sempre me apoiou e torceu pelo meu sucesso.

Ao meu irmão, Isaac Rodrigues dos Santos, pelos conselhos e exemplo de dedicação profissional.

Às minhas irmãs, Camila Catarino, Julia Santos e Laura Santos por estarem, de alguma forma, sempre por perto.

Aos meus avôs Isaac e Carmem pelo apoio incondicional que me proporcionaram durante toda minha jornada estudantil, além do afeto e da confiança que me foram primordiais nessa etapa.

Ao Rodrigo pelo amor, pelo apoio, pelo incentivo, por estar sempre ao meu lado, pela paciência, pelo carinho e pelas revisões de leitura em todos os meus trabalhos que foram indispensáveis neste momento.

À orientadora Isabel Oliveira de Oliveira, um muitíssimo obrigado, não só pela orientação, ensinamentos, mas também pela confiança e apoio, que foram imprescindíveis para minha formação profissional nestes anos de convívio.

À professora Ana Paula Nunes pelo acompanhamento e ensinamentos que me concedeu durante o início das minhas atividades no laboratório de Fisiologia Molecular, e pelo vínculo de amizade que criamos durante esse período.

À professora Marilene Farias Alam pelas oportunidades que me foram proporcionadas durante minha jornada acadêmica. Além da confiança e apoio que me concedeu nesse período.

Ao professor Mário Pedrazzoli, e a UNIFESP, por apoiar minha inclusão no projeto de pesquisa PROSUL, proporcionando amparo financeiro para a execução das atividades de bancada deste trabalho de conclusão de curso.

Aos professores e funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia que me acolheram e sempre atenderam as minhas necessidades da melhor maneira possível.

À colega de laboratório Fabiana Fonseca dos Santos, pelo auxílio durante as coletas e processamento do material biológico.

À amiga e colega de laboratório, Cristini Milech pela amizade, companheirismo, confiança e apoio concedidos nesse período de convivência.

Às amigas Alinca da Fonseca, Liziane da Silva e Marília Mesemburg um muito obrigado especial, pela amizade, momentos de descontração, paciência com minhas manias de perfeição, conselhos, companheirismo e pelas palavras de apoio e conforto durante os momentos mais desgastantes.

Às amigas que estiveram distante durante esses cinco anos Anelize Milano, Basma Salem e Vanessa Pinto pela amizade que nos une.

Às colegas de laboratório, Claudete Mistura e Patrícia Tassinari pelas conversas e apoio durante estes anos de convívio;

A todos os colegas do curso de Ciências Biológicas da UFPel pela amizade e que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Resumo

Estudos genéticos sobre os ritmos circadianos têm demonstrado que eles podem ser regulados de forma intracelular por vários genes relógio. Acredita-se que variações em um ou mais desses genes podem modular as tendências individuais para a matutividade ou vespertividade. O gene *Per3* é um dos principais genes reguladores da ritmicidade biológica sendo expresso no Núcleo Supraquiasmático do Hipotálamo. Em humanos, ele está localizado no cromossomo 1 e possui 23 éxons. No seu éxon 18 foi detectada a presença de um polimorfismo de repetição de 54pb associado à regulação circadiana. **Objetivo:** O objetivo do trabalho foi realizar uma avaliação cronobiológica, através da análise da preferência diurna e da distribuição do VNTR do gene *Per3* em uma amostra de estudantes da Universidade Federal de Pelotas (UFPel). **Métodos:** 122 voluntários responderam ao questionário Horne & Östberg (HO) e dos quais foi coletada saliva para a extração do DNA a partir de células bucais. A genotipagem foi feita pela técnica de PCR gerando fragmentos de 635pb e/ou 689pb. A presença de 2 alelos de 4 repetições de 54pb representa um indivíduo homocigoto com tendência para a vespertividade (4/4); 2 alelos com 5 repetições de 54pb, um homocigoto com tendência para a matutividade (5/5); e 1 alelo com 4 e outro com 5 repetições de 54pb representam um heterocigoto com tendência intermediária (4/5). **Resultados:** Na análise do HO, foi observada uma pontuação média de 43,83 \pm 10,78 caracterizando uma amostra de cronotipo intermediário. Na distribuição das frequências pelo HO, 45,90% dos indivíduos foram classificados como tipos intermediários; 44,26% como vespertinos e 9,84% como matutinos. Foi observada uma diferença na preferência diurna entre mulheres e homens ($p=0,01$). A frequência alélica na amostra estudada foi de 0,67 para o alelo de 4 repetições e de 0,33 para o alelo de 5 repetições. A frequência dos genótipos observada foi de 43,0% para o 4/4, 9,0% para o 5/5 e de 48,0% para o 4/5. Não foi demonstrada uma concordância significativa entre o HO e a genotipagem. Da mesma forma não foi observada uma diferença significativa na distribuição das frequências alélicas entre os diferentes grupos de preferência diurna ($p=0,67$). **Conclusão:** Na amostra estudada foi constatada uma baixa ocorrência da preferência diurna pela matutividade. Além disso, verificou-se que as mulheres apresentam uma maior tendência para essa característica que os homens. Sugere-se uma ampliação do tamanho amostral para confirmação dos dados obtidos, assim como a análise de outros polimorfismos de genes que participam da regulação da ritmicidade biológica.

Palavras chave: *Per3*, Ritmos circadianos, Polimorfismos, Preferência diurna

Lista de Figuras

Figura 1 – Eletroforese em gel de agarose 2,0%, mostrando o padrão das bandas para genotipagem do Polimorfismo de Repetição em Tandem do gene <i>Per3</i>	23
Figura 2 – Pontuação média do HO.....	26
Figura 3 – Distribuição dos cronotipos	26
Figura 4 - Frequências alélicas observadas para o Polimorfismo de Repetição em Tandem do gene <i>Per3</i>	27
Figura 5 – Distribuição dos genótipos do Polimorfismo de Repetição em Tandem do gene <i>Per3</i>	27
Figura 6 - Número de indivíduos vespertinos, intermediários ou matutinos classificados pelo HO e pela genotipagem do Polimorfismo de Repetição em Tandem do gene <i>Per3</i>	28
Figura 7 – Distribuição dos genótipos do Polimorfismo de Repetição em Tandem do gene <i>Per3</i> dentro de cada grupo de cronotipos.....	28
Figura 8 - Frequências alélicas observadas para o Polimorfismo de Repetição em Tandem do gene <i>Per3</i> dentro de cada grupo de cronotipos.....	29

Lista de Anexos

Anexo 1 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido44

Anexo 2 - Questionário para identificação de indivíduos matutinos e vespertinos....48

Sumário

AGRADECIMENTOS.....	3
RESUMO.....	5
LISTA DE FIGURAS.....	6
LISTA DE ANEXOS.....	7
SUMÁRIO.....	8
1 – INTRODUÇÃO.....	9
2 – JUSTIFICATIVA E OBJETIVO.....	20
3 – METODOLOGIA.....	21
4 – RESULTADOS.....	24
5 – DISCUSSÃO.....	30
6 – CONCLUSÃO.....	34
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35
8 – ANEXOS	43

1. INTRODUÇÃO

A Cronobiologia

O estudo da Cronobiologia surgiu através de investigações de padrões regulares da ritmicidade biológica e da interação desta com a ritmicidade ambiental. Em 1729, Jean Jacques d'Ortous Mairan mostrou que o ritmo diário de abertura e fechamento de folhas em plantas era mantido mesmo no escuro constante. No entanto, apenas no séc. XXI começaram a ser descobertos elementos essenciais para o entendimento dos ritmos circadianos em mamíferos.

A Cronobiologia inclui o estudo dos ritmos biológicos caracterizados pela recorrência, a intervalos regulares, de eventos bioquímicos, fisiológicos e comportamentais (ASCHOFF, 1965). Ela traz uma das mais importantes contribuições relativas ao tempo: a noção de variabilidade das funções biológicas ao longo das 24 horas do dia, mostrando que as pessoas tendem a responder diferentemente à mesma situação conforme o momento do dia em que ela ocorra. Logo, a ritmicidade circadiana é resultante da atuação de fatores endógenos (relógio biológico) e de fatores ambientais (relógio solar e relógio social), (GASPAR *et al.*, 1998).

A população humana pode ser classificada em três cronotipos básicos: os matutinos, os vespertinos e os intermediários, de acordo com as diferenças individuais na preferência pelos horários de vigília e de sono avaliadas pelo questionário de Horne & Östberg (HO). As pontuações possíveis vão desde 16 (vespertino extremo) até 86 (matutino extremo) passando por pontuações intermediárias que definem os indivíduos intermediários. O HO foi elaborado através da utilização de medidas de temperatura oral de voluntários matutinos, vespertinos e intermediários, onde se encontrou uma estreita correspondência entre o horário do pico de temperatura e as respostas encontradas no questionário (HORNE & ÖSTBERG, 1976). O HO é um instrumento internacionalmente validado, sendo

amplamente utilizado por pesquisadores para a identificação dos cronotipos do espectro matutino/vespertino, já que mostra uma metodologia fiel aos resultados obtidos (CEOLIM & MENNA-BARRETO, 2000).

Os indivíduos matutinos apresentam preferência por acordar nas primeiras horas da manhã, e encontram dificuldades em se manter acordados além do seu horário habitual de dormir. Os indivíduos vespertinos preferem as horas tardias de ir para cama e acordar, apresentando menor tempo de sono durante a semana (devido ao relógio social) e maior tempo de sono durante os fins de semana (quando compensam o sono semanal perdido). Por isso, o ciclo vigília/sono de vespertinos é mais irregular e tem baixa eficiência. Além disso, vespertinos utilizam mais cochilos durante o dia, compatível com a privação de sono, e apresentam maiores problemas com a atenção e maiores indisposições emocionais.

O Sono

O sono é definido como um estado de inconsciência do qual a pessoa pode ser despertada por estímulos sensoriais ou outros estímulos. O período de sono, apresenta múltiplos estágios, passando de um sono leve até um sono mais profundo, podendo ser dividido em sono de ondas lentas e sono de movimentos rápidos (REM). O primeiro se caracteriza pela ocorrência de ondas cerebrais muito grandes, porém lentas e é tido como a fase de sono profundo. O segundo se caracteriza pela movimentação rápida dos olhos e acentuada atividade cerebral, também é conhecida como a fase dos sonhos (GUYTON & HALL, 2006).

Acredita-se que o sono possa ser causado por um processo inibitório ativo, num mecanismo onde o córtex nunca dorme (como era anteriormente acreditado). Ao que parece, existe um centro de controle que atua inibindo as outras partes do cérebro e com isso causando o estado de sonolência (GUYTON & HALL, 2006).

Algumas substâncias neuro-humorais também são relacionadas ao sono. Em experimentos animais que bloqueiam a formação de serotonina, percebe-se que os animais freqüentemente ficam dias sem dormir, mostrando que esse hormônio é uma substância importante associada à produção de sono. Contudo, a concentração sanguínea de serotonina é menor durante o sono do que durante a vigília. Devido a

isso, hoje se especula outra substância promotora do sono que atue de maneira individual ou juntamente com a serotonina (GUYTON & HALL, 2006).

