

ANA ALVES BARBOSA

“Análise da distribuição da frequência de polimorfismos em genes relógio, nos grupos étnicos Asiático e Caucasiano que compõem a população brasileira”

Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina, para a obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2010

Barbosa, Ana Alves

Análise da distribuição da frequência de polimorfismos em genes relógio, nos grupos étnicos Asiático e Caucasiano que compõem a população brasileira. / Ana Alves Barbosa. -- São Paulo, 2010.

xii, 52 p.

Tese (Mestrado) - Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Psicobiologia.

Título em inglês: Analysis of the frequency distribution of polymorphisms in clock genes in Asian and Caucasian ethnic groups that make the Brazilian population.

1.Gene PER3. 2.Genes Relógio. 3.Ritmo Circadiano. 4.Asiáticos. 5.Caucasianos. 6.Etnia.

ANA ALVES BARBOSA

“Análise da distribuição da frequência de polimorfismos em genes relógio, nos grupos étnicos Asiático e Caucasiano que compõem a população brasileira”

Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina, para a obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Mário Pedrazzoli, PhD

Co-orientador: Prof. Dr. Sergio Tufik, PhD

São Paulo
2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PSICOBIOLOGIA

Chefe do Departamento de Psicobiologia

Profa. Dra. Maria Lucia Oliveira de Souza Formigoni

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Psicobiologia

Prof. Dr. Marco Túlio de Mello

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PSICOBIOLOGIA

Banca Examinadora:

Prof. Dr. John Fontenele Araújo

Prof. Dr. Fernando Mazzilli Louzada

Prof. Dr. Alexandre Afrânio Peixoto

Suplente:

Prof. Dr. Luiz Silveira Menna Barreto

Aprovada em: 26/05/2010

Dedico esta Tese,
aos meus Pais, Sabino e Aurita, que sempre me incentivaram a estudar;
ao meu marido Ahmad, que sempre me apoiou;
e aos meus filhos Jamile e Samir, que sempre vibraram com meu sucesso.
Vencemos mais uma batalha!

Agradeço em primeiro lugar a Deus por iluminar meus pensamentos.

Agradeço a todas aquelas pessoas que, diretamente ou indiretamente, contribuíram para o sucesso desta tese.

Ao Prof. Dr. Sergio Tufik, que me autorizou a cursar o mestrado, foi meu co-orientador e acreditou em mim.

Ao Prof. Dr. Mário Pedrazzoli, que me deu a oportunidade de trabalhar no seu laboratório e foi o meu orientador.

À Prof^a Dra. Maysa S. Cendoroglo, do Departamento de Geriatria (UNIFESP), pela oportunidade e pela colaboração na coleta das amostras.

Ao Prof. Dr. Fernando A. C. Bignardi, do Centro de Estudos do Envelhecimento (UNIFESP), pela colaboração com as amostras.

À Prof^a Noha El Kadri e demais professores do Colégio Rodrigues Alves pela colaboração com a coleta das amostras.

As minhas amigas, Telma e Martha, que tive a oportunidade de conhecer durante o curso de mestrado, e que se tornaram minhas amigas e confidentes, me ajudando nas horas mais difíceis, estudando, trocando idéias, etc.

Aos meus colegas de curso, Flávia, Bruna, Josy, Fabio, Lhoyane, Dany, Kimura e Renata, pela companhia e pela colaboração nos seminários, e pela ajuda no laboratório.

À Dra. Rosa Castro pela oportunidade e parceria na publicação de um artigo.

A todos os funcionários do laboratório que contribuíram para que este projeto fosse um sucesso.

Às colegas do setor da Pós-Graduação, Nereide e Mara, pela orientação desde o seu início do processo da pós até a sua conclusão.

Aos demais funcionários do Departamento o meu agradecimento pelo suporte em todos estes anos de pós-graduação.

Às minhas colegas biomédicas, Andrea Borges e Andréia Bezerra, pela sua colaboração no meu exame de qualificação.

À minha amiga Penha, ao meu sobrinho Fernando Rooswelt e à minha irmã Maria do Carmo, pelo seu apoio e incentivo para eu fazer o curso de mestrado.

Esta tese foi realizada no Departamento de Psicobiologia da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, com o apoio financeiro da Fundação Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), CEPID, nº 98/14303-3, e da Associação Fundo de Incentivo à Psicofarmacologia (AFIP).

SUMÁRIO

Dedicatória	v
Agradecimentos	vi
Lista das Figuras	x
Lista das Abreviaturas e dos Símbolos	xi
Resumo	xii
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	24
3. MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1 Sujeitos.....	25
3.2 Classificação Étnica.....	25
3.3 Extração do DNA.....	26
3.4 Genotipagem do polimorfismo VNTR no gene PER3.....	26
3.5 Genotipagem do polimorfismo T3111C no gene CLOCK.....	27
3.6 Análise Estatística.....	27
4. RESULTADOS	28
5. DISCUSSÃO	34
6. CONCLUSÕES	40
7. ANEXOS	41
8. REFERÊNCIAS	44

LISTA DE FIGURAS

Figura (1) O mecanismo do relógio biológico molecular.....	9
Figura (2) Esquema representativo da proteína PER3 humana.....	15
Figura (3) Clina de latitude nos genes relógio das Drosófilas.....	17
Figura (4) Mapa das rotas de migrações humanas no passado.....	21
Figura (5) Gel de agarose mostrando o polimorfismo VNTR no gene Per3.....	28
Figura (6) Gráfico e tabela representativos da distribuição genotípica (4/4, 4/5, 5/5) do polimorfismo VNTR no gene Per3.....	30
Figura (7) Gráfico e tabela representativos da frequência alélica do polimorfismo VNTR no gene Per3.....	31
Figura (8) Esquema representativo da Genotipagem pela técnica de discriminação alélica do polimorfismo T3111C no gene Clock.....	32
Figura (9) Gráfico e tabela representativos da distribuição genotípica (TT, TC, CC) do polimorfismo T3111C no gene Clock.....	33
Figura (10) Gráfico e tabela representativos da frequência alélica do polimorfismo T3111C no gene Clock.....	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

SFAVS	Síndrome da Fase Avançada do Sono
SFAS	Síndrome da Fase Atrasada do Sono
NSQ	Núcleo Supraquiasmático
SCN	Sistema Nervoso Central
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
SNP	do inglês <i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
mRNA	Ácido Ribonucléico Mensageiro
PAS	domínio PAS
bHLH	<i>basic-Helix-Loop-Helix</i>
VNTR	do inglês <i>Variable Number Tandem Repeat</i> que significa seqüências repetitivas variáveis
PCR	do inglês <i>Polimerase Chain Reaction</i> que significa Reação da Polimerase em Cadeia
ENU	N-ethyl-N-nitrosourea
χ^2	Chi-quadrado
UNIFESP	Universidade Federal de São Paulo
CEP	Conselho de Ética em Pesquisa

RESUMO

Os genes *PER3* e *CLOCK* são importantes componentes do sistema molecular circadiano dos mamíferos. Vários estudos têm demonstrado existir uma associação entre polimorfismos nestes genes relógio e fenótipos circadianos nas diferentes populações. No entanto, as diferenças no padrão da frequência alélica e a distribuição genotípica, são sistematicamente observadas nos estudos com diferentes grupos étnicos. Para investigar e comparar o padrão de distribuição em uma amostra de populações asiáticas e caucasianas que vivem no Brasil, utilizando a técnica de PCR, avaliou-se dois polimorfismos bem estudados nos genes relógio: o (VNTR) no gene *PER3*, um polimorfismo de número variável de repetições em tandem; e um polimorfismo com troca de um único nucleotídeo (SNP) no gene *CLOCK*. O objetivo deste estudo foi, nos humanos, procurar pistas sobre os processos evolutivos relacionados aos ritmos circadianos, tendo sido selecionados 109 descendentes de asiáticos e 135 de caucasianos. As frequências do alelo curto (4 repetições) no gene *PER3* e do alelo T no gene *CLOCK* (respectivamente 0,86 e 0,84) entre os asiáticos foram significativamente maiores do que entre os caucasianos (respectivamente 0,69 e 0,71). Os resultados confirmaram diretamente a distribuição diferente destes polimorfismos entre os grupos étnicos caucasianos e asiáticos. Dadas as diferenças genéticas observadas entre os grupos, tornou-se evidente que, primeiro, as variações étnicas poderiam ter implicações para a interpretação dos resultados em estudos de associação do ritmo circadiano e, segundo, questiona quais foram as condições evolutivas que moldaram essas variações genéticas observadas nos genes relógio.

1. INTRODUÇÃO

A organização temporal de um ser vivo se expressa de duas formas: como reação aos estímulos ambientais e como ritmicidade intrínseca. A ritmicidade manifesta-se em períodos que vão de milissegundos até anos, os quais são chamados de ritmos. Estes podem ser circadianos, infradianos ou ultradianos. Os infradianos são os de baixa frequência, com períodos maiores que 28 horas como, por exemplo, o ciclo estral dos roedores ou o ciclo menstrual nos humanos. Os ultradianos são oscilações com períodos menores que 20 horas, podendo ser extremamente rápidos como, por exemplo, o batimento cardíaco, o disparo dos neurônios e a respiração.

Os ritmos circadianos são oscilações de aproximadamente 24 horas, e são parte integrante da regulação de muitos processos fisiológicos no organismo como o ciclo sono-vigília, a temperatura corporal, processos bioquímicos, o comportamento em relação aos horários de alimentação, secreção de hormônios, metabolismo de drogas e xenobióticos, a homeostase da glicose e a progressão do ciclo celular (Marques & Menna-Barreto, 2003).

A ritmicidade circadiana é endógena e pode ser observada tanto nos procariotos como nos eucariotos. Os animais, inclusive os humanos, isolados e sem a indicação de pistas temporais continuam a expressar ritmicidade, porém com modificações no período (Marques & Menna-Barreto, 2003). Nos humanos, quando os ciclos circadianos são perturbados, seja pelos fatores genéticos ou pelos ambientais, podem ocorrer desordens em diversos processos fisiológicos como, por exemplo, as síndromes nas quais se observa um avanço (SFAVS) ou um atraso (SFAS) da fase do sono. Além das síndromes, fatores ambientais, como a rápida mudança de fuso horário (Jet-lag) em viagens transmeridionais, também provocam perturbações nos ritmos circadianos

(Takahashi et al., 2008).

Desde os mais remotos tempos, os organismos vivos convivem com processos ritmicos no ambiente. Em função da organização de nosso sistema solar, a Terra é submetida à interação de forças de atração entre os diferentes planetas e os corpos celestes. As interações da Terra com o Sol e a Lua, aliadas à inclinação natural do seu eixo em relação ao Sol, resultam nos ciclos associados ao dia e à noite, com as estações do ano, as fases da Lua e a oscilação das marés.

Relacionada à observação destes ciclos geofísicos, o adequado funcionamento do sistema de temporização biológico permite uma sincronização e, portanto, a harmonização com os ciclos ambientais, proporcionando uma capacidade antecipatória para o organismo. Esta antecipação implica na organização e na disponibilização de recursos, com a finalidade do organismo se preparar para os eventos e as atividades necessárias para a manutenção da vida. A repetição e a alternância dos eventos na natureza de forma organizada contribui para que, os animais e as plantas, mudem conforme o clima, a hora do dia e as estações do ano.

Esta interação rítmica entre os organismos e o meio externo ocorre por meio dos “relógios biológicos”. O conceito de relógios biológicos implica em um sistema de temporização, auto sustentado e continuamente oscilante, ou seja, tem a capacidade de gerar oscilação, mesmo na ausência de pistas ambientais, e é composto por diversas estruturas e órgãos anatomicamente definidas. Em mamíferos pode-se dizer que o oscilador mestre, que recebe a informação luminosa do claro/escuro ambiental, se localiza no núcleo supraquiasmático (NSQ), que é um par de conglomerados celulares que se localiza no hipotálamo (Moore et al., 2002). O oscilador mestre é um dos grandes responsáveis pelo ritmo circadiano do ciclo sono-vigília, além de controlar

outros ritmos como o da temperatura corporal, o da atividade/repouso e o de níveis hormonais, através de projeções nervosas para outros núcleos do hipotálamo e outras regiões do cérebro (Aston-Jones et al., 2001).

O relógio circadiano do NSQ pode funcionar de forma autônoma sem a necessidade de algum estímulo externo, mas pode ser reajustado em função das condições externas, em particular o ciclo claro-escuro, o mais importante *Zeitgeber* para a espécie humana (Roenneberg et al., 2007). *Zeitgeber* é uma palavra alemã que significa doador de tempo, que pode ser definida como as oscilações que ocorrem nos ciclos ambientais capazes de sincronizar os organismos como, por exemplo, o ciclo claro-escuro (Marques & Menna-Barreto, 2003).

A informação luminosa entra pela retina e, através do trato retino-hipotalâmico, chega até ao NSQ. A resposta à entrada da energia luminosa na retina implica na expressão de vários genes (Rusak et al., 1990), entre os quais alguns identificados em várias espécies, incluindo a humana. Estes genes são essenciais para o processo da manutenção e do arrastamento dos ritmos circadianos, e são denominados de “genes relógio” (Bjarnason et al., 2001; Takahashi et al., 2008), sendo amplamente expressos no Sistema Nervoso Central (SCN), e também em diversos outros tecidos do corpo como tecido-específico. Embora o NSQ atue como o relógio central em mamíferos, quando se considera a informação temporal dada pelo ciclo claro/escuro, muitas outras regiões do cérebro e alguns tecidos não neuronais mostram ritmos circadianos que podem ser independentes do NSQ. Apesar de cada célula possuir o seu próprio relógio biológico, este é sincronizado especialmente pelo sistema de temporização, no qual o NSQ tem um papel importante como o oscilador mestre que tem posição única como o transdutor da informação luminosa ambiental (Barnard & Nolan, 2008; Bjarnason et al.,

2001; Boivin et al., 2003; Cermakian & Boivin, 2003; Duffield, 2003; Liu et al., 1997; Lowrey & Takahashi, 2000; Shearman et al., 2000; Zylka et al., 1998).

As primeiras evidências de que o ritmo circadiano poderia ser regulado, geneticamente, foram mostradas por Konopka e Benzer (1971) nos seus estudos com as moscas drosófilas, e por Feldman e cols. (1973) com o *Neurospora Crassa*.

Konopka e Benzer (1971) observaram que em algumas drosófilas mutantes a ritmicidade circadiana estava alterada. Quando estas moscas eram submetidas ao ambiente sem a presença de pistas temporais, ou seja, colocadas em livre-curso, foram observadas três linhagens mutantes distintas para o fenótipo do ritmo circadiano de atividade locomotora. Um fenótipo era arritmico, um outro com período circadiano endógeno curto (19h) e um terceiro com período longo (28h). Konopka e Benzer batizaram o *locus* gênico responsável por estas alterações de *period*, tendo sido estas descobertas o indicativo de que alterações no DNA poderiam causar alterações na marcação do tempo biológico.