A privação do sono causa muitas alterações no sistema fisiológico, em especial, às funções do sistema nervoso central (DAVIES *et al.*, 2002; GUYTON & HALL, 2006). A vigília prolongada é freqüentemente associada ao mau funcionamento dos processos mentais e pode causar atividades comportamentais anormais, como psicose (GUYTON & HALL, 2006).

O valor funcional do sono é restaurar o balanço natural entre os centros neuronais, já que num período prolongado de vigília o uso excessivo de algumas áreas cerebrais poderiam facilmente perturbar seu balanço em relação ao restante do sistema nervoso (GUYTON & HALL, 2006).

Sono e sistemas de temporização

Praticamente todas as formas de vida contam com sistemas de temporização ou osciladores, que melhoram suas chances de sobrevivência em um planeta marcado por ciclos de dia e noite e por estações do ano. Para os vegetais, a presença ou ausência de sol representa fornecimento de energia ou necessidade de poupar energia. Para os animais, representa adaptação a um horário em que se exponham menos a predadores e tenham mais chance de obter alimento. Essas adaptações temporais identificam, por exemplo, espécies diurnas ou noturnas (MARTINEZ *et al.*, 2008). Além dos ciclos diários, existem adaptações às estações do ano, que são essenciais à sobrevivência.

A espécie humana é diurna, adaptada para exercer suas atividades na fase clara do ciclo claro/escuro e repousar na fase escura. Essa característica se deve ao desenvolvimento de nosso sistema visual e à nossa dependência da informação luminosa (HOFMAN, 2004).

A repetição regular dos episódios de sono noturno caracteriza o que chamamos de ciclo sono-vigília. Além do sono, todas as funções do sistema nervoso apresentam oscilações. Consideram-se, de forma equivocada, os diversos componentes do desempenho humano como fenômenos estáveis. Evidências derivadas de estudos de laboratório, em condições controladas e por manipulações

do ciclo sono-vigília, demonstram ser o desempenho fortemente afetado por fenômenos cíclicos (AKERSTEDT, 2007).

Apesar da relativa flexibilidade dos horários de dormir e acordar, o ser humano tende a manter os períodos de sono-vigília com durações em torno de 24h por ciclo. Desvios dessa regularidade ocorrem, usualmente, nos finais de semana, férias e mudanças de fuso horário. No entanto, há alterações desse ciclo que ultrapassam os limites da normalidade.

Perturbações envolvendo o sono e os processos que o controlam possuem interesse clínico, como a síndrome da fase atrasada do sono, a síndrome da fase avançada do sono, o padrão irregular, o ciclo sono-vigília diferente de 24h, o ciclo secundário à mudança rápida do fuso horário, o ciclo secundário ao trabalho em horário irregular, o ciclo secundário a doenças, o ciclo secundário a uso de drogas ou medicamentos (MARTINEZ *et al.*, 2008). Além desses, ocorrem transtornos cronobiológicos secundários a diversos fatores, tais como: envelhecimento (HOFMAN, 2000), estresse (GRANDIN *et al.*, 2006), cronotipo (matutino ou vespertino) e morbidez (TAILLARD *et al.*, 2001) e doenças orgânicas (COPINSCHI *et al.*, 2000).

O relógio biológico

A principal característica do relógio biológico é o fato de se tratar de um mecanismo endógeno. O ser vivo isolado, sem a indicação da passagem do tempo, continua a expressar suas atividades biológicas como, por exemplo, sono-vigília; atividade/repouso e ciclos hormonais por semanas e até mesmo anos (CZEISLER & KLERMAN, 1999).

Com o avanço da Cronobiologia ficou demonstrado que os seres vivos possuem genes determinantes para o funcionamento de diversas estruturas, desde o nível celular até o nível do organismo como um todo, promovendo uma organização temporal das atividades fisiológicas, funcionando como verdadeiros relógios biológicos, osciladores endógenos ou marcapassos (CIPOLLA-NETO & CAMPA, 1991).

Em mamíferos, os marcapassos geradores da ritmicidade circadiana, ou seja, os relógios biológicos circadianos localizam-se nos núcleos supraquiasmáticos

(NSQ) do hipotálamo, ou seja, dois pequenos aglomerados de neurônios no hipotálamo, acima do quiasma óptico (HASTINGS & HERZOG, 2004).

Os neurônios do NSQ ciclam mesmo quando todas as conexões neurais são eliminadas ou quando os núcleos são mantidos em cultura, (REPPERT & WEAVER, 2002). A confirmação do papel de marcapasso central exercido pelo NSQ veio através de experimentos que envolviam a lesão completa desses núcleos em hamsters adultos, seguida de transplante de núcleos íntegros provenientes de fetos. Este procedimento restaurava a ritmicidade circadiana que havia sido perdida com a lesão (WEAVER, 1998).

A maquinaria oscilatória do relógio está contida dentro de todas as células (REPPERT & WEAVER, 2002). O modelo mais aceito para a maquinaria molecular que gera o ritmo circadiano envolve genes e seus produtos de expressão (REPPERT & WEAVER, 2001). Os genes do relógio são expressos de forma rítmica no NSQ e são encontrados em vários outros locais do sistema nervoso central e mesmo em células somáticas (REPPERT & WEAVER, 2002).

A base de funcionamento do relógio biológico é a interação entre alças de retroalimentação, que fazem com que determinadas proteínas e fatores de transcrição sejam expressos e transcritos com diferença de 12 horas. Em outras palavras, a proteína sintetizada a partir de um gene é capaz de inibir a ativação do mesmo gene e ativar a transcrição do gene que se expressa com alternância de fase. Este ciclo se repete indefinidamente (REPPERT & WEAVER, 2002).

Os heterodímeros CLOCK-BMAL1 ativam a transcrição de genes chamados *Period* (*Per1*, *Per2* e *Per3*) e *Cryptochrome* (*Cry1* e *Cry2*) (DOI *et al.*, 2006). Os RNAs mensageiros (mRNAs) de *Per* e *Cry* atingem seu pico durante a fase clara do dia e o declínio nas suas concentrações ocorre porque as proteínas transcritas, particularmente a CRY, interagem diretamente com os genes *Clock* e *Bmal1*, inibindo a sua transcrição (KONDRATOV *et al.*, 2006; DARDENTE *et al.*, 2007).

Outra alça envolve a regulação da transcrição de *Bmal1*, cujo pico de RNAm ocorre em torno de 12 h após os picos de mRNAs dos genes *Per* e *Cry*. O heterodímero CLOCK-BMAL1, ao mesmo tempo em que ativa os genes *Per* e *Cry*, também inibe a produção do RNAm responsável pela síntese de BMAL1 (MARKUS *et al.*, 2003).

Como resultado final deste ritmo gênico, temos uma resposta neural que conecta os núcleos supraquiasmáticos através de uma via polissináptica à medula e,

posteriormente, a uma saída autonômica simpática (SIMONNEAUX & RIBELAYGA, 2003). E uma resposta humoral, através da estimulação da glândula pineal, com conseqüente síntese de melatonina (MORTANI BARBOSA *et al.*, 2000) que repassa a todo o organismo as variações rítmicas do relógio central (NSQ) (MARKUS *et al.*, 2003).

A Regulação do Relógio Biológico

O ajuste entre o meio ambiente e o relógio biológico é feito por via neural. No caso dos mamíferos, incluindo o homem, a principal oscilação ambiental percebida pelo relógio biológico é a alternância claro-escuro.

Existe uma via retino-hipotalâmica que informa aos NSQ a alternância claro-escuro (ROLLAG *et al.*, 2003). A fotorrecepção é feita através de células especializadas da retina, conhecidas como cones e bastonetes, que são capazes de traduzir a onda luminosa em um sinal químico e com isso iniciar alterações elétricas no nervo óptico, que são levadas até o NSQ (MARKUS *et al.*, 2003). A excitação do NSQ, pelas alterações elétricas iniciadas no quiasma óptico, serve como estímulo para as proteínas e fatores de transcrição do relógio biológico.

A melatonina é secretada pela glândula pineal, obedecendo a estímulo do NSQ na ausência de luz, traduzindo a informação fótica em estímulo químico a todas as células. A exposição à luz interage com o NSQ e pode alterar os ciclos do relógio. Luz intensa no final da tarde atrasa o relógio, luz intensa no início da manhã adianta o relógio biológico (HOROWITZ *et al.*, 2001).

Portanto, além de enviar informações luminosas para o córtex cerebral e formar a visão, a retina envia informações para o relógio biológico, promovendo seu ajuste.

Recentemente foi demonstrado que além de cones e bastonetes, existem fotorreceptores em células ganglionares. Estas células contêm moléculas de melanopsina, que fazem parte da superfamília de receptores acoplados a proteínas G e que estão presentes em células que se projetam diretamente para os núcleos supraquiasmáticos (ROLLAG *et al.*, 2003).

É importante ressaltar que o sistema de recepção de luz é um processo que só se perde totalmente com a enucleação do globo ocular. Muitos sujeitos que são

cegos totais, sem nenhuma percepção luminosa consciente, são capazes de ajustar o relógio biológico ao ciclo claro-escuro ambiental. Isso demonstra que a via retino-hipotalâmica opera de forma independente da visão (MARKUS *et al.*, 2003).

Os genes relógio

Os componentes centrais do relógio são definidos pelos genes, onde seus produtos protéicos são necessários para a geração e regulação dos ritmos circadianos nas células individuais e de todo o organismo (TAKAHASHI, 2004).

Em mamíferos os genes mais relevantes para o mecanismo do relógio biológico, como *Per 1/2/3*, *Clock*, *Cry 1/2*, *Bmal1* e *Casein Kinase I epsilon (CK I ?)*, são expressos no NSQ do Hipotálamo (DUNLAP, 1999; LOWREY *et al.*, 2000), e como qualquer sistema biológico, os osciladores responsáveis pela regularidade do ciclo sono-vigília são sujeitos a mutações.

O entendimento do mecanismo molecular do relógio interno é mais extensivamente estudado em camundongos. Experimentos animais incluindo observação de comportamentos naturais, indução química ou avaliações de mutações específicas têm sido fundamental para o entendimento do papel de cada componente do relógio molecular.

Mutações em *CK I?* podem ter efeitos dramáticos no período circadiano, pois resultam em alteração da atividade das enzimas Quinases e causam encurtamento do período circadiano em mamíferos (LOWREY *et al.*, 2000, XU *et al.*, 2005). Mutações nesse gene têm interesse particular em estudos de genética humana, pois elas podem implicar na síndrome familiar de fase avançada do sono (XU *et al.*, 2005).

Experimentos demonstraram que camundongos homozigotos dominantes para a mutação de deleção no éxon 19 do gene *Clock*, apresentam período circadiano mais longo (de aproximadamente 4h), e que se tornam arrítmicos quando são expostos ao escuro constante (VITATERNA *et al.*, 2006). Mutações no gene *Clock* podem trazer defeitos funcionais no heterodímero CLOCK-BMAL1 e, como consequência, induzir a um ritmo molecular lento (GEKAKIS *et al.*, 1998). Além disso, variações no *Bmal1* causam perturbações no ritmo comportamental e molecular de camundongos (BUNGER *et al.*, 2000).