No estudo feito por Feldman e cols., em 1973, os pesquisadores induziram mutações no *Neurospora Crassa* e observaram que, nas cepas mutantes houve alterações na ritmicidade circadiana. Tais cepas foram denominadas de “*frequency 1,2,3*”. Em escuro constante e a 25 C^o, a cepa selvagem teve a duração do período para a formação de esporos de 24,0 +/- 0,4 horas, quando submetida às mesmas condições a cepa mutante *frequency-1* teve a duração do período para a formação de esporos de 16,5 +/- 0,5 horas, a *frequency-2* de 19,3 +/- 0,4 horas e a *frequency-3* de 21,6 +/- 0,5. Os resultados obtidos indicaram que mutações poderiam afetar o mecanismo básico de marcação do tempo neste fungo.

Em 1988, Ralph e Menaker publicaram o primeiro estudo sobre a regulação

genética da ritmicidade circadiana em mamíferos. Realizando experimentos, com hamsters, no seu laboratório, os pesquisadores observaram que um dos animais apresentou uma ritmicidade circadiana diferente da dos outros. Quando este animal foi colocado em livre-curso teve um período endógeno curto de atividade locomotora, e uma sincronização anormal ao ciclo claro/escuro de 24 horas. Após sucessivos cruzamentos, os pesquisadores selecionaram da prole resultante três fenótipos diferentes, cujo período endógeno variou, tendo os tempos médios observados sido de 20, 22 e 24,1 horas. Inicialmente, os autores denominaram esta mutação de mutação tau, numa referência ao termo tau que, em cronobiologia, é utilizado quando se refere ao período circadiano endógeno (Tau). A mutação foi caracterizada como uma mutação que encurta o período circadiano endógeno (Ralph & Menaker, 1988). Doze anos depois, em 2000, Lowrey e os seus colegas, em estudos com camundongos, mostraram que a mutação descrita por Ralph em 1988 estava localizada no gene da Caseína kinase1 épsilon (*CK1 ϵ*), uma importante enzima envolvida na fosforilação das proteínas do relógio.

Os estudos de Ralph e Menaker (1988) estimularam as investigações moleculares sobre a ritmicidade circadiana dos mamíferos, as quais se desenvolveram de forma bastante rápida a partir de então e, deste modo, contribuíram para a identificação de importantes genes participantes do sistema de temporização circadiana.

Em 1994, Vitaterna e cols. publicaram um importante estudo relatando, pela primeira vez, a participação de um gene no sistema de temporização de mamíferos, num experimento especialmente desenhado para este fim. Utilizando-se agentes mutagênicos como o N-ethyl-N-nitrosourea (ENU), foram induzidas mutações em

camundongos, as quais resultaram em alterações na duração do seu período endógeno e na perda da sua ritmicidade circadiana. Os animais heterozigotos mutantes foram então cruzados e, na geração F₂, se produziram três genótipos diferentes, indicando que a mutação estava localizada em um único gene e que este, em mamíferos, poderia ser o responsável por regular o comportamento circadiano de atividade/repouso. Este gene foi denominado de gene *Clock* (do inglês, *Circadian Locomotor Output Cycle Kaput*), sendo que nos camundongos se localiza no cromossomo 5, mas nos humanos no 4 (Vitaterna et al., 1994).

Posteriormente, outros estudos abordando os genes relógio surgiram, e novos genes foram descobertos e caracterizados como componentes deste complexo sistema de temporização dos mamíferos, o qual participa efetivamente da regulação dos ritmos circadianos (Pereira et al., 2009).

Na década de noventa do século XX, houve uma intensa busca do entendimento sobre o mecanismo molecular do funcionamento da oscilação circadiana, o que resultou na descrição de vários genes participantes. Em 1996, os genes *Cry1* e *Cry2* receptores de luz azul em plantas, foram clonados no genoma humano (Hsu et al., 1996). Em 1997, Tei e cols. reportaram a presença do gene *Per1* nos camundongos e nos humanos (Tei et al., 1997). No ano seguinte, Takumi e cols. (1998) mostraram a existência de mais um gene da família *Period* nos mamíferos, o gene *Per2*. Enquanto as drosófilas tem somente um gene *Per*, como descrito inicialmente por Konopka em 1971, os mamíferos possuem três parálogos, descoberta que ocorreu no mesmo ano da publicação da descoberta do gene *Per2*. O terceiro gene pertencente à família *Period* foi clonado e caracterizado como um gene relógio em mamíferos, é conhecido como *Period 3*, e parece desempenhar um papel bastante relevante na ritmicidade

circadiana (Takahashi et al., 2008; Takumi et al., 1998; Zylka et al., 1998). Ainda no ano de 1998, Zylka e cols. Identificaram mais um gene nos mamíferos o qual se denomina gene *Tim*.

O gene *Bmal1*, também descoberto nessa mesma época (Ikeda & Nomura, 1997), é um importante parceiro do gene *Clock*. Em 1998 foi demonstrado que as proteínas CLOCK e BMAL se heterodimerizavam e formavam um complexo responsável por ativar a transcrição dos genes *Per1*, *Per2*, *Per3*, *Cry1* e *Cry2*. (Bunger et al., 2000; Gekakis et al., 1998). Nos camundongos, Bunger e cols. (2000) demonstraram que, a perda do domínio PAS no gene *Bmal1*, resultava em uma imediata e completa perda da ritmicidade circadiana em escuro constante, e a atividade locomotora no ciclo claro-escuro era prejudicada em condições normais de luminosidade.

Os genes acima descritos possuem muitas características em comum, o que permite caracterizá-los como “genes relógio”. Uma das principais características é que, com a exceção do gene *Clock*, estes genes possuem um perfil notório de oscilação no NSQ, o qual dura aproximadamente 24 horas. Além do mais, todos eles codificam proteínas que possuem o domínio PAS (Per-Arnt-Sim), um domínio proteico que permite a dimerização proteína-proteína. A presença do domínio PAS, nos mais importantes genes relógio, sugere que o mecanismo de interação proteica é essencial para o funcionamento do relógio circadiano. Além deste domínio, os genes *Clock* e *Bmal1* também possuem um domínio adicional, o (bHLH) *basic-helix-loop-helix*, pelo qual estes genes podem se ligar à molécula de DNA (Shearman et al., 1999).

Lowrey e cols. (2000) propuseram um mecanismo de funcionamento do relógio molecular nos mamíferos, em que os genes *Clock*, *Bmal1*, *Per1*, *Per2*, *Per3*, *Tim*, *Cry1* e *Cry2*, interagem em uma alça de retroalimentação de transcrição e tradução, a qual

dura aproximadamente 24 horas, que pela via negativa reprimem a transcrição dos próprios genes.

De uma forma mais detalhada, pode-se descrever a participação destes genes nas alças regulatórias da seguinte forma: o fator de transcrição CLOCK (ou NPAS2) se dimeriza com a proteína BMAL1 e forma o heterodímero CLOCK-BMAL1. Este complexo tem a capacidade de se ligar ao DNA e age como um fator de transcrição dos genes *Per1, Per2, Per3, Cry1, Cry2*, resultando em altos níveis destes transcritos. No citoplasma as proteínas sintetizadas PER e CRY dimerizam-se e, ao atingir determinados níveis, deslocam-se para o núcleo e interagem com o complexo CLOCK-BMAL1, reprimindo a transcrição de seus próprios genes, formando assim uma alça de retroalimentação negativa. Quando o complexo repressor PER-CRY é degradado, o complexo CLOCK-BMAL1 é liberado para ativar um novo ciclo de transcrição. Essa alça autoregulatória de transcrição-tradução-inibição dura aproximadamente 24 horas (Figura 1).

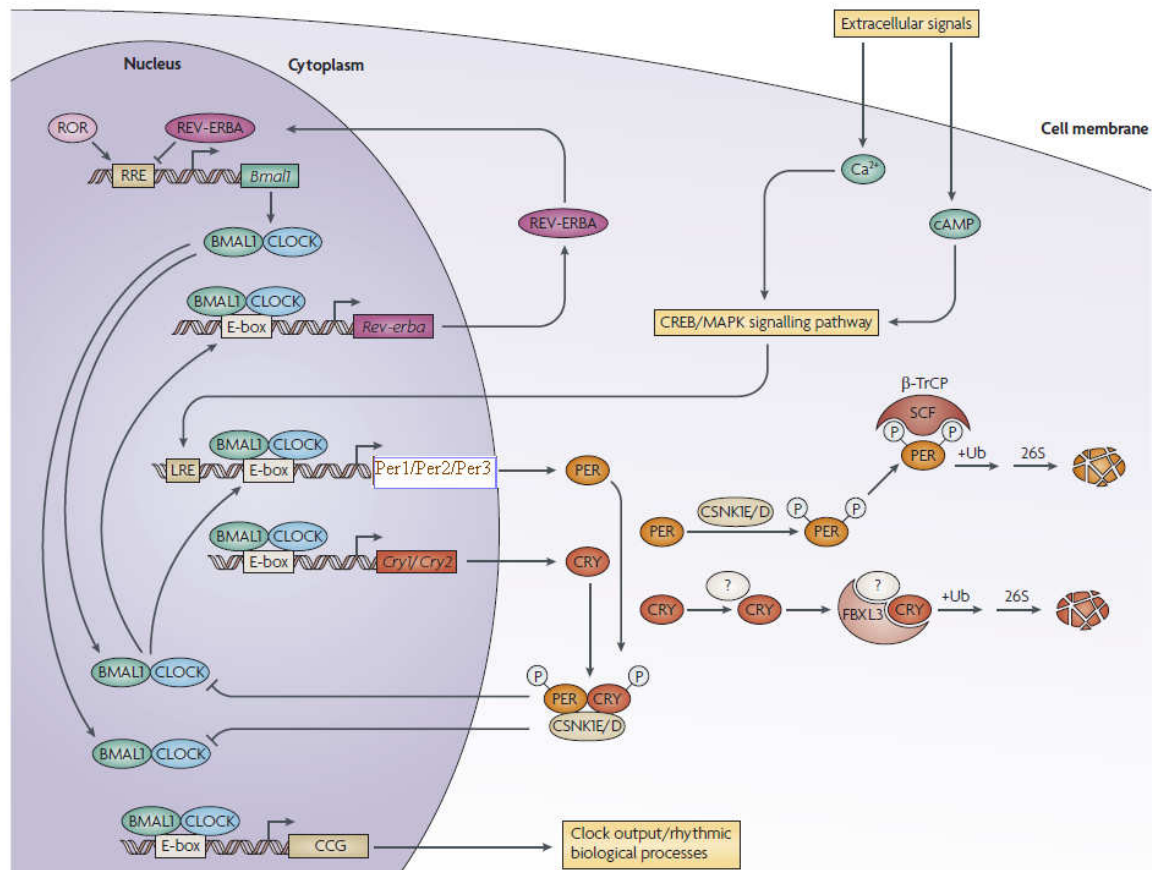


Figura (1) O mecanismo do relógio biológico molecular consiste em um conjunto de genes relógio composto por alças de transcrição e tradução. Nos mamíferos o relógio biológico molecular é formado por um circuito primário de retroalimentação negativa que inclui os genes *Clock*, *Bmal1*, (e a proteína PAS), homólogo *Per1*, *Per2*, *cryptochromo* *Cry1* e *Cry2*. Nas proteínas CLOCK e BMAL1 estão os domínios PAS e o domínio helix-loop-helix que contém os fatores os quais ativam a transcrição dos genes *Per* e *Cry*. As proteínas resultantes, PER e CRY, se heterodimerizam, se translocam para o núcleo e interagem com o complexo CLOCK-BMAL1, inibindo a transcrição dos seus próprios genes. Após um período de tempo, o complexo repressor PER-CRY é degradado, e o complexo CLOCK-BMAL1 pode então ativar um novo ciclo de transcrição.

A alça de retroalimentação auto-regulatória secundária é composta pelo gene *Rev-erba*, o qual tem como alvo direto o complexo ativador de transcrição CLOCK-BMAL1. A proteína REV-ERBA reprime a transcrição do gene *Bmal1*, e compete com ROR (retinoic acid-related orphan receptor) para se ligar aos elementos de resposta (RREs) na região promotora do gene *Bmal1*. Além disto, ativadores e repressores de transcrição, modificação pós-tradução e degradação de proteínas do relógio molecular são passos cruciais para determinar a periodicidade circadiana. As enzimas Caseína Kinase1 δ (CSNK1D) e ϵ (CSNK1E) fosforilam as proteínas PER e CRY. Um dos papéis da fosforilação é, direcionar as proteínas do relógio molecular para a poliubiquitinação e a degradação pela via proteossômica 26S. Os complexos ligase ubiquitina β -TrCP1 e FBXL3 E3 estão respectivamente envolvidos no direcionamento para, degradação das proteínas PER e CRY. As siglas a seguir estão descritas entre parênteses. CCG (genes controladores do relógio); CREB (cAMP elemento de ligação resposta); E-box (seqüência consenso CACGTG/T); MAPK (proteína quinase ativadora de mitogênese); SCF, SCF (E3 ubiquitina ligase); Ub (ubiquitina) (Figura e texto adaptado da revisão: Takahashi 2008).

Além da alça primária existem outras alças secundárias que funcionam como auxiliares. Recentemente foram descobertos novos genes compondo estas alças, os quais estão envolvidos na ritmicidade circadiana, são eles, o *Dec1*, o *Dec2*, o *Rora* e o *Rev-erba* (Honma et al., 2002; Preitner et al., 2002; Sato et al., 2004; Takahashi et al., 2008). O relógio é estabilizado por dois receptores nucleares orfãos, o gene *Rev-erba*, descrito como o mais importante regulador negativo na transcrição do gene *Bmal1*, e o gene *Rora*, identificado como um ativador da transcrição do gene *Bmal1* dentro do Sistema Nervoso Central, os quais exercem função oposta sobre a expressão do gene *Bmal1* (Preitner et al., 2002). Estes genes são importantes na expressão do gene *Bmal1* e na consolidação da atividade locomotora diária (Sato et al., 2004).

Os genes *Dec1* e *Dec2* formam a quinta família dos genes relógio e são reguladores do relógio molecular. Nos camundongos, eles agem como fatores de transcrição basic-loop-helix que reprimem a indução da ativação do gene *Per1* pelo heterodímero CLOCK/BMAL1, por meio da direta interação proteína-proteína com o BMAL1 e/ou competição pelos elementos E-box (Honma et al., 2002).

A expressão dos genes *Per1*, *Cry* e *Bmal1*, é ritmica, ocorrendo variação dos níveis de mRNA ao longo das 24h do dia. Já o *Clock* não é rítmico e o seu nível de mRNA permanece estável (Bjarnason et al., 2001; Shearman et al., 1999). Uma vez que estes genes são parte importante na maquinaria dos relógios circadianos celulares, o mau funcionamento de alguns deles contribui para prejuízo nos ajustes necessários do relógio (Pereira et al., 2009), levando a um avanço ou a um atraso no tempo biológico. Alterações no comportamento da ritmicidade são observadas nos mais diferentes organismos, desde os unicelulares até aos humanos. Existem diversos relatos na literatura mencionando que mutações nos genes relógio, tanto em humanos como em

animais de experimentação, podem causar uma regulação circadiana alterada, exibindo fenótipos dos mais variados, desde períodos endógenos mais curtos ou mais longos até a perda total da ritmicidade (Archer et al., 2003; Ebisawa et al., 2001; Lowrey et al., 2000; Preitner et al., 2002; Ralph & Menaker, 1988; Shearman & Weaver, 1999; Vitaterna et al., 1994).