Em humanos, o polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) T3111C do gene *Clock* tem sido associado à preferência diurna (KATZENBERG *et al.*,1998; MISHIMA *et al.*,2005) e com a suscetibilidade ao desenvolvimento da síndrome da fase atrasada do sono (IWASE *et al.*,2002).

Variações no gene *Per1* apresentam relação com o encurtamento (0,5 a 1h) do período circadiano em camundongos (CERMAKIAN *et al.*,2001), bem como variações no *Per2* (encurtamento de aproximadamente 1,5h), as quais também se relacionam com o comportamento arritmico de camundongos sob condições constantes (ZHENG *et al.*,1999). Na espécie humana, o gene *Per2* também pode ser considerado um elemento chave na geração dos ritmos circadianos, sendo o SNP C111G bastante associado com a preferência diurna, e a presença do alelo mutado G sendo um candidato potencial para o aumento do risco de desenvolvimento da síndrome da fase avançada do sono (CARPEN *et al.*,2005).

As alterações nos genes *Cry1* e *Cry2* possuem efeitos opostos em experimentos animais. As variações em *Cry1* são associadas ao encurtamento de aproximadamente 1h e, as variações em *Cry2*, com o aumento do período circadiano em camundongos (VAN DER HORST *et al.*,1999). Além disso, esses genes possuem influência na geração dos ritmos circadianos comportamentais normais, pois atuam na regulação da ritmicidade de expressão de *Per1* e *Per2* no NSQ e, perturbações conjuntas nos genes *Per1* e *Per2*, ou *Cry1* e *Cry2* causam arritmias comportamentais e moleculares, em camundongos (VITATERNA *et al.*,1999).

O gene *Period3*

Um dos primeiros estudos genéticos identificou o gene *Period* (*Per*) como o primeiro componente essencial para a oscilação circadiana e foi seguido pelo isolamento de vários genes relógio, não somente em *Drosophila melanogaster*, mas em muitas espécies, incluindo mamíferos (DUNLAP, 1999). O gene *Period3* (*Per3*) está localizado em humanos no cromossomo 1 e possui 23 éxons.

Em um estudo de identificação e caracterização dos polimorfismos do gene *Per3* em humanos (*hPer3*) foram detectadas 20 variações na seqüência genômica. Nas seqüências intrônicas examinadas foram detectados 4 SNPs e 2 inserções/deleções. Nas porções exônicas, foram encontrados 13 SNPs, desses 5

envolvem troca de aminoácidos (V420M, V647G, P864A, M1037T e H1158R), e 1 polimorfismo de repetição em tandem (VNTR), que envolve a repetição de 4 ou 5 cópias de 54pb, acarretando na presença ou ausência de 18 aminoácidos no éxon 18 (EBISAWA *et al.*, 2001).

Perturbações nos ritmos circadianos têm profunda influência na saúde humana e têm sido associadas ao desenvolvimento de câncer (FU & LEE, 2003). O polimorfismo de comprimento encontrado no éxon 18 do gene *hPer3*, além de possivelmente estar envolvido em variações funcionais dos ritmos circadianos, pode estar conectado com processos celulares fundamentais que se relacionam ao risco para desenvolvimento de carcinomas (ZHU *et al.*, 2005).

A presença do alelo com 5 repetições de 54pb foi associada ao aumento de risco para o desenvolvimento de câncer de mama em mulheres caucasianas, especialmente as que se encontram no período de pré-menopausa. Especula-se que a relação possa ser decorrente da interação entre o produto gênico do *Per3* e os hormônios femininos nos processos de formação de tumores de mama. Porém, cabe salientar que esse mecanismo ainda não está esclarecido (ZHU *et al.*, 2005).

Além do câncer de mama, foram explorados os possíveis papéis do gene *hPer3*, e outros genes relógio, no desenvolvimento da Leucemia Mielóide Crônica. Observou-se que em pacientes com Leucemia Mielóide Crônica o nível de expressão do *hPer3* é menor do que nos indivíduos saudáveis, sugerindo que a regulação da expressão desse gene está correlacionada com a inativação do *hPer3* por metilação (YANG *et al.*, 2006).

Variações no *Per3* têm papel no controle do sistema circadiano, o qual pode influenciar o ritmo individual e a personalidade (CACI *et al.*, 2004), podendo potencializar o aparecimento de doenças relacionadas ao humor (BENEDETTI *et al.*, 1996). Variações infreqüentes nesse gene são significativamente associadas ao número de características para distúrbios do humor, tais como idade de início da distúrbio, oscilação circadiana do humor e características de temperamento. Em pacientes avaliados pelo *Temperament and Character Inventory* (TCI), instrumento que avalia as diferenças de personalidade individual, a presença do alelo com 5 repetições em homozigose mostrou-se associado com elevados scores na classificação *Novelty Seeking*, particularmente nas subclasses *Extravagance* e *Cooperativeness*, *Compassion* e *Integrated Conscience*. Em adição, na análise de haplótipos, o VNTR do éxon 18, juntamente com o SNP T1940G do éxon 15, em

especial o SNP TT-44, parecem ser mais freqüentes em pacientes unipolares (ARTIOLI *et al.*, 2007).

As mutações encontradas no *Per3* também têm sido relacionadas à dependência de drogas. Já foi constatado que *Drosophilas* com variações nos genes *Per* e *Clock* são menos sensíveis a cocaína (ANDRETIC *et al.*, 1999). Na população chinesa foi avaliada a associação do VNTR do gene *hPer3* com a dependência à heroína, sendo apontada uma associação significativa entre a presença do alelo de 4 repetições de 54pb com a dependência à droga na amostra total e no gênero masculino, sugerindo que a variação em comprimento do gene *hPer3* pode ser um fator de risco em potencial para o desenvolvimento da dependência à heroína (ZOU *et al.*, 2008).

As freqüências alélicas do VNTR do *hPer3* possuem diferentes distribuições dentro de populações indígenas com etnias distintas, variando de 0,19 (para o alelo de 4 repetições) em Papua, na Nova Guiné, até 0,89 (para o alelo de 4 repetições) na Mongólia, mostrando uma grande variação na distribuição das freqüências alélicas ao longo do mapa mundial (NADKARNI *et al.*, 2005).

Estudos em genética de população feitos na Europa (ARCHER *et al.*, 2003; JONES *et al.*, 2007) e na América do Sul/Brasil (PEREIRA *et al.*, 2005) demonstraram que 4 repetições de 54pb caracterizam um genótipo homozigoto vespertino (4/4) e 5 repetições de 54pb caracterizam um genótipo homozigoto matutino (5/5), correspondendo às preferências diurnas obtidas pelo HO.

As variações nas freqüências do VNTR do *hPer3* têm sido alvo de várias pesquisas envolvendo distúrbios do sono em humanos. Pesquisas demonstraram uma forte associação do polimorfismo de repetição do gene *Per3* com a preferência diurna e com a Síndrome da Fase Atrasada do Sono (DSPS) (ARCHER *et al.*, 2003; PEREIRA *et al.*, 2005). No Japão, a análise de um haplótipo envolvendo a presença do alelo com 4 repetições também se mostrou significativamente associada com a DSPS (EBISAWA *et al.*, 2001).

Problemas na ritmicidade circadiana, incluindo distúrbios do sono, podem ter influência na vida social das pessoas. O VNTR do gene *hPer3* apresenta relação com a diminuição do desempenho, durante a vigília, em resposta a perda de sono durante a noite. Esse resultado é bastante evidente em sujeitos homozigotos para o alelo longo de 5 repetições (VIOLA *et al.*, 2007).

A associação entre o VNTR do gene *hPer3* e o cronotipo varia de acordo com a faixa etária estudada. A preferência diurna em pessoas jovens (18-29 anos) é mais fortemente associada com o polimorfismo de repetição do gene *Per3* do que em outros grupos de idade (JONES *et al.*, 2007).

Ritmos circadianos e estudantes

São raros os estudos que avaliem a preferência diurna de acadêmicos com utilização de parâmetros genéticos e descritivos.

Sabe-se que, em geral, estudantes apresentam um padrão de sono irregular que decorre principalmente da curta duração de sono nos dias de semana e longa duração de sono nos finais de semana. Essa variação parece estar associada à tendência do sistema de temporização circadiana de provocar atrasos na fase do início do sono (VALDEZ *et al.*, 1996).

Acadêmicos que iniciam suas aulas às 7h da manhã apresentam privação parcial do sono e irregularidades do sono decorrentes dos horários escolares e das demandas acadêmicas. Como consequência desta irregularidade, estes estudantes apresentam qualidade de sono ruim e baixo desempenho acadêmico (MEDEIROS *et al.*, 2001).

Em acadêmicos do sul do Brasil, foi observada uma preferência pela vespertinidade naqueles estudantes que nasceram na primavera-verão. Além disso, no gênero feminino foi demonstrada uma maior tendência para a matutuidade do que no gênero masculino (ALAM *et al.*, 2008).

Em estudo realizado com estudantes italianos com menor período de sono durante a semana foram registradas mais queixas de sonolência diurna e cochilos mais freqüentes que na população em geral. Em decorrência a estes achados, foi demonstrada uma associação com baixo desempenho acadêmico, com sintomas de ansiedade e depressão e maior uso de tabaco, álcool e cafeína (GIANOTTI, 1997).

2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVO

A investigação da ritmicidade biológica em humanos no extremo sul do país é muito recente, sendo necessários estudos mais detalhados e que contemplem o entendimento genético e a distribuição dos cronotipos e genótipos em diferentes latitudes. Os ritmos circadianos estão intimamente relacionados às interações sociais como horários escolares (desempenho escolar), trabalhos em turno (plantões) e qualidade de sono. Logo, o conhecimento da distribuição dos cronotipos e dos genes relacionados com a regulação dos ritmos biológicos pode auxiliar no entendimento das diferenças individuais de desempenho e adaptação a diferentes horários de atividade, as quais são encontradas em humanos.

O objetivo do trabalho foi realizar uma avaliação cronobiológica, através da análise da preferência diurna e da distribuição do VNTR do gene *Per3* em uma amostra de estudantes da Universidade Federal de Pelotas (UFPel).

3. METODOLOGIA

Local e período de desenvolvimento

O trabalho foi realizado na cidade de Pelotas, RS (31°46'19" S) no laboratório de Fisiologia Molecular pertencente ao Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Instituto de Biologia/Universidade Federal de Pelotas (UFPel). O período de coletas e processamento do material biológico se estendeu de Dezembro de 2006 até Abril de 2008.

Sujeitos

O trabalho teve como população alvo 122 acadêmicos da UFPel, sendo 61 homens e 61 mulheres. Os voluntários foram selecionados de forma aleatória e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 1).

Classificação da Preferência Diurna

Os voluntários participantes da pesquisa foram classificados quanto à preferência diurna através da pontuação obtida no questionário proposto por Horne e Östberg (1976) (Anexo 2).

Coleta e processamento do material biológico

Os primeiros voluntários foram submetidos à coleta de material genômico através de fricção de escova citológica na superfície interna da mucosa oral, para a

extração do DNA com o Kit comercial Puregene™ (Buccal Cell Kit, Gentra). O kit é composto por uma solução de lise celular; uma solução para precipitação protéica e uma solução de hidratação para homogeneizar o material genômico extraído.

Os voluntários restantes fizeram coleta de saliva para a extração do DNA com o Kit comercial Oragene DNA (DNA Genotek), o qual indica a utilização de *Buffer Purificador* para a precipitação protéica e etanol 100% para a precipitação do DNA.

Genotipagem do VNTR do gene *Per3*

A genotipagem do VNTR foi realizada por meio da reação de PCR (*Polymerase Chain Reaction*). A reação foi ajustada para um volume final de 25 µL, com a utilização de 15,5 µL de água Milli-Q autoclavada, 2,5 µL de Buffer 10X $+(NH_4)_2$, 2,5 µL de dNTPs [8mM], 1,80 µL de Cloreto de Magnésio, 0,25 µL de Primer Forward e Reverse [10pmol], 0,25 µL de Taq DNA Polimerase (5 unidades/µL) e 1,0 µL de DNA.

As condições da reação foram padronizadas em 38 ciclos, com temperatura de anelamento em 58°C por 45s e temperatura de extensão em 72°C por 1min.

Ao final da reação são gerados fragmentos de 635pb e/ou 689pb. A visualização do produto de PCR foi realizada por eletroforese em gel de agarose 2,0% com aplicação de 10 µL do produto da reação.

Na genotipagem podem ser observados dois alelos com 4 repetições de 54pb (homozigoto 4/4 – tendência vespertina); um alelo com 4 e outro com 5 repetições de 54pb (heterozigoto 4/5 - tendência intermediária); ou ainda, 2 alelos com 5 repetições de 54pb (homozigoto 5/5 - tendência matutina) (Figura 1).

Análise estatística

A análise estatística foi feita pelo Teste do Qui-quadrado (χ^2), programa SPSS 10.0, e pelo Teste de Proporções, programa EPINFO STATCALC, com correção de Yates.

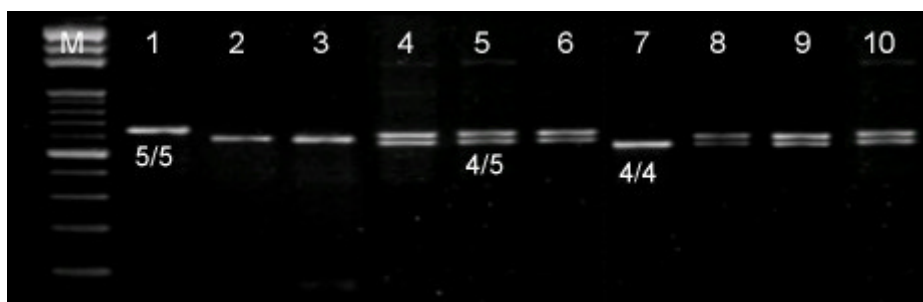


Figura 1: Eletroforese em gel de agarose 2,0%, mostrando o padrão das bandas para genotipagem do Polimorfismo de Repetição em Tandem do gene *Per3*.

M= Marcador ladder 100pb.

4. RESULTADOS

Pontuação do HO

? **Amostra total**

A pontuação média do HO na amostra total foi de $43,83 \pm 10,78$, caracterizando uma amostra com cronotipo intermediário (Figura 2), com uma distribuição de 44,26% para o cronotipo vespertino, 45,90% para o cronotipo intermediário e de 9,84% para o cronotipo matutino (Figura 3).

? **Por gêneros**

No gênero feminino a média da pontuação obtida pelo HO apresentou-se mais elevada ($47,016 \pm 9,7698$) em relação à média observada para os homens ($40,639 \pm 10,8751$) (Figura 2).

No sexo feminino a distribuição de freqüências foi de 27,87% para o cronotipo vespertino, 60,66% para o cronotipo intermediário e 11,47% para o cronotipo matutino. No sexo masculino as freqüências observadas foram de 60,66%, 31,15% e 8,19%, para os cronotipos vespertino, intermediário e matutino, respectivamente (Figura 3). A análise da associação entre os diferentes cronotipos e o sexo mostrou-se significativa (χ^2 , $p=0,01$), com uma maior freqüência das mulheres no grupo intermediário e os homens no grupo vespertino.

Análise genética

? **Amostra total**

A distribuição alélica na amostra total foi de 0,67 para o alelo de 4 repetições e de 0,33 para o alelo de 5 repetições (Figura 4). Na distribuição dos genótipos

encontramos uma freqüência de 43,0% para o homocigoto 4/4; de 48,0% para o heterocigoto 4/5; e de 9,0% para o homocigoto 5/5 (Figura 5).

? **Por gêneros**

Na análise dos gêneros não foi observada diferença nas freqüências alélicas entre mulheres e homens, sendo de 0,69 e 0,66, respectivamente, para o alelo com 4 repetições e, de 0,31 e de 0,34, respectivamente, para o alelo com 5 repetições (Figura 4).

O genótipo mais freqüente foi o heterocigoto 4/5 com 49,0% no sexo feminino e 46,0% no sexo masculino, seguido pelo homocigoto 4/4 com 44,0% nas mulheres e 43,0% nos homens, e pelo homocigoto 5/5 com 7,0% no sexo feminino e 11% no sexo masculino (Figura 5). A análise da associação entre os genótipos e o sexo não se apresentou significativa (Pearson=0,636).

Análise da distribuição do VNTR do gene *Per3* versus Pontuação do HO

A distribuição dos genótipos dentro de cada grupo na classificação do HO (tipo matutino, tipo intermediário e tipo vespertino) está demonstrada na figura 7. Não foi observada uma concordância significativa entre as duas metodologias analisando a amostra total ($p=0,86$), nem quando foram analisados os grupos, separadamente (matutino $p=0,72$, intermediário $p=0,87$, vespertino $p=0,61$).

Percebe-se uma tendência ao aumento na freqüência do alelo mais longo (5 repetições de 54pb) nos tipos caracterizados como matutinos, bem como do alelo curto (4 repetições de 54pb) para os tipos caracterizados como vespertinos (Figura 8). No entanto, essa variação apresentada na distribuição das freqüências entre os tipos matutinos (4 repetições=0,62, 5 repetições=0,38) e vespertinos (4 repetições=0,69, 5 repetições=0,31) não é significativamente diferente ($\chi^2=0,18$, $p=0,67$), bem como quando analisada entre os três grupos ($\chi^2=0,55$, $p=0,75$).

Na análise comparativa entre a distribuição da preferência diurna e dos genótipos do VNTR do gene *Per3* na amostra total, não foi encontrada concordância estatística ($p=0,137$) (Figura 6). Da mesma maneira, não se observou concordância quando foram feitas análises separadas segundo o gênero feminino ($\chi^2=3,82$, $p=0,148$) e masculino ($\chi^2=3,98$, $p=0,137$).

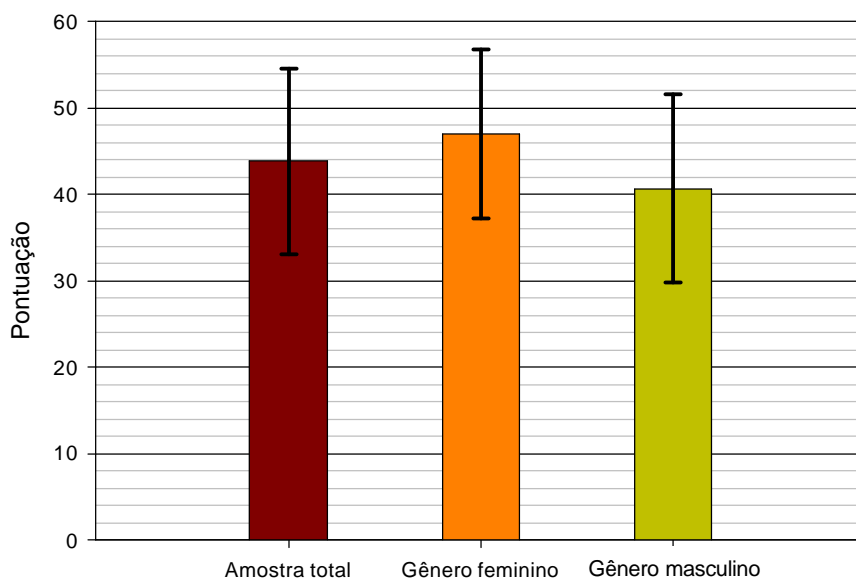


Figura 2: Pontuação média do HO na amostra total (n=122), no gênero feminino (n=61) e no gênero masculino (n=61).

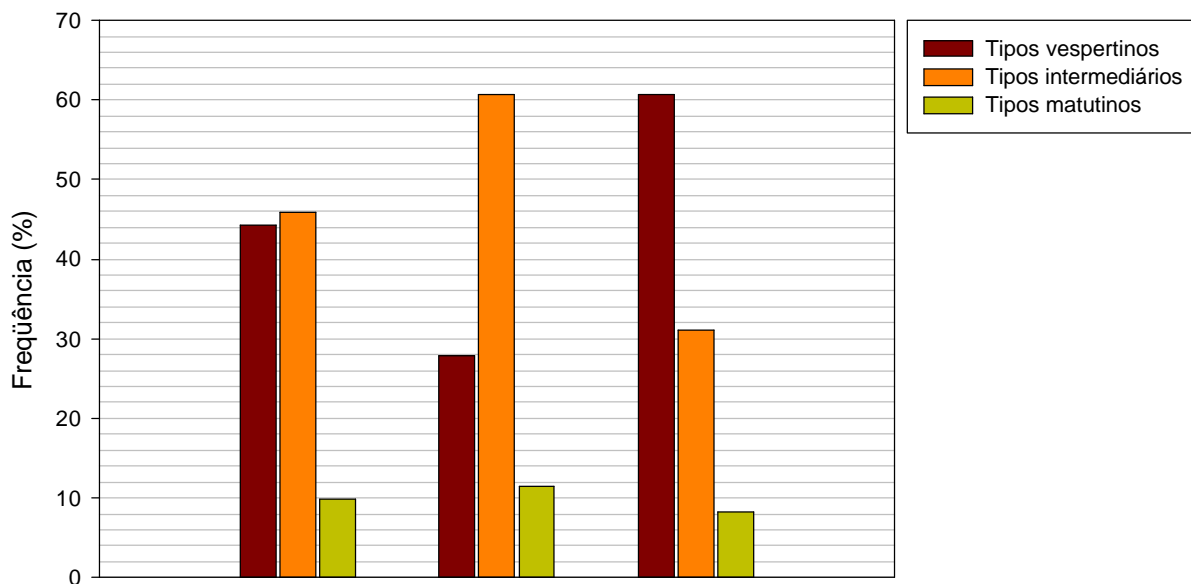


Figura 3: Distribuição em porcentagem dos cronotipos na amostra total (n=122), no gênero feminino (n=61) e no gênero masculino (n=61).