Conceitualmente, o termo mutação pode ser explicado como sendo o processo pelo qual os genes mudam de uma forma alélica para outra, portanto, os genes sofrem mudanças na sua sequência de bases ao passar de uma geração para outra. As mutações podem ser detectadas tanto no nível do DNA quanto no fenotípico, porém não obrigatoriamente uma mutação leva a uma alteração fenotípica (Beiguelman, 2008; Ridley, 2006).

Uma mutação gênica ou mutação pontual ocorre quando há mudanças no alelo de um gene, alterando-o para outro diferente. A mudança ocorre dentro de um único gene e está em um loco cromossômico (“ponto”), no qual uma base (púrica ou pirimídica) é trocada por outra na sequência do DNA. O efeito de uma mutação pontual depende do tipo de troca da base. Existem as mutações sinônimas ou silenciosas, nas quais há uma mudança da base nitrogenada no nucleotídeo, porém não há mudança de aminoácido codificado e não há efeito sobre a sequência da proteína. Também existem as mutações pontuais não-sinônimas ou significativas, que são as em que ocorre a alteração do aminoácido codificado. Este último tipo de mutação tem maior potencial para causar efeito sobre a função da proteína. Além das mudanças de uma única base, existem também as mudanças de segmentos nos nucleotídeos, um exemplo é o VNTR (*Variable Number Tandem Repeat*), que é uma sequência de bases que se repete no gene. As inserções ou as deleções são a adição

ou a remoção de um ou mais pares de nucleotídeos. Quando estas ocorrem dentro de seqüências que codificam proteínas, pode haver mudanças na matriz de leitura do gene. O códon de iniciação no mRNA marca o filamento de leitura. Após o códon de iniciação, outros são lidos como grupos sucessivos não superpostos de três nucleotídeos. A adição ou a deleção de um nucleotídeo, em geral, muda a matriz de leitura, alterando todos os aminoácidos codificados por códons após a mutação, o que pode causar efeitos drásticos sobre o fenótipo. Em nível diferente ocorre a mutação cromossômica, quando segmentos de cromossomos, cromossomos inteiros ou até mesmo grupos inteiros de cromossomos se alteram (Beiguelman, 2008; Griffiths et al., 1996; Ridley, 2006).

Existem relatos que, nos roedores, mutações nos genes relógio estão associadas ao ritmo circadiano da atividade locomotora alterada (Ralph & Menaker, 1988). Em alguns casos, a mutação ou a deleção de um gene relógio conduz a um período em livre-curso, menor ou maior, do que o observado nos animais controles (Lowrey et al., 2000; Preitner et al., 2002; Shearman & Weaver, 1999; Vitaterna et al., 1994). Em outros casos, a mutação conduz para a completa arritmia quando os animais são mantidos no escuro constante. Isto é observado tanto em ratos knock-out *Bmal1* (Bunger et al., 2000) quanto em duplos mutantes *Per1/Per2* e *Cry1/Cry2* (Bae et al., 2001). Como mutações em camundongos têm profundos efeitos na ritmicidade circadiana, (Barnard & Nolan, 2008), espera-se que, nos humanos, mutações nos genes relógio também possam dar origem a perturbações do ritmo circadiano. Várias síndromes têm sido descritas e, em alguns casos, demonstrado que há uma ligação com polimorfismos nos genes relógio (Toh et al., 2001; Xu et al., 2005).

Alguns estudos mostram que, nos humanos, variações funcionais como mutações e polimorfismos nos genes relógio estão associadas aos fenótipos circadianos, em especial, a preferência diurna (“matutividade e vespertividade”) e as síndromes que causam alteração na fase do sono, além de distúrbios de humor. Num estudo de Ebisawa e cols. (2001) foi observada uma associação de um haplotipo no gene *PER3* com a SFAS. Nos humanos, um polimorfismo pertencente a este haplotipo, o VNTR no éxon 18, foi associado a alterações na estrutura do sono e ao desempenho de um modo geral (Viola et al., 2007). Carpen e cols. (2006) associaram o polimorfismo T2434C no gene *PER1* à preferência diurna extrema (SFAS). Toh e cols. (2001) nos seus estudos, relataram haver uma associação de polimorfismos com fenótipos circadianos em mais um gene pertencente à família Period, o gene *PER2*, o qual foi associado com a síndrome da fase avançada do sono (SFAVS). Katzenberg e cols. (1998) relataram uma associação do polimorfismo T3111C no gene *CLOCK* com a vespertividade. O mesmo polimorfismo, estudado por Katzenberg, foi associado à desordem bipolar I e à esquizofrenia por outros autores (Mansour et al., 2006; Takao et al., 2007). Takano e cols. (2004) associaram o polimorfismo S408N na enzima Caseína Kinase I Epsilon (*CKIε*) aos distúrbios do ritmo circadiano do sono. Em um outro estudo, Xu e cols. (2005) descreveram que a mutação T44A no gene Caseína Kinase I Epsilon (*CKIε*) estava associada à síndrome da fase avançada do sono (SFAVS). A enzima Caseína Kinase I Épsilon tem a importante função de fosforilar as proteínas do relógio molecular, desempenhando um papel central na ritmicidade circadiana.

Ao longo de vários anos de pesquisa sobre os genes relógio, têm sido publicados diversos estudos, realizados em diferentes laboratórios, utilizando como amostras os mais variados grupos étnicos. Todavia, além do objetivo principal dos estudos, um dado

relevante chama atenção, pois observam-se diferenças significativas nas frequências genéticas que, por sua vez, geram dados conflitantes de associação com os fenótipos circadianos nos asiáticos e nos caucasianos. Por exemplo, um locus polimórfico em um grupo étnico tem sido reportado como sendo não polimórfico ou como tendo uma frequência alélica muito diferente em um outro (Castro et al., 2008; Hohjoh et al., 2003; Pereira et al., 2005; Takano et al., 2004).

Um típico exemplo destas diferenças entre os caucasianos e os asiáticos é o polimorfismo T3111C do gene circadiano *CLOCK*. No presente estudo, ao se analisar as frequências alélicas, mencionadas em cinco estudos publicados que foram realizados em diferentes laboratórios, observou-se que as frequências eram similares intra grupo, tanto nos caucasianos como nos asiáticos, porém diferentes entre os grupos (Katzenberg et al., 1998; Mishima et al., 2005; Pedrazzoli et al., 2007; Robilliard et al., 2002; Takao et al., 2007). Takano e cols. (2004), utilizando uma amostra da população japonesa, descreveram uma associação do polimorfismo S408N no gene *CKIε* com a SFAS, mas este polimorfismo praticamente não foi observado em uma amostra brasileira predominantemente caucasiana (Castro et al., 2008). Mais especificamente, enquanto Takano e cols. (2004) observaram uma frequência de 0.12 para o polimorfismo N408 na população japonesa, Castro e cols. (2008) notaram que, na população brasileira, a frequência era de 0.007, mostrando que este polimorfismo é muito raro nesta população.

Outro importante gene é o *PER3*, o qual pertence à família Period e desempenha um papel central na maquinaria molecular do relógio biológico (Zylka et al., 1998). Repetidamente, têm sido reportados polimorfismos neste gene, associados aos fenótipos circadianos e à SFAS (Archer et al., 2003; Ebisawa et al., 2001; Jones et al.,

2007; Pereira et al., 2005). A região codificadora do gene *PER3* contém um VNTR no éxon 18, com quatro ou cinco cópias de 54 pares de base (pb), (figura 2), o qual foi associado a fenótipos circadianos (Archer et al., 2003; Ebisawa et al., 2001), além de outras desordens como o câncer da mama (Chen et al., 2005; Zhu et al., 2005) e a dependência da heroína (Zou et al., 2008).

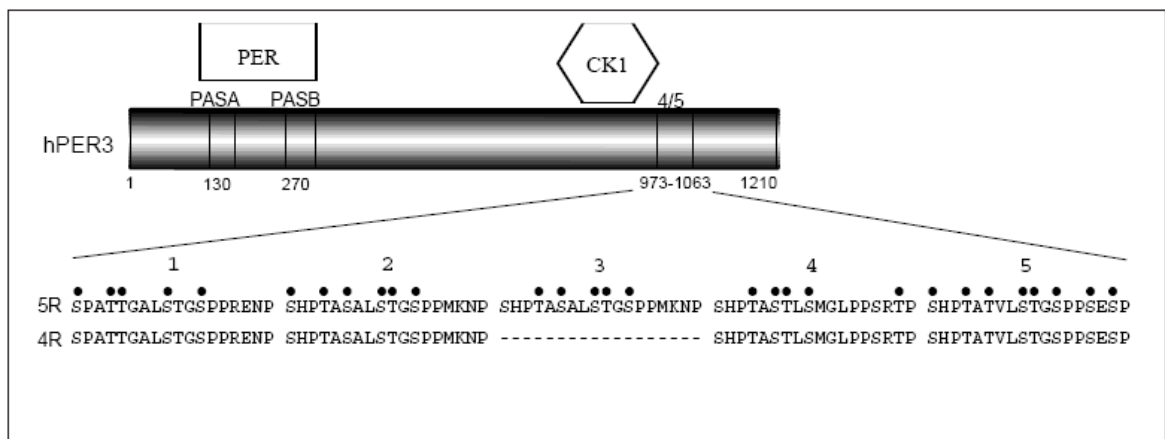


Figura (2). Esquema representativo da proteína PER3 humana. Nos domínios PAS A e B se ligam outras moléculas PER. A seqüência de aminoácidos da região com 4 ou 5 repetições esta expandida na parte de baixo da figura. As repetições estão numeradas de 1 a 5. Na primeira linha consta a seqüência com 5 repetições, e na segunda linha a de 4 repetições, a seqüência faltante é representada por traços. Figura extraída do artigo Archer, 2003.

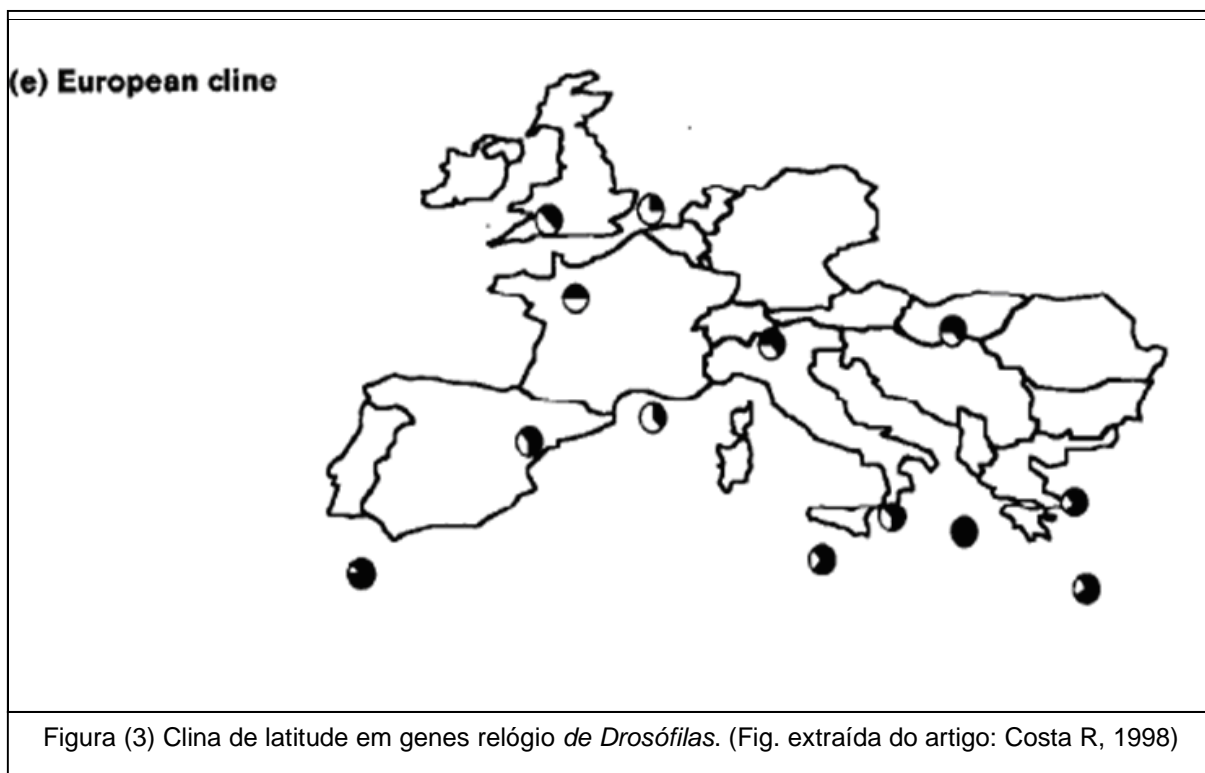
Há relatos de muitos estudos associando o polimorfismo VNTR no gene *PER3* aos mais variados fenótipos, mas, assim como no gene *CLOCK*, quando se compara as freqüências gênicas das diferentes etnias, observam-se grandes diferenças tanto na freqüência alélica quanto na genotípica. Os estudos de Archer e cols. (2003) e Pereira e cols. (2005) são um exemplo clássico para caracterizar tal diversidade genética no gene *PER3*. No estudo de Archer e cols. (2003), o alelo de cinco repetições foi associado à matutuidade e o de quatro à vespertuidade e à SFAS. Todavia, no trabalho de Pereira e cols. (2005), uma inversão nos resultados chamou atenção, pois ao contrário do observado no estudo de Archer, o alelo de cinco repetições foi

associado à SFAS, um cronotipo extremo da vespertinidade. Além destes dois estudos, outras associações deste polimorfismo também mostraram que havia discrepância nas frequências. No trabalho de Zou e cols. (2008), realizado com uma amostra asiática, a frequência do alelo de quatro repetições foi significativamente maior do que a observada nos trabalhos realizados com populações caucasianas como, por exemplo, o estudo de Jones e cols. (2007).

Outros estudos com genes relacionados à ritmicidade circadiana também mostraram diferenças nas frequências gênicas. Um estudo feito por Hohjoh e cols. (2003), com uma amostra de asiáticos, mostrou uma associação do polimorfismo G619A no gene *AA-NAT*, um importante gene na via da síntese da melatonina, com a SFAS. Todavia, este polimorfismo estava quase ausente numa amostra com caucasianos (Pereira et al., 2007).

Uma explicação possível para estas diferenças nas frequências alélicas nestes genes, nas diferentes etnias, é a adaptação daquelas populações a diferentes pistas temporais ambientais e, como consequência, a seleção de variantes gênicas têm sido descritas. Nas *Drosófilas melanogaster* associações entre variantes gênicas e condições ambientais como luminosidade e temperatura. Sawyer e cols. (2006) relataram haver um padrão de distribuição do polimorfismo de repetição Thr-Gly no gene *Per* nas drosófilas, o qual é peculiar às diferentes regiões continentais, tendo sugerido que estas variações seguiam um clina latitudinal, tanto nas amostras da Europa e da África como da Austrália. Além disto, o estudo sugeriu que a seleção térmica talvez tivesse contribuído para moldar os padrões continentais da variabilidade do polimorfismo Thr-Gly no gene *Per2*, o que explicaria como a repetição surgiu nos antepassados dos subgrupos de espécies da *D. melanogaster*, submetidas à pressão

seletiva, inerente às diferentes condições ambientais. Em outro estudo (Costa et al., 1992) descreveram a análise geográfica deste polimorfismo na Europa e norte da África, tendo relatado que um padrão clinal bem definido, é observado ao longo do eixo norte-sul (Figura 3).



Os genes relógio são parte importante no processo do arrastamento dos ritmos circadianos para a sincronização às condições ambientais do ciclo claro/escuro, os quais por si só, variam muito durante o ano de uma maneira dependente da latitude. Portanto, é sugestivo que as variações nos genes relógio presentes nas diferentes populações refletiriam forças seletivas atuando sobre as populações que vivem em diferentes condições de luminosidade e, desta forma, contribuíram para a adaptação regional e a evolução da espécie humana.

O conceito de evolução pode ser definido como a alteração das freqüências dos alelos pertencentes ao conjunto gênico da população estudada, ou seja, a descendência com modificações ou alterações adaptativas da forma, da fisiologia e do comportamento dos organismos ao longo de muitas gerações. Apesar da evolução afetar os indivíduos, não são eles quem evolue, mas a população como um todo (Beiguelman, 2008; Ridley, 2006).

A evolução de uma espécie está relacionada às mutações que ocorrem no DNA no momento da reprodução celular. Estas mutações podem ser espontâneas ou induzidas e ocorrer em qualquer célula, mas as mais importantes, para a teoria da evolução, são as que se verificam na produção dos gametas e são passadas para a prole, podendo provocar alterações fenotípicas, gerando indivíduos que, eventualmente, diferem dos seus progenitores. Tais alterações, em grande parte, são provedoras da variabilidade genética que é submetida à seleção natural. O conceito de seleção natural, segundo a definição de Darwin (1859), é a preservação das variações favoráveis e a supressão das prejudiciais. Atualmente, pode-se definir como seleção natural o processo pelo qual as formas dos organismos de uma população, que estão mais bem adaptados ao ambiente, aumentam em freqüência, ao longo de uma série de gerações, relativamente às formas menos adaptadas (Beiguelman, 2008; Ridley, 2006).

Além da seleção natural existem outros fatores evolutivos, como o fluxo gênico das populações migrantes e a deriva genética, que são capazes de alterar as freqüências gênicas. Também existem fatores que causam o aumento da homozigose como, por exemplo, o endocruzamento que, na espécie humana, é chamado de casamento consanguíneo.

A subdivisão da população em isolados pode contribuir para haver diferenças nas freqüências gênicas. Os efeitos genéticos resultantes do isolamento dependem da quantidade de indivíduos na população isolada. Nos grupos pequenos, o isolamento tem efeitos evolutivos porque tais grupamentos não conseguem, segundo a lei de Hardy e Weinberg, manter um equilíbrio estável da distribuição genotípica, mesmo quando há ausência de migração, de mutação, de seleção ou de panmixia. Neste caso, um gene com alto valor adaptativo pode desaparecer, ao passo que um outro com baixo valor pode se fixar. Estas mudanças aleatórias nas freqüências gênicas entre as gerações chamam-se deriva genética (Beiguelman, 2008).

As migrações propiciam o fluxo gênico e têm efeito evolutivo, pois são capazes de promover alterações nas freqüências gênicas, tanto nas populações da qual originam os imigrantes, quanto naquelas que os recebem. Além disto, nos pequenos isolados genéticos também pode ocorrer outro fenômeno denominado de efeito fundador (Beiguelman, 2008), o qual pode ser definido como o estabelecimento de uma nova população por uns poucos fundadores originais, que contêm somente uma pequena fração da variação genética total da população parenteral. Um único indivíduo, altamente fecundo ou com descendentes muito fecundos, provoca a predominância de um ou mais genes nos seus descendentes, mesmo que um desses genes confira baixo valor adaptativo aos seus portadores (Ridley, 2006).

A origem do *Homo sapiens* ainda é motivo de grande especulação. Na literatura especializada há relatos de que a espécie humana apareceu no planeta, especificamente na África, por volta de 150 mil anos antes do presente e de lá se espalhou pelo globo (Hubbe et al., 2003).

Desde o surgimento da espécie humana na África, diferentes populações, isoladas geograficamente umas das outras, foram expostas a inúmeros agentes ambientais, os quais agiram como fatores de pressão seletiva natural, propiciando o estabelecimento da diversidade genética (Handley et al., 2007).

A variação genética humana é muito influenciada pela geografia, com a diferenciação genética entre as populações aumentando com a distância geográfica a partir da África, e a diversidade intrapopulações diminuindo (Liu et al., 2006).

As “Clinas” podem explicar a maior parte da variação entre as populações humanas. Conceitualmente, “Clina” significa mudança linear gradual em um caráter como, por exemplo, a frequência alélica, a diversidade genética intrapopulação ou a diferenciação genética entre as populações (Handley et al., 2007). Portanto, o fato das “clinias” poderem explicar a maior parte da variação humana, faz com que a classificação das populações em etnias ou raças seja, talvez, um tanto arbitrária (Cavali-Sforza, 1992).

As migrações para as novas regiões contribuíram, de forma importante, para o processo evolutivo dos humanos. O conjunto inicial de genes sofreu mutações, contudo estas ocorreram, com as populações, vivendo em diferentes localidades, submetidas a diferentes condições ambientais, gerando novos haplotipos, com cada um comportando-se como uma linhagem evolutiva independente (Figura 4) (Liu et al., 2006).

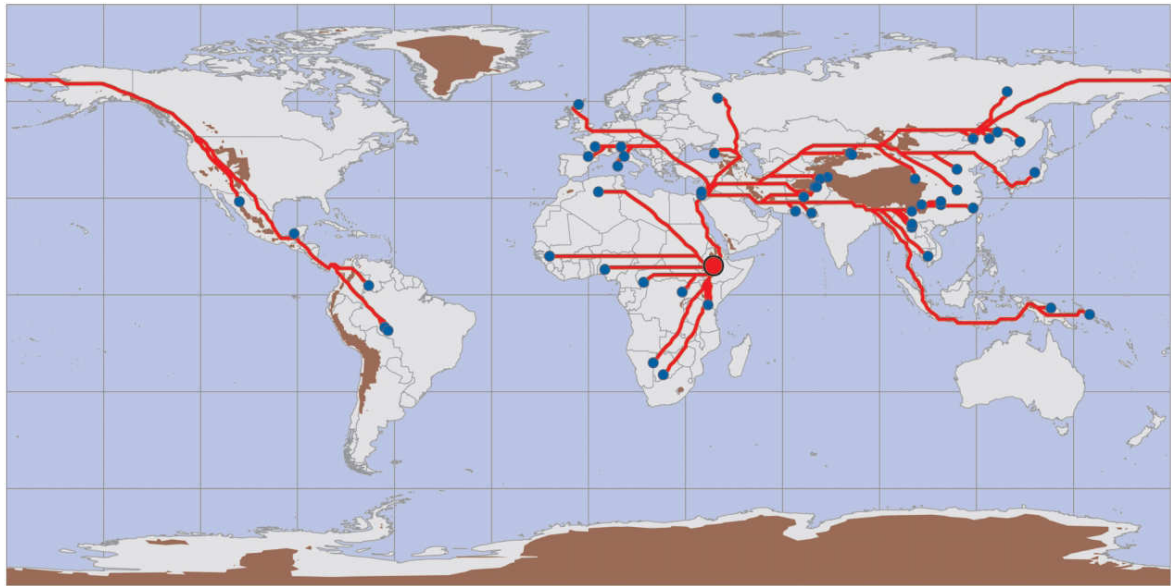


Figura (4) Os pequenos pontos azuis representam as populações, a hipotética origem do homem moderno é representada por um grande ponto vermelho, as rotas de colonização são mostradas em vermelho e as áreas intransponíveis com altitude média de 12.000 m são marrons. Figura extraída do artigo Liu H, 2006.

Os estudos genéticos abordando as patrilinhagens são aqueles nos quais são feitas as análises dos polimorfismos exclusivos do cromossomo Y. Como somente os filhos homens herdam este cromossomo, é possível saber se a contribuição genética de determinada etnia em uma população veio por linhagem masculina ou feminina. Os estudos filogeográficos, usando o cromossomo Y, baseiam-se na teoria de que todos os haplotipos dos cromossomos Y, existentes hoje, derivam de um único haplotipo ancestral, o qual estaria presente entre os primeiros *Homo sapiens*, e que ainda é observado nos africanos do sul da África (Beiguelman, 2008)

Já o DNA mitocondrial (DNA presente nas mitocôndrias) determina a matrilinearidade, a mãe passa este DNA tanto para os seus filhos como para as suas filhas, mas esta informação é herdada somente pela linhagem feminina, uma vez que ela é passada pelo óvulo. Tanto na patrilinhagem como na matrilinearidade não há a troca dos genes com os outros cromossomos. Os genes são transmitidos às gerações

seguintes em blocos (haplotipos). Estes permanecem inalterados nas patrilinhagens ou nas matrinhagens até que ocorra uma mutação. A identificação dos polimorfismos nestes genes é de grande utilidade para a reconstrução da história das migrações de populações humanas (Beiguelman, 2008; Carvalho-Silva et al., 2001)

Utilizando estudos de matrinhagem e de patrilinhagem, Carvalho-Silva e cols. (2002) classificaram os brasileiros como uma das mais heterogêneas populações do mundo, resultado de cinco séculos de intercruzamentos étnicos. A população brasileira consiste, principalmente, da miscigenação entre os portugueses e os nativos do Brasil, misturados no decorrer da formação da sociedade brasileira com grupos africanos e, mais tarde, no começo do século XX, com europeus, originários principalmente da Itália e da Espanha, com sírios e libaneses, e com asiáticos oriundos principalmente do Japão (Carvalho-Silva et al., 2001; Ribeiro, 2000).

Os estudos de Carvalho-Silva (2002) demonstraram que a imensa maioria (aproximadamente 90%) das patrilinhagens dos brancos brasileiros é de origem europeia, enquanto a maioria (aproximadamente 60%) das matrinhagens é de origem ameríndia ou africana.

Do início até aos meados do século XX, a população brasileira sofreu um intenso fluxo gênico resultado das migrações, em especial de asiáticos e de europeus. Estes indivíduos eram oriundos de localidades com um clima completamente diferente do Brasil e traziam uma informação genética fruto da adaptação de milhares de anos às suas terras de origem.

Os efeitos das migrações entre as populações propiciam o fluxo gênico e têm efeito evolutivo sobre as mesmas. No Brasil, ao princípio, o encontro das populações de colonizadores e das nativas, e depois de outras populações, resultaram na

miscigenação, gerando uma população com características genéticas próprias e bastante interessantes para os estudos genéticos.

A intensa miscigenação conferiu à população brasileira um padrão peculiar de diversidade genética. Além disto, esta população vive numa região tropical com condições particulares de luminosidade. Num vasto país como o Brasil, a variação na luminosidade pode ser considerada um efeito ambiental de grande importância do ponto de vista evolutivo, principalmente na questão da adaptação, já que no decorrer do ano há diferenças cruciais na insolação do norte ao sul e do leste ao oeste.

Embora a população brasileira tenha sofrido intensa miscigenação nos últimos anos, o fato do fluxo migratório ser recente, torna possível estratificar amostras não miscigenadas das populações que compõem a população brasileira, com a certeza da origem étnica. Esta peculiaridade torna a população brasileira apropriada para estudos genéticos, em especial os estudos sobre os genes relógio.

O presente estudo propôs-se analisar e comparar a frequência alélica e a genotípica de dois dos polimorfismos mais estudados no campo dos genes relógio, em amostras populacionais de asiáticos e de caucasianos que vivem na cidade de São Paulo.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

O presente estudo teve por objetivo investigar e comparar a frequência dos polimorfismos, o VNTR no gene *PER3* e o T3111C no gene *CLOCK*, em duas amostras populacionais de descendentes de asiáticos e de caucasianos que vivem no Brasil. Com a intenção de descobrir pistas que pudessem contribuir para se construir um novo pensamento, em relação ao processo evolutivo dos humanos relacionado aos ritmos circadianos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Psicobiologia da Universidade Federal de São Paulo. O estudo foi aprovado pelo comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UNIFESP (Universidade Federal de São Paulo) sob o nº 1471/07 (Anexo 1: aprovação do comitê de ética).

3.1 Sujeitos

Segundo um questionário de etnia, foram selecionados, 109 voluntários classificados como asiáticos e 135 como caucasianos. A amostra foi constituída por indivíduos de ambos os gêneros e com idade entre os 18 e os 90 anos, sendo todos residentes na cidade de São Paulo.

3.2 Classificação Étnica

Os indivíduos foram visualmente observados quanto às suas características físicas inerentes à sua origem étnica, tais como o tipo do cabelo, a cor da pele e o tipo dos olhos. Foi aplicado um questionário de etnia, no qual o sujeito informou o país onde ele, os seus pais e os seus avós paternos e maternos nasceram. (Anexo 2: questionário de etnia). De uma amostra inicial de aproximadamente 500 indivíduos, somente foram selecionados aqueles cujos ancestrais eram todos asiáticos ou caucasianos, o que fez um total de 109 asiáticos e 135 caucasianos. Tanto os descendentes como os nascidos em um país estrangeiro foram igualmente classificados como asiáticos ou caucasianos.

3.3 Extração do DNA

O DNA foi obtido a partir de células da mucosa oral, utilizando-se uma escova tipo “cytobrush” (Kolplast). A coleta foi feita esfregando-se a escova na parte interna da bochecha por, aproximadamente, dez vezes de cada lado.

As amostras foram coletadas de todos os participantes no estudo, e o DNA foi extraído com o kit comercial Illustra blood genomic Prep Mini spin Kit code28-9042-64, GE Healthcare UK.

3.4 Genotipagem do polimorfismo VNTR no gene *Per3*

O polimorfismo VNTR no gene *PER3* foi genotipado como descrito por Ebisawa e cols. (2001) e Archer e cols. (2003). A reação da PCR (Polymerase Chain Reaction) foi realizada em alíquotas de 25ul de volume final, sendo 4ul de DNA, 7,5 ul de água ultrapura livre de dnase, 0,5 ul de primers (“foward e reverse”) e 12,5 ul do master mix go taq green promega código M712B pronto para uso.