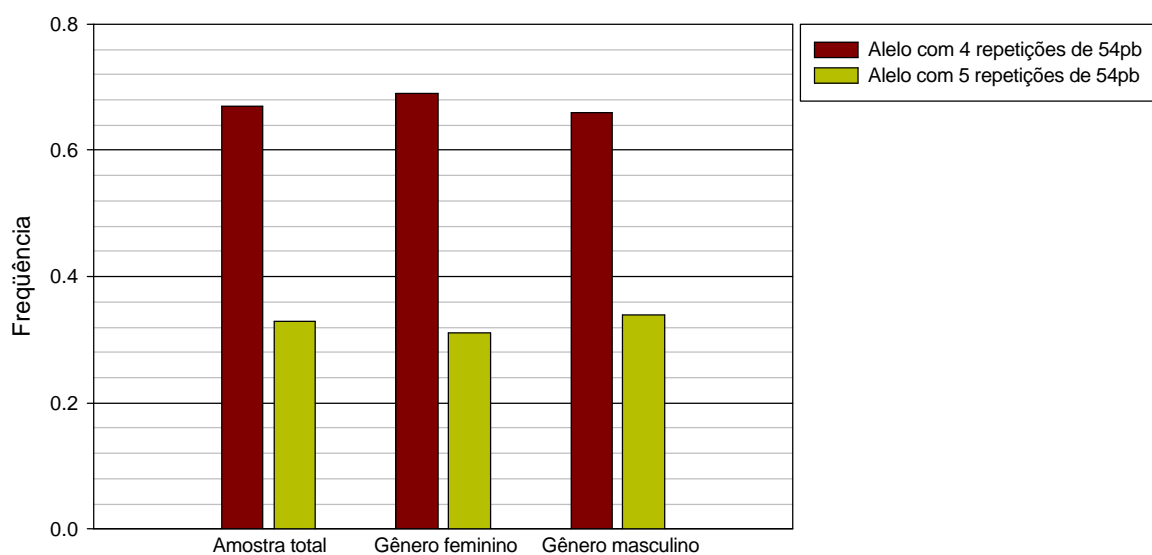


Figura 4: Frequências alélicas observadas, para o Polimorfismo de Repetição em Tandem do gene *Per3*, na amostra total (n=122), no gênero feminino (n=61) e no gênero masculino (n=61).

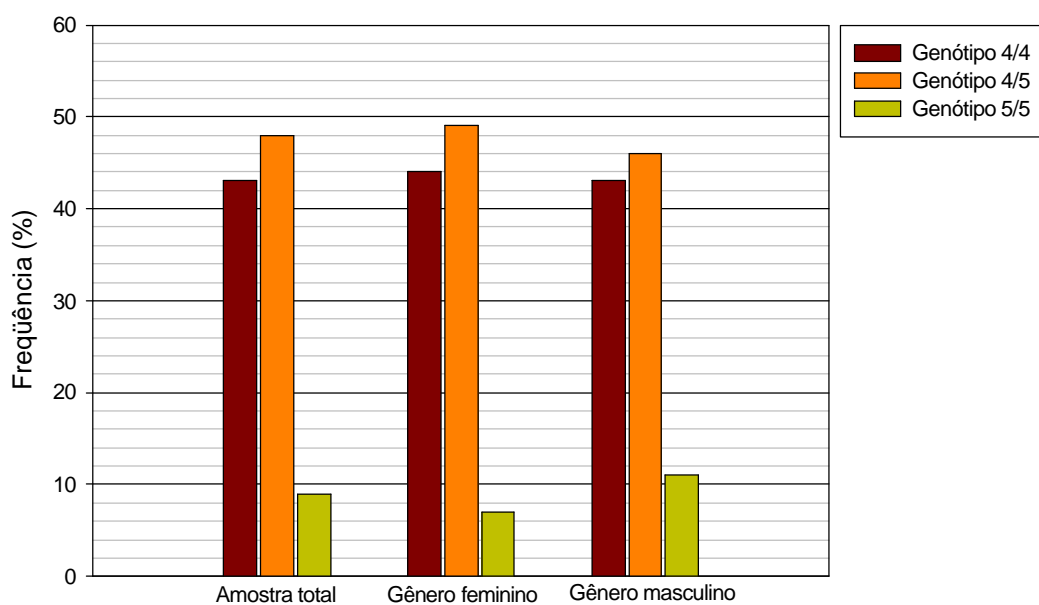


Figura 5: Distribuição dos genótipos do Polimorfismo de Repetição em Tandem do gene *Per3* na amostra total (n=122), no gênero feminino (n=61) e no gênero masculino (n=61).

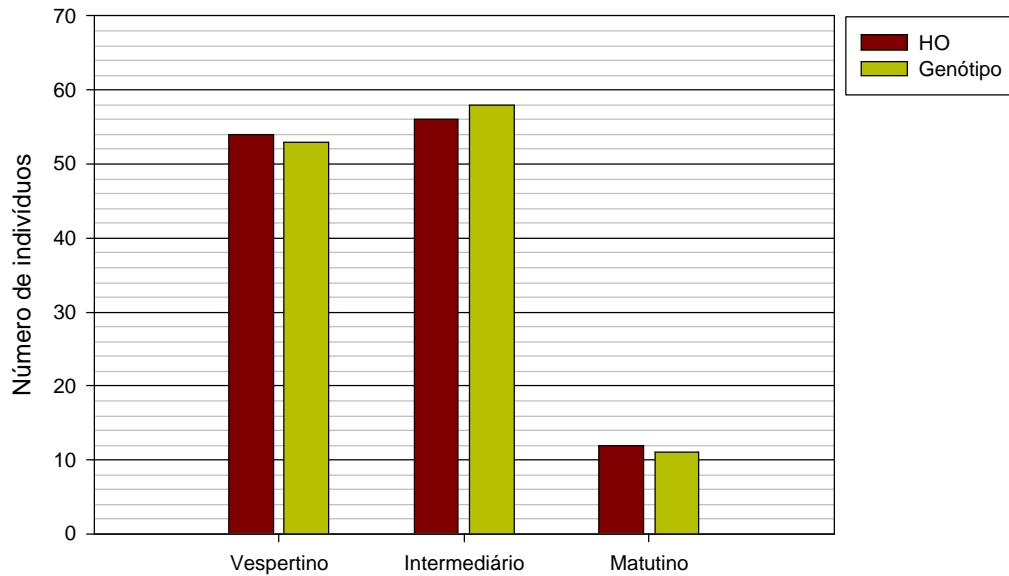


Figura 6: Número de indivíduos na amostra total (n=122) classificados como vespertinos, intermediários ou matutinos pelo HO e pela genotipagem do Polimorfismo de Repetição em Tandem do gene *Per3*.

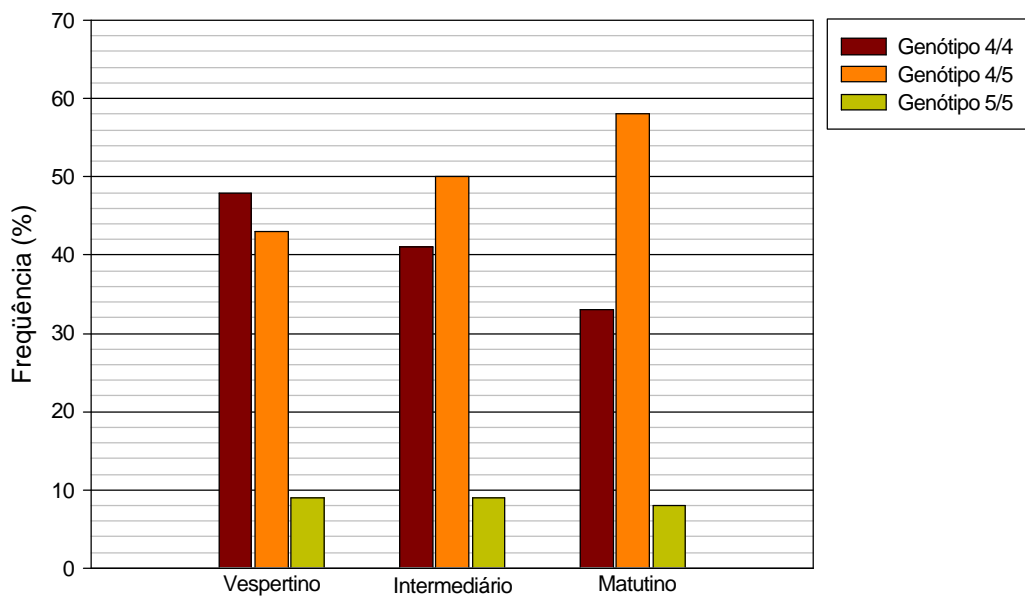


Figura 7: Distribuição dos genótipos do Polimorfismo de Repetição em Tandem dentro de cada grupo de cronotipos. Tipo vespertino (n=54), tipo intermediário (n=56) e tipo matutino (n=12).

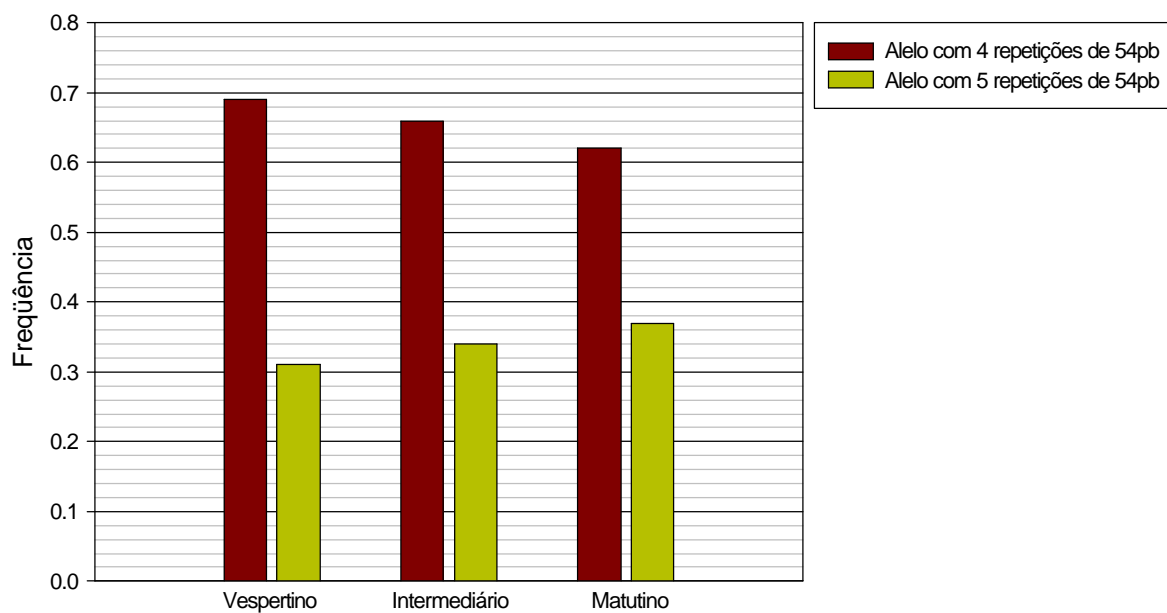


Figura 8: Frequências alélicas observadas para o Polimorfismo de Repetição em Tandem dentro de cada grupo de cronotipos. Tipo vespertino (n=54), tipo intermediário (n=56) e tipo matutino (n=12).

5. DISCUSSÃO

No sul do Brasil, ALAM *et al.* (2008) buscando determinar a distribuição dos cronotipos do espectro matutino/vespertino e as diferenças de gênero em uma amostra de estudantes universitários, verificaram que o gênero feminino apresenta maior tendência à matutividade quando comparado ao gênero masculino. No presente estudo, a média da pontuação do HO nas mulheres também se apresenta mais elevada do que a média do gênero masculino. Segundo ALAM *et al.* (2008), as diferenças de gênero nos ritmos circadianos têm sido interpretadas como influências socioculturais e ambientais. Com a mesma justificativa, HÄRMA (1995) e NACHREINER (1998), discutem as diferenças entre homens e mulheres quanto ao rendimento profissional.

Além de estudos no Sul do Brasil, em uma pesquisa feita com estudantes universitários da Espanha e da Itália, ADAN *et al.* (2002) também demonstrou que o gênero masculino apresenta *score* médio mais baixo em relação ao gênero feminino.

A baixa ocorrência dos tipos matutinos na amostra de estudantes analisada por ambas metodologias pode ter conseqüências, como geração de uma baixa qualidade do sono, além de atraso do sono durante os finais de semana, já que durante a semana ocorre uma privação do sono em função das atividades e das exigências acadêmicas.

MEDEIROS *et al.* (2001) investigando o padrão do ciclo sono-vigília de estudantes de medicina que começavam cedo as aulas, mostraram que 38,9% dos estudantes tinham qualidade de sono ruim e que a baixa qualidade de sono estava associada com privação e a irregularidade do ciclo sono-vigília.

VALDEZ *et al.* (1996), em um estudo com estudantes mexicanas de duas turmas, no qual uma turma estudava das 7h às 12h e a outra de 14h às 18h, mostraram que as estudantes de ambas as turmas apresentaram um atraso nos finais de semana no horário de dormir e de acordar (47,4 minutos no horário de dormir e 118,2 minutos no horário de acordar, e de 24 minutos no horário de dormir

e variação não significativa no horário de acordar, para as estudantes do turno da manhã e da tarde, respectivamente). Os autores sugerem que o atraso de fase do sono no final de semana representaria a tendência da expressão do sistema de temporização circadiana da espécie humana que possui um período endógeno maior que 24h. Por outro lado, outra explicação seria a forte influência do contexto sócio-cultural que poderia estar atuando como sincronizador estimulando uma tendência ao atraso de fase do ciclo sono-vigília.

A oscilação do ciclo sono-vigília, causando perturbações na qualidade do sono, tem um efeito direto sobre as atividades desenvolvidas pelas pessoas que vivem sob essas condições. Da mesma forma que indivíduos vespertinos podem apresentar menor rendimento nas atividades iniciadas nas primeiras horas do dia, os matutinos podem vir a apresentar baixo rendimento nas suas atividades se seu período de sono noturno for perturbado.

VIOLA *et al.* (2007) investigaram as conseqüência funcionais do VNTR do gene *Per3* para o sono, para a fisiologia circadiana e para a performance durante o período de vigília, analisando voluntários expostos a um mesmo protocolo de rotina circadiana. Nesse trabalho, os autores encontraram que os indivíduos homozigotos para o alelo de 5 repetições apresentavam efeitos consideráveis na estrutura do sono, mostrando um aumento na perturbação do sono REM, quando comparados aos indivíduos homozigotos para o alelo de 4 repetições. Como conseqüência direta dessa perda de sono, os indivíduos 5/5 mostraram uma diminuição no desempenho cognitivo durante a vigília.

Isso se torna relevante se levarmos em consideração que o alelo de 5 repetições possui grande associação com a preferência pela matutividade e que o alelo de 4 repetições, com a preferência pela vespertinidade (ARCHER *et al.*, 2003; JONES *et al.*, 2007; PEREIRA *et al.*, 2005). Esse resultado não foi observado no presente trabalho provavelmente pelo tamanho amostral limitado, em especial dos tipos caracterizados como matutinos. Pessoas com esta característica, acompanhada pelo genótipo homozigoto 5/5 podem vir a desenvolver baixa qualidade nas suas atividades devido à imposição da rotina social por privação ou perturbações do sono; e os indivíduos com as características de vespertinidade acompanhadas pelo genótipo homozigoto 4/4 podem apresentar dificuldades nas atividades diárias devido ao seu mecanismo circadiano endógeno.

A influência do VNTR do gene *Per3* no desenvolvimento de fenótipos que caracterizam uma pessoa como tipo matutino ou vespertino, possivelmente esteja relacionado com a presença ou ausência dos 18 aminoácidos relacionados à inserção ou a deleção dos 54pb. AKASHI *et al.*, (2002) demonstraram que as três proteínas transcritas pela família *Period* sofrem fosforilação pela CKI?, que regula a estabilidade dessas proteínas e suas translocações nucleares. Logo, as seqüências com 4 ou 5 repetições de 54pb apresentam potenciais distintos para o processo de fosforilação.

ARCHER *et al.*(2003) sugerem que a diminuição do número de aminoácidos livres como substrato para a fosforilação, na variante curta do VNTR, presumiria um polimorfismo funcional com efeitos dependentes da fosforilação. Visto que as variações estão arranjadas em Tandem, o mecanismo pode ser bastante similar ao proposto para o *Per2*, onde a variação em Tandem com diminuição da seqüência genômica apresenta efeitos sobre a ação da CKI? gerando uma maior estabilização do produto protéico e associação com a síndrome da fase adiantada do sono (*Advanced Sleep-Phase Syndrome* - ASPS).

As freqüências alélicas encontradas no presente estudo mostram-se semelhantes às encontradas por ARCHER *et al.* (2003) e PEREIRA *et al.* (2005), exceto nos indivíduos com preferência pela vespertinidade, onde se verifica uma diminuição de 0,07 e de 0,08 na freqüência do alelo com 4 repetições quando comparados os nossos resultados com os de ARCHER *et al.* (2003) e PEREIRA *et al.* (2005), respectivamente. Em ambos os estudos foi encontrada associação significativa do VNTR do gene *Per3* com a preferência diurna, especialmente do alelo de 5 repetições no grupo matutino quando comparado ao grupo vespertino. No entanto, diferem quanto ao alelo associado à síndrome da fase atrasada do sono (*Delayed Sleep-Phase Syndrome* - DSPS). ARCHER *et al.*(2003) associaram a presença do alelo de 4 repetições ao aumento de risco para o desenvolvimento da DSPS, enquanto PEREIRA *et al.* (2005) encontraram uma associação significativa entre a presença do alelo de 5 repetições e a DSPS.

Devido a essa disparidade quanto ao alelo relacionado ao risco para desenvolvimento de DSPS, PEREIRA *et al.* (2005) sugeriram que a distribuição alélica pode ser influenciada pelo *background* étnico das populações estudadas, além da possível diferença na pressão de seleção dos alelos devido à latitude onde

as populações estudadas se encontram, em função da variação da incidência solar nas diferentes localidades.

No entanto, ao verificar a semelhança nos resultados obtidos para as frequências alélicas entre o presente estudo, o de ARCHER *et al.*(2003) e o de PEREIRA *et al.* (2005), percebemos que a variação nas latitudes de 31°46'19"S, 51°30'N e 23°32'S, respectivamente, parecem não influenciar na distribuição dos alelos do VNTR do gene *Per3*. Contudo, é importante ressaltar que o grau de latitude interfere no fotoperíodo e, conseqüentemente, no tempo de exposição à incidência solar a que os indivíduos são submetidos. Isso poderia ser um fator natural atuante sobre a pressão de seleção que os alelos sofrem nas diferentes regiões do globo.

Com a intenção de verificar a distribuição do VNTR do gene *Per3* no planeta e a possível pressão de seleção exercida pela luz solar média anual e comprimento médio do dia, NADKARNI *et al.* (2005) analisaram as frequências alélicas e suas variações para esse polimorfismo em populações indígenas com diferentes etnias. Nas análises realizadas em populações que vivem em uma latitude entre 30° e 32°, as frequências encontram-se em 0,65 (África do Sul) e 0,82 (China), bem como em 0,53 (Argélia) e 0,70 (Irã) para o alelo de 4 repetições. Esses resultados demonstram que não existe uma relação direta entre a frequência alélica e o índice de incidência solar ou duração do dia. Por outro lado, PEDRAZZOLI *et al.* (2007) em uma investigação sobre uma possível associação entre polimorfismos do gene *Clock* e fenótipos circadianos, em uma amostra da população brasileira, indicaram que o efeito do polimorfismo sobre o cronotipo pode ser influenciado pela latitude.

Porém, de forma interessante, ao comparar nossos resultados com as frequências descritas por NADKARNI *et al.* (2005) para latitudes em torno dos 31° percebemos uma maior aproximação com a frequência observada para a população da África do Sul. Isso pode ser explicado como uma conseqüência da grande miscigenação étnica do Brasil, em especial pelo grande número de imigrantes africanos que nosso país recebeu durante o período da escravidão.

O questionário de HO tem sido considerado o “padrão-ouro” para a avaliação da preferência diurna e a genotipagem, uma avaliação mais recente, vem ganhando destaque no meio científico. A não concordância entre os resultados do HO e da avaliação do VNTR do gene *Per3* na amostra estudada pode ser decorrente do pequeno tamanho amostral.

6. CONCLUSÃO

Nos resultados obtidos foi constatada uma baixa ocorrência de estudantes que possuem preferência pela matutividade, bem como, do genótipo indicado pela literatura como um fator para a predisposição a essa característica. No entanto, verificou-se que as mulheres apresentam uma maior preferência pela matutividade do que os homens.

Não foi verificada uma associação da análise do VNTR do gene *Per3* com a determinação da preferência diurna pelo HO. Sugere-se uma ampliação da amostra estudada, assim como, a avaliação de outros polimorfismos de genes envolvidos com o relógio biológico a fim de se avançar no conhecimento dos intrincados mecanismos cronobiológicos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAN, A. & NATALE, V. 2002. Gender differences in morningness–eveningness preference. **Chronobiol Int.** 19:709-20.

AKASHI, M.; TSUCHIYA, Y.; YOSHINO, T. & NISHIDA, E. 2002. Control of intracellular dynamics of mammalian period proteins by casein Kinases I? (CKI?) and CKI? in cultured cells. **Mol Cell Biol.** 22:1693-1703.

AKERSTEDT, T. 2007. Altered sleep/wake patterns and mental performance. **Physiology & Behavior.** 90: 209–218.

ALAM, M. F.; TOMASI, E.; LIMA, M. S.; AREAS, R. & MENNA-BARRETO, L. 2008. Caracterização e distribuição de cronotipos no sul do Brasil: diferenças de gênero e estação de nascimento. **J Bras Psiquiatr.** 57(2):83-90.

ANDRETIC, R.; CHANEY, S. & HIRSH, J. 1999. Requirement of Circadian Genes for Cocaine Sensitization in *Drosophila*. **Science.** 285:1066-1068.