O DNA extraído das células da mucosa oral foi amplificado nas regiões de interesse, utilizando-se os primers foward, (5'-CAAATTTTATGACACTACCA GAATGGCTGAC-3') e reverse (5'-AACCTTGTACTIONTCCACATCAGTGCCTGG-3').

A reação da PCR foi 94°C por 3 minutos, 38 ciclos; 94°C por 45 segundos, 59 °C por 45 segundos, 72 ° C por 1 minuto; 72° C por 5 minutos. Depois de amplificadas, as amostras foram aplicadas em um gel de agarose a 1%, coradas com brometo de etídio e foi feita uma corrida eletroforética por uma hora e trinta minutos. A leitura do gel foi feita por um transluminador. Para o homozigoto de 5 repetições foram observadas duas bandas sobrepostas de 635pb, e para o homozigoto de 4 repetições duas

bandas sobrepostas de 581pb. Já para o heterozigoto foram duas bandas uma de 581pb outra de 635pb.

3.5 Genotipagem do polimorfismo T3111C no gene *CLOCK*

A genotipagem do polimorfismo T3111C (RS 1801260) no gene *CLOCK* foi feita pelo método da PCR em tempo real com o ensaio pronto para uso (Taqman Real Time SNP Genotyping Assay da Applied Biosystems, nº C_8746719_20), utilizando-se o equipamento Real Time Applied Biosystems modelo 7500.

3.6 Análise Estatística

Para a análise das frequências alélica e genotípica do polimorfismo nos dois grupos étnicos, foi utilizado o teste de χ^2 com a correção de Yates. A distribuição genotípica foi verificada para o equilíbrio de Hardy-Weinberg. O valor de p foi 0.05.

4. RESULTADOS

No presente estudo foi investigado o polimorfismo SNP T/C na posição 3111 no gene *CLOCK*, e o VNTR no éxon 18 no gene *PER3*. O VNTR no éxon 18 do gene *PER3* consiste em uma seqüência de 54 pares de bases, a qual se repete quatro ou cinco vezes no gene. As combinações dos alelos de 4 e 5 repetições resultam nos genótipos homocigoto com 4 repetições (4/4), heterocigoto (4/5) e homocigoto com 5 repetições (5/5).

Para se identificar os genótipos, utilizou-se a técnica da PCR (Polymerase Chain Reaction), seguida da eletroforese em um gel de agarose com leitura pelo transluminador. O padrão de bandas para o polimorfismo VNTR no gene *PER3* na genotipagem foi o seguinte: o genótipo homocigoto 4/4 aparece no gel de agarose como duas bandas sobrepostas de 581 pares de bases, o heterocigoto 4/5 como uma banda de 581 outra de 635 pares de bases e o 5/5 como duas bandas sobrepostas de 635 pares de bases (Figura 5).

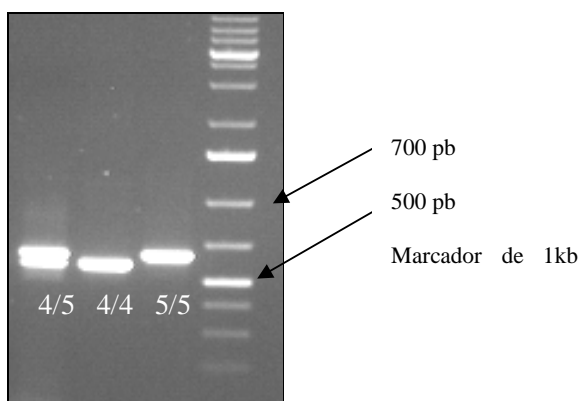


Figura (5). Gel de agarose mostrando o polimorfismo VNTR no gene *PER3*, o heterocigoto está representado por 4/5, indicando uma banda de 635 e outra de 581 pares de bases. Com 581 pares de base se observa o genótipo homocigoto 4/4, e com 635 pares de base o 5/5. As bandas dos genótipos de interesse estão situadas entre 500 e 700 pb no marcador de peso molecular o qual é de 1 Kb.

Os resultados observados, quando se compararam os grupos o asiático e o caucasiano, indicaram que existiam diferenças na distribuição dos genótipos 4/4, 4/5, e 5/5.

Na figura 6, que mostra o gráfico e a tabela da distribuição genotípica do polimorfismo VNTR no gene *PER3*, observa-se que, no grupo asiático, a frequência genotípica do homozigoto 4/4 foi de 0,74, enquanto no caucasiano foi de 0,47. Quanto ao genótipo heterozigoto 4/5, a frequência foi 0,23 no asiático e 0,43 no caucasiano. O genótipo 5/5 é bastante raro nos asiáticos, pois a frequência foi apenas de 0,03, ao contrário dos caucasianos que tinham uma frequência genotípica de 0,10. Na análise estatística foi utilizado o teste de chi-quadrado, tendo-se obtido, quando se comparou os grupos étnicos o asiático com o caucasiano, um valor de $\chi^2 = 19.7$ e $p < 0.0001$, o que mostrou que existia uma diferença significativa na distribuição genotípica do polimorfismo VNTR no gene *PER3*.

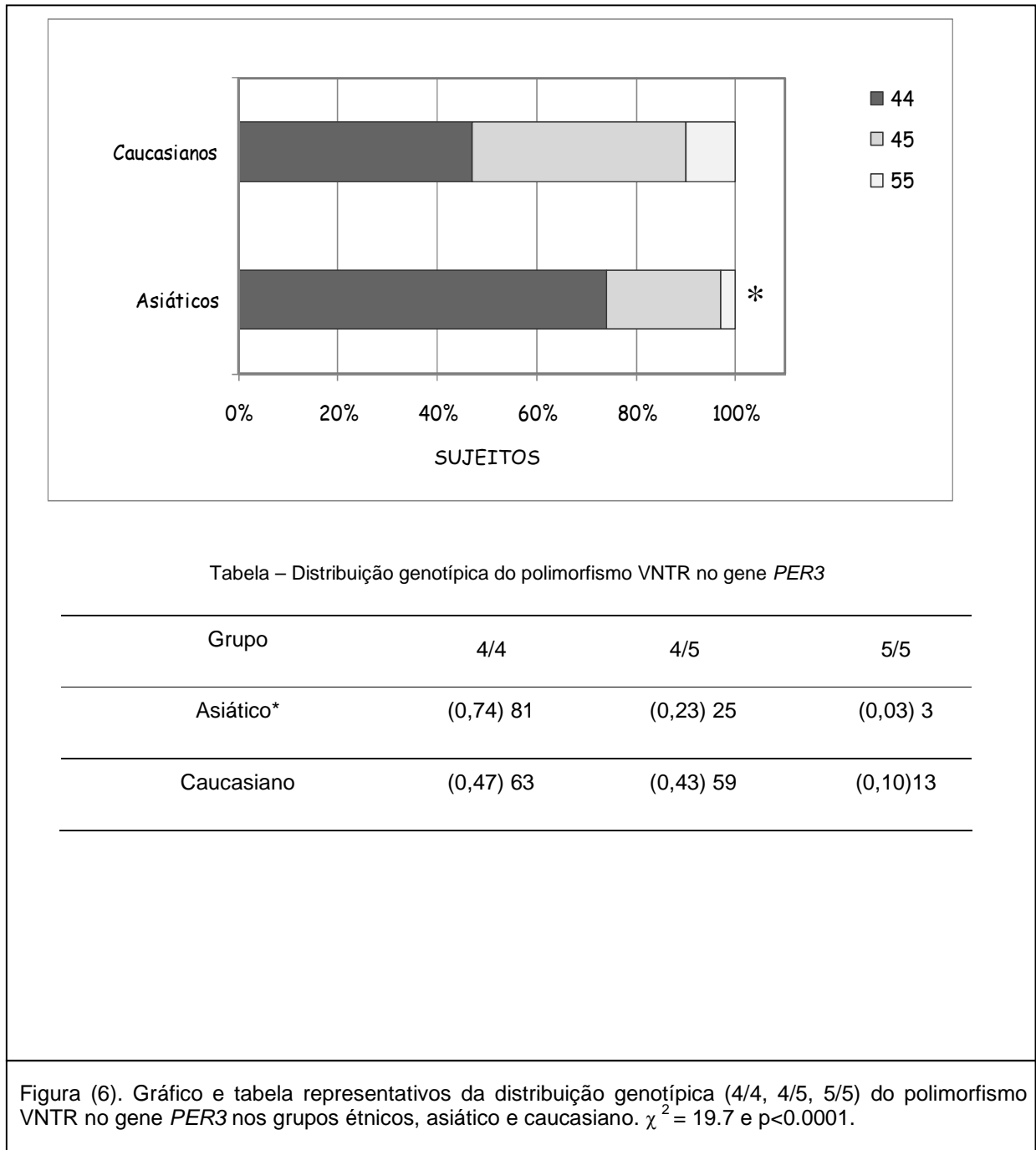
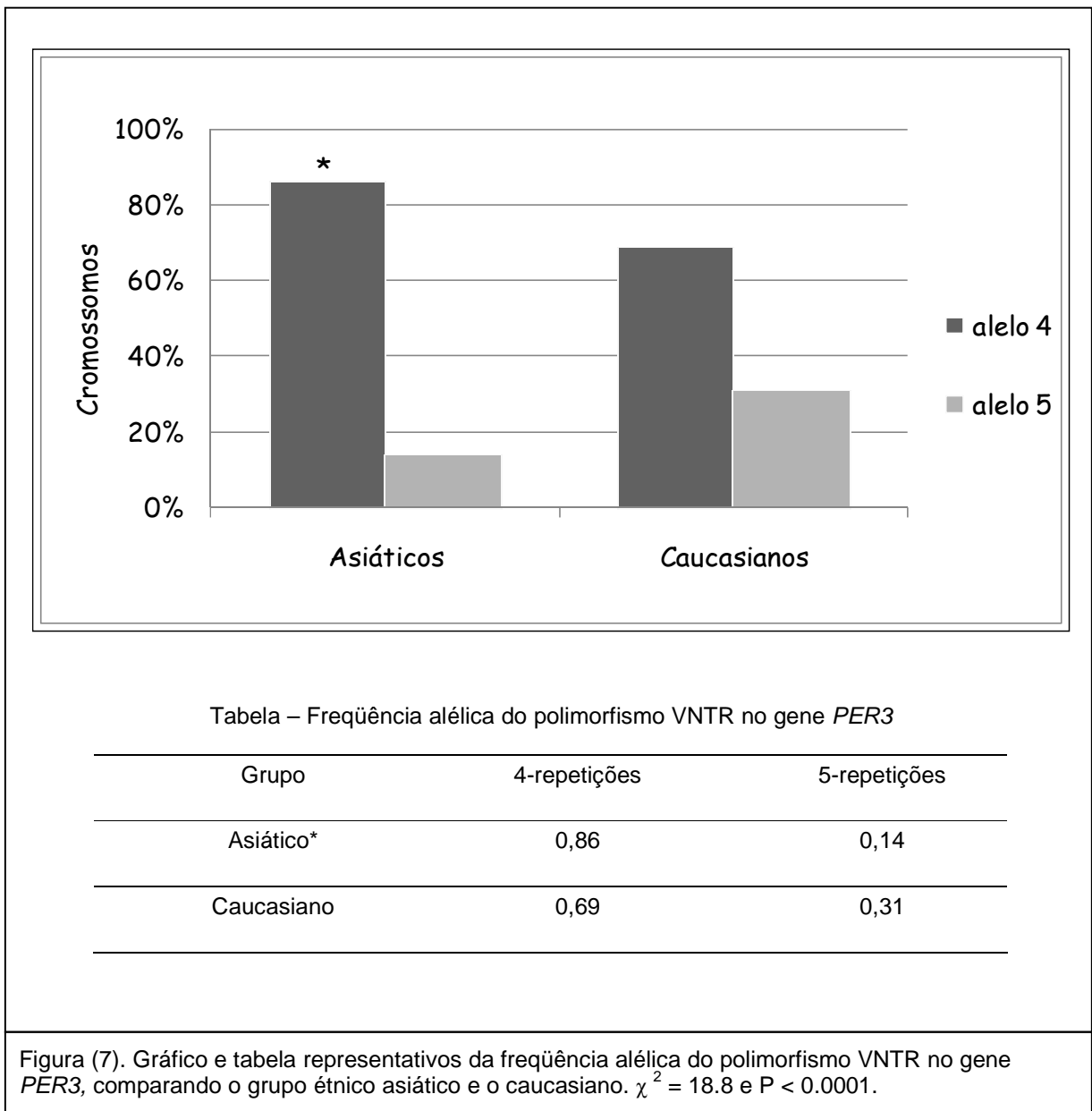


Figura (6). Gráfico e tabela representativos da distribuição genotípica (4/4, 4/5, 5/5) do polimorfismo VNTR no gene *PER3* nos grupos étnicos, asiático e caucasiano. $\chi^2 = 19.7$ e $p < 0.0001$.

A frequência do alelo de quatro repetições foi maior no grupo asiático (0,86) do que no caucasiano (0,69). Já a frequência do de cinco repetições foi menor no asiático (0,14) do que no caucasiano (0,31). O resultado do teste de chi-quadrado foi $\chi^2 = 18.8$ e $p < 0.0001$, indicando que existia uma diferença estatisticamente significativa na frequência alélica entre os dois grupos (Figura 7).



O polimorfismo T3111C no gene *CLOCK* consiste em uma única troca de bases (T para C), e a genotipagem foi feita utilizando-se ensaios de discriminação alélica pela PCR em tempo real no equipamento Applied Biosystems modelo 7500 (Figura 8).

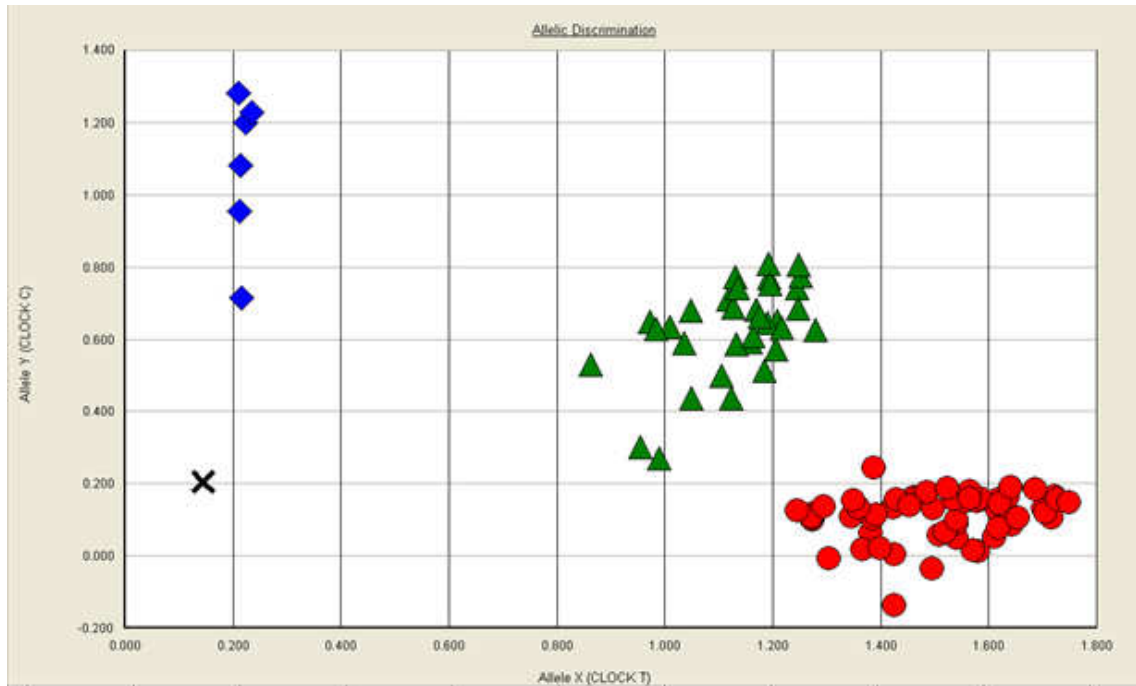


Figura (8). Esquema representativo da genotipagem pela técnica da discriminação alélica do polimorfismo T3111C no gene *CLOCK*. Os losangos azuis correspondem ao genótipo homozigoto CC, os triângulos verdes ao heterozigoto TC e os círculos vermelhos ao homozigoto TT. O x representa o branco da reação.