ARCHER, S. N.; ROBILLIARD, D. L.; SKENE, D. J.; SMITS, M.; WILLIAMS, A.; ARENDT, J. & SCHANTZ, M. 2003. A length polymorphism in the circadian clock gene *PER3* is linked to delayed sleep-phase syndrome and extreme diurnal preference. **Sleep.** 26(4): 413-415.

ARTIOLI, P.; LORENZI, C.; PIROVANO, A.; SERRETTI, A.; BENEDETTI, F.; CATALANO, M. & SMERALDI, E. 2007. How do genes exert their role? Period 3 gene variants and possible influences on mood disorder phenotypes. **European Neuropsychopharmacology.** 17:587–594.

ASCHOFF, J. 1965. Circadian rhythms in man. **Science.** 148: 1427-1432.

BENEDETTI, F.; BARBINI, B.; COLOMBO, C.; CAMPORI, E. & SMERALDI, E. 1996. Infradian mood fluctuations during a Major Depressive episode. **Journal of Affective Disorders**. 41: 81-87.

BUNGER, M. K.; WILSBACHER, L. D.; MORAN, S. M.; CLENDENIN, C.; RADCLIFFE, L. A.; HOGENESCH, J. B.; SIMON, M. C.; TAKAHASHI, J. S. & BRADFIELD, C. A. 2000. Mop3 is an essential component of the master circadian pacemaker in mammals. **Cell**. 103(7):1009–1017.

CACI, H.; ROBERT, P. & BOYER, P. 2004. Novelty seekers and impulsive subjects are low in morningness. **European Psychiatry**. 19: 79–84.

CARPEN, J. D.; ARCHER, S. N.; SKENE, D. J.; SMITS, M. & VON SCHANTZ, M. 2005. A single-nucleotide polymorphism in the 5'-untranslated region of the hPER2 gene is associated with diurnal preference. **J Sleep Res**.14(3):293-297.

CEOLIM, M. F. & MENNA-BARRETO, L. 2000. Sleep/ Wake cycle and Physical activity in healthy elderly people. **Sleep Research Online**. 3(3): 87-95.

CERMAKIAN, N.; MONACO, L.; PANDO, M. P.; DIERICH, A. & SASSONE-CORSI, P. 2001. Altered behavioral rhythms and clock gene expression in mice with a targeted mutation in the Period1 gene. **EMBO J**. 20(15):3967–3974.

CIPOLLA-NETO, J. & CAMPA, A. 1991. Ritmos Biológicos. **Tratado de Endocrinología Clínica**. 2: 17-19.

COPINSCHI, G.; SPIEGEL, K.; LEPROULT, R. & VAN CAUTER, E. 2000. Pathophysiology of human circadian rhythms. **Novartis Found Symp**. 227:143-162.

CZEISLER, C. A. & KLERMAN, E. B. 1999. Circadian and sleep-dependent regulation of hormone release in humans. **Recent Prog Horm Res**. 54:97-132.

DARDENTE, H.; FORTIER, R. E.; MARTINEAU, V. & CERMAKIAN, N. 2007. Cryptochromes impair phosphorylation of transcriptional activators in the clock: a general mechanism for circadian repression. **Biochem. J.** 402:525–536.

DAVIES, A.; BLAKELEY, A. G. H. & KIDD, C. 2002. **Fisiologia Humana**. Editora Artmed. 1ª edição. 980 p.

DOI, M.; HIRAYAMA, J. & SASSONE-CORSI, P. 2006. Circadian Regulator CLOCK Is a Histone Acetyltransferase. **Cell.** 125:497–508.

DUNLAP, J. C. 1999. Molecular basis for circadian clocks. **Cell.** 96(2): 271-290.

EBISAWA, T.; UCHIYAMA, M.; KAJIMURA, N.; MISHIMA, K.; KAMEI, Y.; KATOH, M.; WATANABE, T.; SEKIMOTO, M.; SHIBUI, K.; KIM, K.; KUDO, Y.; OZEKI, Y.; SUGISHITA, M.; TOYOSHIMA, R.; INOUE, Y.; YAMADA, N.; NAGASE, T.; OZAKI, N.; OHARA, O.; ISHIDA, N.; OKAWA, M.; TAKAHASHI, K. & YAMAUCHI, T. 2001. Association of structural polymorphisms in the human *period3* gene with delayed sleep phase syndrome. **EMBO Rep.** 21(41): 342–346.

FU, I. & LEE, C. C. 2003. The circadian clock: pacemaker and tumour suppressor. **Nature Reviews Cancer.** 3:350-361.

GASPAR, S.; MORENO, C. & MENNA-BARRETO, L. 1998. Os Plantões Médicos, o Sono e a Ritmicidade Biológica. **Rev. Ass. Med. Brasil.** 44(3): 239-245.

GEKAKIS, N.; STAKNIS, D.; NGUYEN, H. B.; DAVIS, F. C.; WILSBACHER, L. D.; KING, D. P.; TAKAHASHI, J. S. & WEITZ, C. J. 1998. Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism. **Science.** 280(5369):1564–1569.

GIANNOTI, F. 1997. Sleep patterns and daytime functions in adolescence. Trabalho apresentado no **Contemporary Perspectives on Adolescent Sleep**, Marina Del Rey, Califórnia, (disponível na internet: <http://www.websciences.org/adolescentsleep>).

GRANDIN, L. D.; ALLOY, L. B. & ABRAMSON, L. Y. 2006. The social zeitgeber theory, circadian rhythms, and mood disorders: review and evaluation. **Clinical Psychology Review**. 26(6): 679-694.

GUYTON, A. C. & HALL, J. E. 2006. **Tratado de Fisiologia Médica**. Editora Guanabara Koogan S. A. 11ª edição. 973p.

HÄRMÄ, M. 1995. Sleepiness and shiftwork: Individual differences. **Journal of Sleep Research**. 4(2):57-61.

HASTINGS, M. H. & HERZOG, E. D. 2004. Clock genes, oscillators, and cellular networks in the suprachiasmatic nuclei. **Journal Of Biological Rhythms**. 19(5):400-13.

HOFMAN, M. A. 2000. The human circadian clock and aging. **Chronobiol Int**. 17(3):245-259.

HOFMAN, M. A. 2004. The brain's calendar: neural mechanisms of seasonal timing. **Biol Rev**. 79:61-77.

HORNE, J. A. & OSTBERG, O. 1976. A self-assessment questionnaire to determine morningness/eveningness in human circadian rhythms. **Int J Chronobiol**. 4(2): 97-110.

HOROWITZ, T. S.; CADE, B. E.; WOLFE, J. M. & CZEISLER, C. A. 2001. Efficacy of bright light and sleep/darkness scheduling in alleviating circadian maladaptation to night work. **Am J Physiol Endocrinol Metab**. 281:384-391.

IWASE, T.; KAJIMURA, N.; UCHIYAMA, M.; EBISAWA, T.; YOSHIMURA, K.; KAMEI, Y.; SHIBUI, K.; KIM, K.; KUDO, Y.; KATOH, M.; WATANABE, T.; NAKAJIMA, T.; OZEKI, Y.; SUGISHITA, M.; HORI, T.; IKEDA, M.; TOYOSHIMA, R.; INOUE, Y.; YAMADA, N.; MISHIMA, K.; NOMURA, M.; OZAKI, N.; OKAWA, M.; TAKAHASHI, K. & YAMAUCHI, T. 2002. Mutation screening of the human Clock gene in circadian rhythm sleep disorders. **Psychiatry Res**. 109(2):121-128.

JONES, K. H. S.; ELLIS, J.; SCHANTZ, M. V.; SKENE, D. J.; DIJK, D. & ARCHER, S. N. 2007. Age-related change in the association between a polymorphism in the PER3 gene and preferred timing of sleep and waking activities. **J. Sleep Res.** 16:12–16.

KATZENBERG, D.; YOUNG, T.; FINN, L.; LIN, L.; KING, D. P.; TAKAHASHI, J. S. & MIGNOT, E. 1998. A CLOCK polymorphism associated with human diurnal preference. **Sleep.** 21(6):569-576.

KONDRATOV, R. V.; KONDRATOVA, A. A.; LEE, C.; GORBACHEVA, V. Y.; CHERNOV, M. V. & ANTOCH, M. P. 2006. Post-translational regulation of circadian transcriptional CLOCK (NPAS2)/BMAL1 complex by CRYPTOCHROMES. **Cell Cycle.** 5(8):890-5.

LOWREY, P. L.; SHIMOMURA, K.; ANTOCH, M. P.; YMAZAKI, S.; ZEMENIDES, P. D.; RALPH, M. R.; MENAKER, M. & TAKAHASHI, J. S. 2000. Positional syntenic cloning and functional characterization of the mammalian circadian mutation *tau*. **Science.** 288(5465): 483-491.

MARKUS, R. P.; MORTANI BARBOSA, E. J. & FERREIRA, Z. S. 2003. Ritmos biológicos: entendendo as horas, os dias e as estações do ano. **Einstein.** 1:143-148.

MARTINEZ, D.; LENZ, M. C. S. & MENNA-BARRETO, L. 2008. Diagnóstico dos transtornos do sono relacionados ao ritmo circadiano. **J Bras Pneumol.** 34(3):173-180.

MEDEIROS, A. L.; MENDES, D. B. F.; LIMA, P. F. & ARAÚJO, J. F. 2001. The relationships between sleep/wake cycle and academic performance in medical students. **Biological Rhythms Research.** 32:263-270.

MISHIMA, K.; TOZAWA, T.; SATOH, K.; SAITOH, H. & MISHIMA, Y. 2005. The 3111T/C polymorphism of hClock is associated with evening preference and delayed sleep timing in a Japanese population sample. **Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.** 133(1):101-4.

MORTANI BARBOSA, E. J.; FERREIRA, Z. S. & MARKUS, R. P. 2000. Purinergic and noradrenergic cotransmission in the rat pineal gland. **European Journal of Pharmacology**. 401:59-62.

NACHREINER, F. 1998. Individual and social determinants of shiftwork tolerance. **Scandinavian Journal of Work and Environmental Health**. 24(3):35-42.

NADKARNI, N. A.; WEALE, M. E.; SCHANTZ, M. & THOMAS, M. G. 2005. Evolution of a Length Polymorphism in the Human *PER3* Gene, a Component of the Circadian System. **Journal Of Biological Rhythms**. 20(6):490-499.

PEDRAZZOLI, M.; LOUZADA, F. M.; PEREIRA, D. S.; BENEDITO-SILVA, A. A.; LOPEZ, A. R.; MARTYNHAK, B. J.; KORCZAK, A. L.; KOIKE BDEL, V.; BARBOSA, A. A.; D'ALMEIDA, V. & TUFIK, S. 2007. Clock polymorphisms and circadian rhythms phenotypes in a sample of the brazilian population. **Chronobiol Int**. 24(1):1-8.

PEREIRA, D. S.; TUFIK, S.; LOUZADA, F. M.; BENEDITO-SILVA, A. A.; LOPEZ, A. R.; LEMOS, N. A.; KORCZAK, A. L.; D'ALMEIDA, V. & PEDRAZZOLI, M. 2005. Association of the Length Polymorphism in the Human *PER3* Gene with the Delayed Sleep-Phase Syndrome: Does Latitude Have an Influence Upon It? **SLEEP**. 28(1): 29-32.