Em relação à genotipagem para o SNP T3111C no gene *CLOCK* se observou que, no grupo asiático, a frequência genotípica do homozigoto TT foi de 0,71 superior ao caucasiano que foi de 0,50. Quanto ao genótipo heterozigoto TC, a frequência genotípica foi de 0,25 nos asiáticos e de 0,41 nos caucasianos. O genótipo C/C no gene *CLOCK* também foi bastante raro nos asiáticos, pois a frequência foi apenas de 0,04, frequência esta inferior à dos caucasianos que foi de 0,09. Na análise estatística foi utilizado o teste de chi-quadrado, tendo-se obtido, quando se compararam os dois

grupos étnicos, um valor de $\chi^2 = 11.6$ e $p = 0.003$, o que indicou que existia uma diferença estatisticamente significativa quanto à distribuição genotípica do polimorfismo T/C (Figura 9).

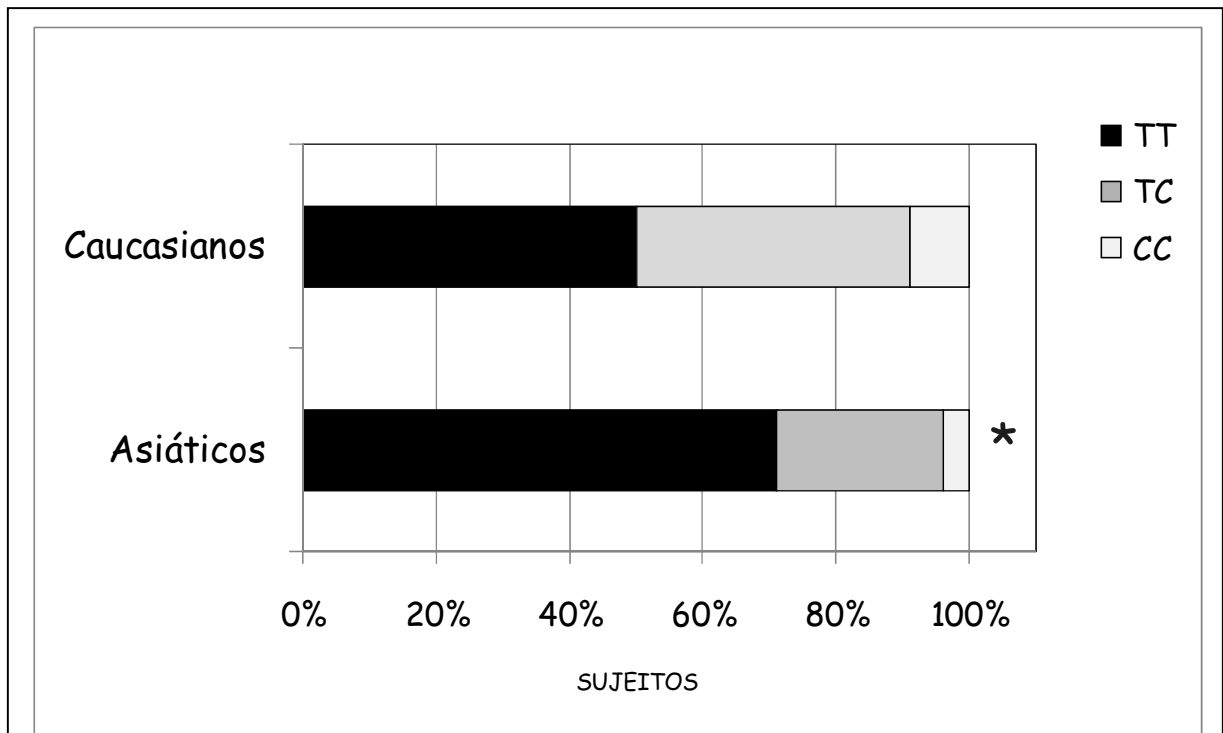


Tabela – Distribuição genotípica do polimorfismo T3111C no gene *CLOCK*.

Grupo	TT	TC	CC
Asiático*	(0,71) 78	(0,25) 27	(0,04) 4
Caucasiano	(0,50) 68	(0,41) 55	(0,09) 12

Figura (9). Gráfico e tabela representativos da distribuição genotípica (TT, TC, CC) do polimorfismo T3111C no gene *CLOCK* nos grupos étnicos, asiático e caucasiano. $\chi^2 = 11.6$ e $P = 0.003$.

Quando se compararam as frequências alélicas neste polimorfismo, observou-se que a frequência do alelo de T foi maior no grupo asiático (0,84) do que no caucasiano (0,71). Já a frequência do alelo C foi menor no asiático (0,16) e maior no caucasiano (0,29). O teste de chi-quadrado foi $\chi^2 = 11.0$ e $p = 0.0006$, indicando que existia uma diferença estatisticamente significativa nas frequências alélicas entre os dois grupos (Figura 10).

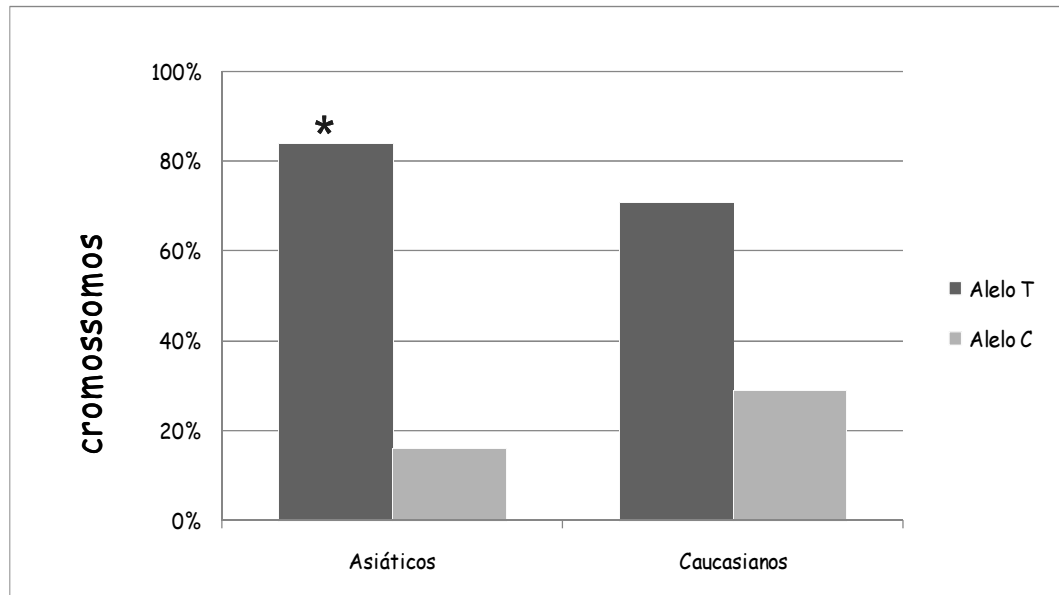


Tabela – Frequência alélica do polimorfismo T3111C no gene *CLOCK*.

Grupo	T	C
Asiático*	0,84	0,16
Caucasiano	0,71	0,29

Figura (10). Gráfico e tabela representativos da frequência alélica do polimorfismo T3111C no gene *CLOCK* comparando o grupo étnico asiático e o caucasiano. $\chi^2 = 11.0$ e $P = 0.0006$.

5. DISCUSSÃO

A análise dos resultados mostrou que, entre amostras populacionais de asiáticos e caucasianos que vivem no Brasil, houve diferenças significativas nas frequências gênicas dos polimorfismos VNTR no gene *PER3* e T3111C no gene *CLOCK*. A frequência do alelo com 4 repetições no gene *PER3* foi maior nos asiáticos do que nos caucasianos. Semelhante ao polimorfismo no gene *PER3*, a frequência do alelo T no gene *CLOCK* também foi maior nos asiáticos do que nos caucasianos (Figuras 6, 7, 9 e 10).

Nos últimos anos, uma quantidade crescente de estudos, em uma variedade de amostras populacionais tem mostrado associação entre polimorfismos nos genes relógio e fenótipos circadianos (Ebisawa et al., 2001; Jones et al., 2007; Mansour et al., 2006; Mishima et al., 2005; Takao et al., 2007; Viola et al., 2007). Os resultados destes estudos mostraram que, em termos de predizer a adaptação temporal da fase circadiana para as demandas sociais, existia um grande potencial para medicina preventiva. Todavia, algumas associações descritas em populações asiáticas não podem ser confirmadas em caucasianas muito provavelmente porque alguns destes polimorfismos estão em frequências muito baixas ou mesmo ausentes nos caucasianos (Castro et al., 2008; Hohjoh et al., 2003). Os resultados do presente estudo confirmaram, a existência de uma distribuição genotípica diferente, entre asiáticos e caucasianos, dos dois polimorfismos mais estudados nos genes relógio.

Na sociedade moderna existe uma grande demanda temporal para a realização de atividades ao longo das 24 horas do dia como, por exemplo, em relação às escalas de trabalho e aos horários escolares. Desde que exista um amplo espectro de

cronotipo, e que este esteja submetido às rígidas condições impostas pela sociedade moderna quanto aos horários, é provável que o sistema de temporização dos humanos entre em conflito com os hábitos da sociedade, implicando na possível dessincronização deste sistema.

Esta dessincronização com a ordem temporal externa, e a conseqüente dessincronização interna do sistema circadiano, pode contribuir significativamente para o desenvolvimento de morbididades e de alterações no bem estar da saúde humana (Takahashi et al., 2008).

A elucidação dos mecanismos circadianos nos humanos, a fim de que o cronotipo individual possa ser mais facilmente avaliado, possibilitará adequação quanto à ritmicidade circadiana, e contribuirá de forma importante para minimizar possíveis problemas relativos à adaptação temporal dos indivíduos submetidos às demandas sociais.

Em muitos organismos vivos, desde as cianobacterias aos fungos, às plantas e aos animais, muitos processos fisiológicos e comportamentais apresentam variações rítmicas. A função do relógio biológico é fornecer informação temporal para os organismos, a fim de que respostas fisiológicas e ou comportamentais possam ser coordenadas durante o ciclo claro-escuro, para se maximizar a adaptação ao meio ambiente (Cermakian & Boivin, 2003; Marques & Menna-Barreto, 2003; Reppert & Weaver, 2002). Contudo flutuações consideráveis na intensidade da luz e mudanças sazonais da temperatura ambiente ocorrem ao longo do ano, em diferentes latitudes e localidades (Nadkarni et al., 2005; Pereira et al., 2005). Tais regimes específicos de luminosidade, inerentes a cada localidade, talvez tenham contribuído para a diversidade dos padrões de polimorfismos, observados neste estudo nos genes relógio.

As diferenças na frequência alélica e na distribuição genotípica entre Asiáticos e Caucasionos são observadas não apenas nos genes relógio, mas também em outros polimorfismos étnico-específicos como, por exemplo, em estudos sobre resposta às drogas em doenças reumáticas auto-imunes e diabetes tipo I (Ikari et al., 2006; Ikegami et al., 2007; Mori et al., 2005; Sai et al., 2008). Mas além de puras diferenças étnicas sem uma relação clara com um fator ambiental, os resultados obtidos estão relacionados a um forte fator ambiental que regula a ritmicidade circadiana e, portanto, poderia agir como uma força para a seleção desses polimorfismos; a saber, as flutuações na intensidade luminosa, ao longo do ano dado pelo clima de latitude.

Com base nas conclusões do presente estudo, bem como nas de outros autores (Ciarleglio et al., 2008; Cruciani et al., 2008; Nadkarni et al., 2005) e na história das migrações do ser humano pelo mundo ao longo dos tempos, e levando em consideração as características peculiares de insolação e de luminosidade inerentes aos diferentes lugares na terra, questiona-se quais fatores contribuíram para que tais variações genéticas se tornassem próprias de cada etnia, especialmente em relação aos genes relógio.

Considerando que o fenótipo circadiano é resultado de uma forte interação entre o meio ambiente e o organismo, e que um dos mais importantes *Zeitgebers* para os seres humanos é o ciclo claro-escuro, seria lógico se pensar que diferenças na latitude poderiam contribuir de maneira importante para a seleção de polimorfismos. A distribuição sistemática de haplotipos étnico-específicos, nos genes relógio, poderia representar respostas adaptativas aos diferentes fotoperíodos e às mudanças climáticas sazonais que representam ritmos ambientais. Em estudos com a *Drosophila*

melanogaster há relatos de associação de polimorfismos nos genes relógio com a clina de latitude (Costa & Kyriacou, 1998; Costa et al., 1992; Sawyer et al., 2006).

Tem sido debatido se em genes relógio, nos humanos, há pressão seletiva ou não sobre os polimorfismos. Em um estudo, realizado por Nadkarni (2005), o autor não observou evidências de que, em humanos, a duração do dia ou a média anual de insolação pudesse ter contribuído como pressão seletiva natural no polimorfismo VNTR do gene *PER3*. Todavia foi observado um padrão genético diferente, associado a cada etnia. Além disto, os autores descreveram freqüências invertidas para populações aborígenes da Austrália que vivem próximos à linha do Equador. Na maior parte das populações o alelo com quatro repetições é mais freqüente do que o com cinco, mas nessa população o com cinco é mais freqüente. Por outro lado, Cruciani e cols. (2008) sugeriram que polimorfismos no gene *PER2* talvez tenham sido influenciados pela seleção natural.

Outro estudo abordando este tema é o de Ciarleglio e cols. (2008), em que cinco amostras, de populações originárias de diferentes latitudes e ambientes, foram analisadas para vários polimorfismos nos genes relógio. Os grupos selecionados foram os seguintes: o afro-Americano, o europeu-americano, o han chinês, e os nativos da Papua Nova Guiné e os do Gana. O estudo revelou uma diferença significativa entre estas populações para as freqüências, genotípica, alélica e haplotípica nos genes relógio, e sugeriu que as diferenças nos padrões de distribuição dos polimorfismos entre os grupos poderiam ter sido um efeito da deriva genética ou, possivelmente, um efeito de fundador, mas não pressão seletiva natural.

A característica nômade das populações humanas poderia ter contribuído como um efeito mascarador da pressão seletiva natural, pois além de se deslocarem para

lugares diferentes, essas populações estavam sujeitas à inserção de fluxos gênicos, resultando em um novo padrão genético miscigenado. Por outro lado, não se pode também deixar de considerar a possível plasticidade do sistema, que torna os organismos capazes de se adaptarem a uma dada condição ambiental, mesmo sendo eles pertencentes a grupos com diferentes perfis genéticos, os quais foram moldados ao longo de milhares de anos em condições ambientais diferentes da original.

Na hipótese da plasticidade do sistema ser verdadeira, se poderia supor, então, que um indivíduo que apresentasse um determinado padrão genotípico pouco adaptável a um determinado local estaria sujeito a uma melhor adaptação a outro. Isto implicaria na mudança do seu cronotipo quando ele se deslocasse para uma latitude muito diferente daquela da sua origem, como no caso descrito por Gottesmann (2000) em que um sujeito com SFAS, que morava em Paris, deixou de apresentar os sintomas desta síndrome quando se mudou para o Rio de Janeiro.

Embora as conclusões de Nadkarni (2005) e Ciarleglio (2008) não confirmem que as diferenças observadas na distribuição de polimorfismos nos genes relógio sejam o resultado da pressão seletiva nas diferentes latitudes, deve-se ter em mente que foram publicados apenas quatro estudos abordando diretamente o tema. Apesar da relevância dos genes relógio num amplo espectro de processos biológicos, os estudos abordando vários aspectos sobre o grau e a natureza das variações nesses genes, numa população humana normal de diferentes origens e a possível correlação com as diversas condições ambientais, têm recebido pouca atenção.

O presente estudo ressaltou a existência de um padrão diferente de distribuição genotípica das etnias caucasiana e asiática, e sugeriu que pesquisas associando fenótipos circadianos e polimorfismos em genes relógio precisariam ser analisados

cuidadosamente. Mesmo que este padrão genético diferenciado, presente nos grupos étnicos, não seja resultado de um amplo processo evolutivo, mas pura e simplesmente decorrente de deriva genética, não se pode deixar de considerar a relevância destas diferenças no que tange ao campo da medicina e aos aspectos sociais envolvidos.

Na ausência de pistas ambientais, os organismos expressam o seu período endógeno (Tau). A duração do Tau varia entre as espécies, porém dentro da mesma espécie, de acordo com a curva de Gauss, é distribuído normalmente. Nos humanos o tamanho do Tau médio é ligeiramente maior do que 24 horas, ficando em torno de 24.24 ± 0.22 (DP) horas. Algumas das diferenças observadas têm sido atribuídas à idade, à estação do ano, e ao gênero (Smith et al., 2009).

Em um estudo recente, Smith e cols. (2009) observaram nos humanos, diferenças étnicas na duração do período endógeno Tau, e no deslocamento da fase circadiana. As diferenças nas frequências alélicas nos genes relógio, mostradas no presente estudo, corroboram com as conclusões do estudo supracitado. Além disto, reforça a hipótese, de que o relógio biológico molecular poderia funcionar de maneira ligeiramente diferente, conforme o perfil de polimorfismos nos genes relógio que um indivíduo carrega, perfil este, que fica evidenciado quando se analisam as diferentes etnias.

6. CONCLUSÃO

Diante das diferenças genéticas evidentes entre os grupos étnicos e considerando que tais diferenças talvez possam ter implicações para a interpretação de resultados em estudos de associação, sugere-se que variações étnicas em polimorfismos deveriam ser avaliadas em detalhe, considerando-se a etnia, e que essas diferenças deveriam ser incorporadas à investigação. Um entendimento de como seria esta relação entre o perfil de variações nos genes relógio e o cronotipo seria de grande relevância, pois poderia contribuir para a medicina preventiva em termos de potenciar a adaptação temporal do indivíduo às demandas sociais em torno das 24 horas. Além disto, também poderia ser de grande relevância em termos de esquemas terapêuticos, medicamentosais e de tratamento. Considerando que alguns genes relógio fazem parte do mecanismo molecular da regulação da ritmicidade circadiana, como o período endógeno (Tau) (von Schantz, 2008), a conclusão a que se chegou no presente estudo, indicou que, entre os grupos étnicos, diferentes perfis de combinação de polimorfismos talvez resultem em uma maneira diferente de funcionamento do relógio biológico molecular. Portanto se poderia perguntar: O relógio biológico dos asiáticos e dos caucasianos funciona de maneira diferente?

Os estudos sobre os níveis e os padrões de variação nos genes relógio nos humanos, contribuirão de forma bastante relevante para um melhor entendimento do mecanismo evolucionário, o qual tem moldado esses padrões genéticos nas diferentes etnias ao longo dos milhares de anos de evolução da espécie humana.



Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

São Paulo, 7 de dezembro de 2007.
CEP 1471/07

Ilmo(a). Sr(a).
Pesquisador(a) ANA ALVES BARBOSA
Co-Investigadores: Sergio Tufik; Mário Pedrazzoli Neto
Disciplina/Departamento: Psicobiologia/Biologia e Medicina do Sono da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo
Patrocinador: Recursos Próprios.

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA INSTITUCIONAL

Ref: Projeto de pesquisa intitulado: “**Associação do polimorfismo de repetição (VNTR) do gene Per 3 com a preferência diurna em grupos de indivíduos de meia idade e idosos**”.

CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO: Estudo de perfil populacional com levantamento genético.

RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE: risco mínimo, desconforto leve com coleta de células da mucosa oral.

OBJETIVOS: Investigar se a associação do polimorfismo VNTR no gene Per3 e matutividade/vespertividade, descrita em jovens, ainda persiste em sujeitos de meia idade e idosos.

RESUMO: Participarão 600 sujeitos, com idade a partir de 18 anos até a idade avançada e serão classificados conforme a idade em três grupos: jovens, meia idade e idoso, sendo a amostra composta por 50%homens e 50% mulheres. Será aplicado o questionário de Horne & Östberg, adaptado para a língua portuguesa, para verificar o padrão da preferência diurna (matutividade/vespertividade). Será aplicado o questionário de sono escala de Pittsburgh, versão em português, para avaliar a inclusão no estudo. Para análise genotípica será extraído o DNA de células da mucosa oral coletadas a partir de esfregaço com cotonete e utilizada a técnica de PCR para amplificação nas regiões de interesse utilizando-se primers específicos e após identificado os polimorfismos por eletroforese. Os resultados serão analisados estatisticamente aplicando-se os teste de X² para comparar a proporção de cronotipos nos grupos e verificar se a amostra está em equilíbrio de Hardy-Weiberg com pmenor 0,05, e o teste t de Student ou ANOVA para comparar as médias do questionárioHorne & Osteberg nos diferentes grupos..

FUNDAMENTOS E RACIONAL: identificar variações genéticas relacionadas ao sono - associação do polimorfismo de repetição no gene Per3 com o fenótipo da preferência diurna em indivíduos jovens.

MATERIAL E MÉTODO: descritos e apresentados os instrumentos que serão utilizados.

TCLE: apresentado adequadamente.

DETALHAMENTO FINANCEIRO: Fapesp ou AFIP.

CRONOGRAMA: 24 meses.

OBJETIVO ACADÊMICO: Mestrado.

ENTREGA DE RELATÓRIOS PARCIAIS AO CEP PREVISTOS PARA: 6/12/2008 e 6/12/2009.



Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo **ANALISOU** e **APROVOU** o projeto de pesquisa referenciado.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto e termo de consentimento livre e esclarecido. Nestas circunstâncias a inclusão de pacientes deve ser temporariamente interrompida até a resposta do Comitê, após análise das mudanças propostas.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/ Hospital São Paulo

CEP 1471/07

7. 2 Questionário de Etnia

QUESTIONÁRIO DE ETNIA - IDENTIFICAÇÃO DO VOLUNTÁRIO

NOME: _____

E-mail: _____

1) ONDE **VOCÊ** NASCEU? (CIDADE/ESTADO/PAÍS) _____

2) COM QUAL GRUPO ÉTNICO A SEGUIR **VOCÊ** SE IDENTIFICA MAIS?

- | | |
|--|---------------------------------------|
| <input type="checkbox"/> Negro | <input type="checkbox"/> Asiático |
| <input type="checkbox"/> Índio | <input type="checkbox"/> Outro |
| <input type="checkbox"/> Caucasiano (branco) | <input type="checkbox"/> Desconhecido |
| <input type="checkbox"/> Latino (Venezuela, Peru, Colômbia, etc) | |

3) ONDE **SUA MÃE** NASCEU? (CIDADE/ESTADO/PAÍS) _____

4) COM QUAL GRUPO ÉTNICO A **SUA MÃE** SE IDENTIFICA MAIS?

- | | |
|--|---------------------------------------|
| <input type="checkbox"/> Negro | <input type="checkbox"/> Asiático |
| <input type="checkbox"/> Índio | <input type="checkbox"/> Outro |
| <input type="checkbox"/> Caucasiano (branco) | <input type="checkbox"/> Desconhecido |
| <input type="checkbox"/> Latino (Venezuela, Peru, Colômbia, etc) | |

5) ONDE **SEU PAI** NASCEU? (CIDADE/ESTADO/PAÍS) _____

6) COM QUAL GRUPO ÉTNICO **SEU PAI** SE IDENTIFICA MAIS?

- | | |
|--|---------------------------------------|
| <input type="checkbox"/> Negro | <input type="checkbox"/> Asiático |
| <input type="checkbox"/> Índio | <input type="checkbox"/> Outro |
| <input type="checkbox"/> Caucasiano (branco) | <input type="checkbox"/> Desconhecido |
| <input type="checkbox"/> Latino (Venezuela, Peru, Colômbia, etc) | |

7) ONDE SUA **AVÓ MATERNA** NASCEU? (CIDADE/ESTADO/PAÍS) _____

8) COM QUAL GRUPO ÉTNICO SUA **AVÓ MATERNA** SE IDENTIFICA MAIS?

- | | |
|--|---------------------------------------|
| <input type="checkbox"/> Negro | <input type="checkbox"/> Asiático |
| <input type="checkbox"/> Índio | <input type="checkbox"/> Outro |
| <input type="checkbox"/> Caucasiano (branco) | <input type="checkbox"/> Desconhecido |
| <input type="checkbox"/> Latino (Venezuela, Peru, Colômbia, etc) | |

9) ONDE SEU **AVÔ MATERNO** NASCEU? (CIDADE/ESTADO/PAÍS) _____

10) COM QUAL GRUPO ÉTNICO SEU **AVÔ MATERNO** SE IDENTIFICA MAIS?

- | | |
|--|---------------------------------------|
| <input type="checkbox"/> Negro | <input type="checkbox"/> Asiático |
| <input type="checkbox"/> Índio | <input type="checkbox"/> Outro |
| <input type="checkbox"/> Caucasiano (branco) | <input type="checkbox"/> Desconhecido |
| <input type="checkbox"/> Latino (Venezuela, Peru, Colômbia, etc) | |

8. REFERÊNCIAS

- Archer SN, Robilliard DL, Skene DJ, Smits M, Williams A, Arendt J et al. A length polymorphism in the circadian clock gene *Per3* is linked to delayed sleep phase syndrome and extreme diurnal preference. **Sleep**. v 26; n. 4; p. 413-415. (2003).
- Aston-Jones G, Chen S, Zhu Y & Oshinsky ML. A neural circuit for circadian regulation of arousal. **Nat Neurosci**. v 4; n. 7; p. 732-738. (2001).
- Bae K, Jin X, Maywood ES, Hastings MH, Reppert SM & Weaver DR. Differential functions of *mPer1*, *mPer2*, and *mPer3* in the SCN circadian clock. **Neuron**. v 30; n. 2; p. 525-536. (2001).
- Barnard AR & Nolan PM. When clocks go bad: neurobehavioural consequences of disrupted circadian timing. **PLoS Genet**. v 4; n. 5; p. e1000040. (2008).
- Beiguelman B. *Genética de Populações Humanas*. Ribeirão Preto: 239. (2008).
- Bjarnason GA, Jordan RC, Wood PA, Li Q, Lincoln DW, Sothorn RB et al. Circadian expression of clock genes in human oral mucosa and skin: association with specific cell-cycle phases. **Am J Pathol**. v 158; n. 5; p. 1793-1801. (2001).
- Boivin DB, James FO, Wu A, Cho-Park PF, Xiong H & Sun ZS. Circadian clock genes oscillate in human peripheral blood mononuclear cells. **Blood**. v 102; n. 12; p. 4143-4145. (2003).
- Bunger MK, Wilsbacher LD, Moran SM, Clendenin C, Radcliffe LA, Hogenesch JB et al. *Mop3* is an essential component of the master circadian pacemaker in mammals. **Cell**. v 103; n. 7; p. 1009-1017. (2000).
- Carpen JD, von Schantz M, Smits M, Skene DJ & Archer SN. A silent polymorphism in the *PER1* gene associates with extreme diurnal preference in humans. **J Hum Genet**. v 51; n. 12; p. 1122-1125. (2006).
- Carvalho-Silva DR, Santos FR, Rocha J & Pena SD. The phylogeography of Brazilian Y-chromosome lineages. **Am J Hum Genet**. v 68; n. 1; p. 281-286. (2001).
- Castro RM, Barbosa AA, Pedrazzoli M & Tufik S. Casein kinase I epsilon (CKIε) N408 allele is very rare in the Brazilian population and is not involved in susceptibility to circadian rhythm sleep disorders. **Behav Brain Res**. v 193; n. 1; p. 156-157. (2008).
- Cavali-Sforza LL. *Genes, Povos e Línguas*. São Paulo: **Companhia das Letras**. p 500. (1992).
- Cermakian N & Boivin DB. A molecular perspective of human circadian rhythm disorders. **Brain Res Brain Res Rev**. v 42; n. 3; p. 204-220. (2003).