REPPERT, S. M. & WEAVER, D. R. 2001. Molecular analysis of mammalian circadian rhythms. **Annu Rev Physiol**. 63:647-676.

REPPERT, S. M. & WEAVER, D. R. 2002. Coordination of circadian timing in mammals. **Nature**. 418: 935-41.

ROLLAG, M. D.; BERSON, D. M. & PROVENCIO, I. 2003. Melanopsin, ganglion-cell photoreceptors, and mammalian photoentrainment. **Journal of Biological Rhythms**. 18(3):227-34.

SIMONNEAUX, V. & RIBELAYGA, C. 2003. Generation of the melatonin endocrine message in mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by

norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters. **Pharmacological Reviews**. 55(2):325-95.

TAILLARD, J.; PHILIP, P.; CHASTANG, J. F.; DIEFENBACH, K. & BIOULAC, B. 2001. Is self-reported morbidity related to the circadian clock? **Journal of Biological Rhythms**. 16(2):183-90.

TAKAHASHI, J.S. 2004. Finding new clock components: past and future. **J. Biol. Rhythms**. 19(5):339–347.

VALDEZ, P.; RAMÍREZ, C. & GARCIA, A. 1996. Delaying and extending sleep during weekends: sleep recovery or circadian effect? **Chronobiology International**. 13(3):191-198.

VAN DER HORST, G. T.; MUIJTJENS, M.; KOBAYASHI, K.; TAKANO, R.; KANNO, S.; TAKAO, M.; DE WIT, J.; VERKERK, A.; EKER, A. P.; VAN LEENEN, D.; BUIJS, R.; BOOTSMA, D.; HOEIJMAKERS, J. H. & YASUI, A. 1999. Mammalian Cry1 and Cry2 are essential for maintenance of circadian rhythms. **Nature**. 398(6728):627-30.

VIOLA, A. U.; ARCHER, S. N.; JAMES, L. M.; GROEGER, J. A.; LO, J. C.Y.; SKENE, D. J.; SCHANTZ, M. V. & DIJK, D. 2007. PER3 Polymorphism Predicts Sleep Structure and Waking Performance. **Current Biology**. 17:613–618.

VITATERNA, M. H.; SELBY, C. P.; TODO, T.; NIWA, H.; THOMPSON, C.; FRUECHTE, E. M.; HITOMI, K.; THRESHER, R. J.; ISHIKAWA, T.; MIYAZAKI, J.; TAKAHASHI, J. S. & SANCAR, A. 1999. Differential regulation of mammalian period genes and circadian rhythmicity by cryptochromes 1 and 2. **Proc Natl Acad Sci USA**. 96(21):12114-12119.

VITATERNA, M. H.; KO, C. H.; CHANG, A. M.; BUHR, E. D.; FRUECHTE, E. M.; SCHOOK, A.; ANTOCH, M. P.; TUREK, F. W. & TAKAHASHI, J. S. 2006. The mouse Clock mutation reduces circadian pacemaker amplitude and enhances efficacy of resetting stimuli and phase-response curve amplitude. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. 103(24):9327–9332.

YANG, M. Y.; CHANG, J. G.; LIN, P. M.; TANG, K. P.; CHEN, Y. H.; LIN, H. Y. H.; LIU, T. C.; HSIAO, H. H.; LIU, Y. C. & LIN, S. F. 2006. Downregulation of circadian clock genes in chronic myeloid leukemia: Alternative methylation pattern of *hPER3*. **Cancer Sci.** 97(12):1298–1307.

WEAVER, D. R. 1998. The Suprachiasmatic Nucleus: A 25-Year Retrospective. **Journal of Biological Rhythms.** 13(2):100-112.

XU, Y.; PADIATH, Q. S.; SHAPIRO, R. E.; JONES, C. R.; WU, S. C.; SAIGOH, N.; SAIGOH, K.; PTACEK, L. J. & FU, Y. H. 2005. Functional consequences of a CK1 δ mutation causing familial advanced sleep phase syndrome. **Nature.** 434:640–644.

ZHENG, B.; LARKIN, D. W.; ALBRECHT, U.; SUN, Z. S.; SAGE, M.; EICHELE, G.; LEE, C. C. & BRADLEY, A. 1999. The mPer2 gene encodes a functional component of the mammalian circadian clock. **Nature.** 400(6740):169–173.

ZHU, Y.; BROWN, H. N.; ZHANG, Y.; STEVENS, R. G. & ZHENG, T. 2005. Period3 Structural Variation: A Circadian Biomarker Associated with Breast Cancer in Young Women. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention.** 14(1):268-270.

ZOU, Y.; LIAO, G.; LIU, Y.; WANG, Y.; YANG, Z.; LIN, Y.; SHEN, Y.; LI, S.; XIAO, J.; GUO, H.; WAN, C. & WANG, Z. 2008. Association of the 54-nucleotide repeat polymorphism of hPer3 with heroin dependence in Han Chinese population. **Genes, Brain and Behavior.** 7: 26–30.

ANEXOS

ANEXO 1: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Observação quanto ao Termo de Consentimento Livre e Esclarecido:

Foi realizada uma adaptação quanto ao material biológico colhido para a obtenção do material genômico, substituindo-se o sangue venoso periférico por saliva. Os voluntários foram esclarecidos quanto a essa alteração ao assinarem o termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

ANEXO 2: Questionário para identificação de indivíduos matutinos e vespertinos

Traduzido e adaptado de Home, J. A. & Ostberg, O., A self-assessment questionnaire to determine morningness-eveningness in human circadian rhythm. *International Journal of Chronobiology*, vol.4: 97-110, 1976, pelo Grupo Multidisciplinar de Desenvolvimento e Ritmos Biológicos – Departamento de Fisiologia e Biofísica - ICB/USP.

INSTRUÇÕES:

1. Leia com atenção cada questão antes de responder.
2. Responda todas as questões.
3. Para cada questão coloque apenas uma resposta (uma cruz no local correspondente); algumas questões têm uma escala, nestes casos coloque a cruz no ponto apropriado da escala.
4. Responda a cada questão com toda a honestidade possível. Suas respostas e os resultados são confidenciais.

Dados Gerais:

Nome: _____
 País: _____ Cidade: _____ UF: _____
 Endereço (Preenchimento não obrigatório): _____
 E-mail: _____
 Sexo: Masculino () Feminino ()
 Data de nascimento: _____

Você trabalha? Sim () Não ()

Horário () manhã (6:00-12:00) () Noite (18:00-00:00) () outros
 () Tarde (12:00-18:00) () Madrugada (00:00-6:00)
 () Integral (8:00-18:00) () Irregular

Você estuda? Sim () Não ()

Horário () manhã (6:00-12:00) () Noite (18:00-00:00) () outros
 () Tarde (12:00-18:00) () Madrugada (00:00-6:00)
 () Integral (8:00-18:00) () Irregular

Em qual dessas estações do ano você se sente melhor?

() Verão () Inverno () Primavera () Outono () Indiferente

Você sente desconforto na entrada do horário de verão? Sim () Não ()

Se sim, quanto tempo dura esse mal estar?

() uma semana () um mês () toda duração do horário de verão

1. Considerando apenas seu bem-estar pessoal e com liberdade total de planejar seu dia, a que horas você se levantaria?

- 05h00-06h30 06h30-0745 7h45-9h45
 9h45-11h00 11h00-12h00

2. Considerando apenas seu bem-estar pessoal e com liberdade total de planejar sua noite, a que horas você se deitaria?

- 20h00-21h00 21h00-22h15 22h15-24h30
 24h30-01h45 01h45-03h00

3. Até que ponto você depende do despertador para acordar de manhã?

- Nada dependente _____ ()
 Não muito dependente _____ ()
 Razoavelmente dependente _____ ()
 Muito dependente _____ ()

4. Você acha fácil acordar de manhã?

- Nada fácil _____ ()
 Não muito fácil _____ ()
 Razoavelmente fácil _____ ()
 Muito fácil _____ ()

5. Você se sente alerta durante a primeira meia hora depois de acordar?

- Nada alerta _____ ()
 Não muito alerta _____ ()
 Razoavelmente alerta _____ ()
 Muito alerta _____ ()

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

- Muito ruim _____ ()
 Não muito ruim _____ ()
 Razoavelmente bom _____ ()
 Muito bom _____ ()

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

- Muito cansado _____ ()
 Não muito cansado _____ ()
 Razoavelmente em forma _____ ()
 Em plena forma _____ ()

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

- Nunca mais tarde _____ ()
 Menos que uma hora mais tarde _____ ()

Entre uma e duas horas mais tarde _____ ()

Mais do que duas horas mais tarde _____ ()

9. Você decidiu fazer exercícios físicos. Um amigo sugeriu o horário das 07:00 às 08:00 horas da manhã, duas vezes por semana. Considerando apenas seu bem-estar pessoal. O que você acha de fazer exercícios nesse horário?

Estaria em boa 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?

() 20h00-21h00 () 21h00-22h15 () 22h15-00h45

() 00h45-02h00 () 02h00-03h00

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

Das 08:00 às 10:00 horas _____ ()

Das 11:00 às 13:00 horas _____ ()

Das 15:00 às 17:00 horas _____ ()

Das 19:00 às 21:00 horas _____ ()

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

Nada cansado _____ ()

Um pouco cansado _____ ()

Razoavelmente 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 normal, sem sono _____ ()

Acordaria na hora normal, com sono _____ ()

Acordaria na hora normal e dormiria novamente _____ ()

Acordaria mais tarde do que seu costume _____ ()

14. Se você tiver que ficar acordado das 04:00 às 06:00 horas para realizar uma tarefa e não tiver compromissos no dia seguinte, o que você faria?

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

Das 08:00 às 10:00 horas _____ ()
 Das 11:00 às 13:00 horas _____ ()
 Das 15:00 às 17:00 horas _____ ()
 Das 19:00 às 21:00 horas _____ ()

16. Você decidiu fazer exercícios físicos. Um amigo sugeriu o horário das 22:00 às 23:00 horas, duas vezes por semana. Considerando apenas o seu bem-estar pessoal 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 possa escolher o seu próprio horário de trabalho e que você deva trabalhar cinco horas seguidas por dia. Imagine que seja um serviço interessante e que você ganhe por produção. Qual o horário que você escolheria? (Marque a hora de início e a hora do fim)

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

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

() 24h00-05h00 () 10h00-17h00 () 05h00-08h00
 () 17h00-22h00 () 08h00-10h00 () 22h00-24h00

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

Tipo matutino _____ ()
 Mais matutino que vespertino _____ ()
 Mais vespertino que matutino _____ ()
 Tipo vespertino _____ ()

Obrigado pela sua participação

Comentários:

.....

Classificação dos cronotipos de acordo com a pontuação do HO

MATUTINO 70 - 86
 MODERADAMENTE MATUTINO 59 - 69
 INTERMEDIÁRIO 42 - 58
 MODERADAMENTE VESPERTINO 31 - 41
 VESPERTINO 16 - 30