- Chen ST, Choo KB, Hou MF, Yeh KT, Kuo SJ & Chang JG. Deregulated expression of the PER1, PER2 and PER3 genes in breast cancers. **Carcinogenesis**. v 26; n. 7; p. 1241-1246. (2005).
- Ciarleglio CM, Ryckman KK, Servick SV, Hida A, Robbins S, Wells N et al. Genetic differences in human circadian clock genes among worldwide populations. **J Biol Rhythms**. v 23; n. 4; p. 330-340. (2008).
- Costa R & Kyriacou CP. Functional and evolutionary implications of natural variation in clock genes. **Curr Opin Neurobiol**. v 8; n. 5; p. 659-664. (1998).
- Costa R, Peixoto AA, Barbujani G & Kyriacou CP. A latitudinal cline in a Drosophila clock gene. **Proceedings**. v 250; n. 1327; p. 43-49. (1992).
- Cruciani F, Trombetta B, Labuda D, Modiano D, Torroni A, Costa R et al. Genetic diversity patterns at the human clock gene period 2 are suggestive of population-specific positive selection. **Eur J Hum Genet**. v 16; n. 12; p. 1526-1534. (2008).
- Duffield GE. DNA microarray analyses of circadian timing: the genomic basis of biological time. **J Neuroendocrinol**. v 15; n. 10; p. 991-1002. (2003).
- Ebisawa T, Uchiyama M, Kajimura N, Mishima K, Kamei Y, Katoh M et al. Association of structural polymorphisms in the human period3 gene with delayed sleep phase syndrome. **EMBO Rep**. v 2; n. 4; p. 342-346. (2001).
- Feldman JF & Hoyle MN. Isolation of circadian clock mutants of *Neurospora crassa*. **Genetics**. v 75; n. 4; p. 605-613. (1973).
- Gekakis N, Staknis D, Nguyen HB, Davis FC, Wilsbacher LD, King DP et al. Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism. **Science**. v 280; n. 5369; p. 1564-1569. (1998).
- Gottesmann C. Is the delayed sleep phase syndrome a physical or psychological disease? A case report of disappearance following a change of latitude. **Psychiatry and clinical neurosciences**. v 54; n. 5; p. 543-546. (2000).
- Griffiths AJF, Miller JA, Suzuki DT, Lewontin RC & Gilbert WM. Introdução à Genética. Rio de Janeiro: **Editora Guanabara Koogan**. p 650. (1996).
- Handley LJ, Manica A, Goudet J & Balloux F. Going the distance: human population genetics in a clinal world. **Trends Genet**. v 23; n. 9; p. 432-439. (2007).
- Hohjoh H, Takasu M, Shishikura K, Takahashi Y, Honda Y & Tokunaga K. Significant association of the arylalkylamine N-acetyltransferase (AA-NAT) gene with delayed sleep phase syndrome. **Neurogenetics**. v 4; n. 3; p. 151-153. (2003).

- Honma S, Kawamoto T, Takagi Y, Fujimoto K, Sato F, Noshiro M et al. Dec1 and Dec2 are regulators of the mammalian molecular clock. **Nature**. v 419; n. 6909; p. 841-844. (2002).
- Hsu DS, Zhao X, Zhao S, Kazantsev A, Wang RP, Todo T et al. Putative human blue-light photoreceptors hCRY1 and hCRY2 are flavoproteins. **Biochemistry**. v 35; n. 44; p. 13871-13877. (1996).
- Hubbe M, Mazzaia ETA, Atui JPV & Neves W. A Primeira Descoberta da América. Ribeirão Preto: **Sociedade Brasileira de Genética**. p 70. (2003).
- Ikari K, Momohara S, Inoue E, Tomatsu T, Hara M, Yamanaka H et al. Haplotype analysis revealed no association between the PTPN22 gene and RA in a Japanese population. **Rheumatology (Oxford)**. v 45; n. 11; p. 1345-1348. (2006).
- Ikeda M & Nomura M. cDNA cloning and tissue-specific expression of a novel basic helix-loop-helix/PAS protein (BMAL1) and identification of alternatively spliced variants with alternative translation initiation site usage. **Biochemical and biophysical research communications**. v 233; n. 1; p. 258-264. (1997).
- Ikegami H, Kawabata Y, Noso S, Fujisawa T & Ogihara T. Genetics of type 1 diabetes in Asian and Caucasian populations. **Diabetes Res Clin Pract**. v 77 Suppl 1; n. p. S116-121. (2007).
- Jones KH, Ellis J, von Schantz M, Skene DJ, Dijk DJ & Archer SN. Age-related change in the association between a polymorphism in the PER3 gene and preferred timing of sleep and waking activities. **J Sleep Res**. v 16; n. 1; p. 12-16. (2007).
- Katzenberg D, Young T, Finn L, Lin L, King DP, Takahashi JS et al. A CLOCK polymorphism associated with human diurnal preference. **Sleep**. v 21; n. 6; p. 569-576. (1998).
- Konopka RJ & Benzer S. Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v 68; n. 9; p. 2112-2116. (1971).
- Liu C, Weaver DR, Strogatz SH & Reppert SM. Cellular construction of a circadian clock: period determination in the suprachiasmatic nuclei. **Cell**. v 91; n. 6; p. 855-860. (1997).
- Liu H, Prugnolle F, Manica A & Balloux F. A geographically explicit genetic model of worldwide human-settlement history. **American journal of human genetics**. v 79; n. 2; p. 230-237. (2006).
- Lowrey PL, Shimomura K, Antoch MP, Yamazaki S, Zemenides PD, Ralph MR et al. Positional syntenic cloning and functional characterization of the mammalian circadian mutation tau. **Science**. v 288; n. 5465; p. 483-492. (2000).

- Lowrey PL & Takahashi JS. Genetics of the mammalian circadian system: Photic entrainment, circadian pacemaker mechanisms, and posttranslational regulation. **Annu Rev Genet.** v 34; n. p. 533-562. (2000).
- Mansour HA, Wood J, Logue T, Chowdari KV, Dayal M, Kupfer DJ et al. Association study of eight circadian genes with bipolar I disorder, schizoaffective disorder and schizophrenia. **Genes Brain Behav.** v 5; n. 2; p. 150-157. (2006).
- Marques N & Menna-Barreto LS. Cronobiologia: Principios e Aplicações. São Paulo: **Edusp: Editora da Universidade de São Paulo.** p (2003).
- Mishima K, Tozawa T, Satoh K, Saitoh H & Mishima Y. 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.** v 133B; n. 1; p. 101-104. (2005).
- Moore RY, Speh JC & Leak RK. Suprachiasmatic nucleus organization. **Cell Tissue Res.** v 309; n. 1; p. 89-98. (2002).
- Mori M, Yamada R, Kobayashi K, Kawaida R & Yamamoto K. Ethnic differences in allele frequency of autoimmune-disease-associated SNPs. **J Hum Genet.** v 50; n. 5; p. 264-266. (2005).
- Nadkarni NA, Weale ME, von Schantz M & Thomas MG. Evolution of a length polymorphism in the human PER3 gene, a component of the circadian system. **J Biol Rhythms.** v 20; n. 6; p. 490-499. (2005).
- Pedrazzoli M, Louzada FM, Pereira DS, Benedito-Silva AA, Lopez AR, Martynhak BJ et al. Clock polymorphisms and circadian rhythms phenotypes in a sample of the Brazilian population. **Chronobiol Int.** v 24; n. 1; p. 1-8. (2007).
- Pereira DS, Pedrazzoli M, Koike Bdel V, Louzada FM, Benedito-Silva AA, Lopez AR et al. The G619A Aa-nat gene polymorphism does not contribute to sleep time variation in the Brazilian population. **Behav Genet.** v 37; n. 4; p. 637-638. (2007).
- Pereira DS, Pedrazzoli M & Tufik S. Moléculas que Marcam o Tempo: Implicações para os fenótipos circadianos. **Revista Brasileira de Psiquiatria.** v 31; n. 1; p. 63-71. (2009).
- Pereira DS, Tufik S, Louzada FM, Benedito-Silva AA, Lopez AR, Lemos NA et al. Association of the length polymorphism in the human Per3 gene with the delayed sleep-phase syndrome: does latitude have an influence upon it? **Sleep.** v 28; n. 1; p. 29-32. (2005).
- Preitner N, Damiola F, Lopez-Molina L, Zakany J, Duboule D, Albrecht U et al. The orphan nuclear receptor REV-ERB α controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. **Cell.** v 110; n. 2; p. 251-260. (2002).

- Ralph MR & Menaker M. A mutation of the circadian system in golden hamsters. **Science**. v 241; n. 4870; p. 1225-1227. (1988).
- Reppert SM & Weaver DR. Coordination of circadian timing in mammals. **Nature**. v 418; n. 6901; p. 935-941. (2002).
- Ribeiro D. The Brazilian People: The Formation and the Meaning of Brazil. Florida: **University Press of Florida** p(2000).
- Ridley M. Evolução. Porto Alegre: **Artmed**. p 752. (2006).
- Robilliard DL, Archer SN, Arendt J, Lockley SW, Hack LM, English J et al. The 3111 Clock gene polymorphism is not associated with sleep and circadian rhythmicity in phenotypically characterized human subjects. **J Sleep Res**. v 11; n. 4; p. 305-312. (2002).
- Roenneberg T, Kumar CJ & Merrow M. The human circadian clock entrains to sun time. **Curr Biol**. v 17; n. 2; p. R44-45. (2007).
- Rusak B, Robertson HA, Wisden W & Hunt SP. Light pulses that shift rhythms induce gene expression in the suprachiasmatic nucleus. **Science**. v 248; n. 4960; p. 1237-1240. (1990).
- Sai K, Saito Y, Itoda M, Fukushima-Uesaka H, Nishimaki-Mogami T, Ozawa S et al. Genetic variations and haplotypes of ABCC2 encoding MRP2 in a Japanese population. **Drug Metab Pharmacokinet**. v 23; n. 2; p. 139-147. (2008).
- Sato TK, Panda S, Miraglia LJ, Reyes TM, Rudic RD, McNamara P et al. A functional genomics strategy reveals Rora as a component of the mammalian circadian clock. **Neuron**. v 43; n. 4; p. 527-537. (2004).
- Sawyer LA, Sandrelli F, Pasetto C, Peixoto AA, Rosato E, Costa R et al. The period gene Thr-Gly polymorphism in Australian and African *Drosophila melanogaster* populations: implications for selection. **Genetics**. v 174; n. 1; p. 465-480. (2006).
- Shearman LP, Sriram S, Weaver DR, Maywood ES, Chaves I, Zheng B et al. Interacting molecular loops in the mammalian circadian clock. **Science**. v 288; n. 5468; p. 1013-1019. (2000).
- Shearman LP & Weaver DR. Photic induction of Period gene expression is reduced in Clock mutant mice. **Neuroreport**. v 10; n. 3; p. 613-618. (1999).
- Shearman LP, Zylka MJ, Reppert SM & Weaver DR. Expression of basic helix-loop-helix/PAS genes in the mouse suprachiasmatic nucleus. **Neuroscience**. v 89; n. 2; p. 387-397. (1999).
- Smith MR, Burgess HJ, Fogg LF & Eastman CI. Racial differences in the human endogenous circadian period. **PLoS One**. v 4; n. 6; p. e6014. (2009).

- Takahashi JS, Hong HK, Ko CH & McDearmon EL. The genetics of mammalian circadian order and disorder: implications for physiology and disease. **Nat Rev Genet.** v 9; n. 10; p. 764-775. (2008).
- Takano A, Uchiyama M, Kajimura N, Mishima K, Inoue Y, Kamei Y et al. A missense variation in human casein kinase I epsilon gene that induces functional alteration and shows an inverse association with circadian rhythm sleep disorders. **Neuropsychopharmacology.** v 29; n. 10; p. 1901-1909. (2004).
- Takao T, Tachikawa H, Kawanishi Y, Mizukami K & Asada T. CLOCK gene T3111C polymorphism is associated with Japanese schizophrenics: a preliminary study. **Eur Neuropsychopharmacol.** v 17; n. 4; p. 273-276. (2007).
- Takumi T, Matsubara C, Shigeyoshi Y, Taguchi K, Yagita K, Maebayashi Y et al. A new mammalian period gene predominantly expressed in the suprachiasmatic nucleus. **Genes Cells.** v 3; n. 3; p. 167-176. (1998).
- Tei H, Okamura H, Shigeyoshi Y, Fukuhara C, Ozawa R, Hirose M et al. Circadian oscillation of a mammalian homologue of the *Drosophila* period gene. **Nature.** v 389; n. 6650; p. 512-516. (1997).
- Toh KL, Jones CR, He Y, Eide EJ, Hinze WA, Virshup DM et al. An hPer2 phosphorylation site mutation in familial advanced sleep phase syndrome. **Science.** v 291; n. 5506; p. 1040-1043. (2001).
- Viola AU, Archer SN, James LM, Groeger JA, Lo JC, Skene DJ et al. PER3 polymorphism predicts sleep structure and waking performance. **Curr Biol.** v 17; n. 7; p. 613-618. (2007).
- Vitaterna MH, King DP, Chang AM, Kornhauser JM, Lowrey PL, McDonald JD et al. Mutagenesis and mapping of a mouse gene, *Clock*, essential for circadian behavior. **Science.** v 264; n. 5159; p. 719-725. (1994).
- von Schantz M. Phenotypic effects of genetic variability in human clock genes on circadian and sleep parameters. **Journal of genetics.** v 87; n. 5; p. 513-519. (2008).
- Xu Y, Padiath QS, Shapiro RE, Jones CR, Wu SC, Saigoh N et al. Functional consequences of a CK1delta mutation causing familial advanced sleep phase syndrome. **Nature.** v 434; n. 7033; p. 640-644. (2005).
- Zhu Y, Brown HN, Zhang Y, Stevens RG & Zheng T. Period3 structural variation: a circadian biomarker associated with breast cancer in young women. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.** v 14; n. 1; p. 268-270. (2005).
- Zou Y, Liao G, Liu Y, Wang Y, Yang Z, Lin Y et al. Association of the 54-nucleotide repeat polymorphism of hPer3 with heroin dependence in Han Chinese population. **Genes Brain Behav.** v 7; n. 1; p. 26-30. (2008).

Zylka MJ, Shearman LP, Weaver DR & Reppert SM. Three period homologs in mammals: differential light responses in the suprachiasmatic circadian clock and oscillating transcripts outside of brain. **Neuron**. v 20; n. 6; p. 1103-1110. (1998).

ABSTRACT

The *Period 3* and *Clock* genes are important components of the mammalian molecular circadian system. Studies have shown association between polymorphisms in these clock genes and circadian phenotypes in different populations. Nevertheless, differences in the pattern of allele frequency and genotyping distribution are systematically observed in studies with different ethnic groups. To investigate and compare the pattern of distribution in a sample of Asian and Caucasian populations living in Brazil, we evaluated two well-studied polymorphisms in the clock genes: a variable number of tandem repeats (VNTR) in *PER3* and a single nucleotide polymorphism (SNP) in *CLOCK*. The aim of this investigation was to search for clues about human evolutionary processes related to circadian rhythms. We selected 109 Asian and 135 Caucasian descendants. The frequencies of the shorter allele (4 repeats) in the *PER3* gene and the T allele in the *CLOCK* gene among Asians (0.86 and 0.84, respectively) were significantly higher than among Caucasians (0.69 and 0.71, respectively). Our results directly confirmed the different distribution of these polymorphisms between the Asian and Caucasian ethnic groups. Given the genetic differences found between groups, two points became evident: first, ethnic variations may have implications for the interpretation of results in circadian rhythm association studies, and second, the question may be raised about which evolutionary conditions shaped these genetic clock variations.

Key words: *PER3* gene; *CLOCK* gene; Circadian rhythms; Asian; Caucasian; Ethnic.