

BRUNA DEL VECHIO KOIKE

**“RASTREAMENTO DE POLIMORFISMOS NO GENE *AANAT* E
SUAS ASSOCIAÇÕES COM A PREFERÊNCIA DIURNA”**

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

São Paulo
2009

BRUNA DEL VECHIO KOIKE

**“RASTREAMENTO DE POLIMORFISMOS NO GENE *AANAT* E
SUAS ASSOCIAÇÕES COM A PREFERÊNCIA DIURNA”**

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

Orientador: Prof Dr Sergio Tufik
Coorientador: Prof Dr Mario Pedrazzoli

São Paulo
2009

Koike, Bruna Del Vechio

Rastreamento de polimorfismos do gene *AANAT* e suas associações com a preferência diurna./ Bruna Del Vechio Koike. -- São Paulo, 2009.
xxvii, 108f

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

Título em inglês: Screening for polymorphisms in *AANAT* gene and their association with diurnal preference.

1. Melatonina.
2. Preferência Diurna
3. Arilalquilamina N-Acetiltransferase
4. Polimorfismos Genéticos

BRUNA DEL VECHIO KOIKE

**“RASTREAMENTO DE POLIMORFISMOS NO GENE *AANAT* E
SUAS ASSOCIAÇÕES COM A PREFERÊNCIA DIURNA”**

Banca Examinadora:

Prof. Dr. John Fontenele Araujo

Prof. Dra. Maria Laura Nogueira Pires

Prof. Dra. Ana Maria de Lauro Castrucci

Suplente:

Prof. Dr. João Bosco Pesquero

Aprovado em: ___/___/___

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PSICOBIOLOGIA**

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

Coordenadora do Curso de Pós-graduação: Profa. Dra. Maria Gabriela Menezes de Oliveira

Dedico essa tese a minha querida mãe, Gordi,
que me deu todo o seu amor, apoio e compreensão a vida inteira.
Vibrou muito e se esforçou demais para que tudo sempre corresse bem.
Foi meu chão, meu teto e as paredes que me confortaram e abrigaram sempre.

Essa conquista é NOSSA!!

Te amo muito, mais que o mundo!

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Danyella Silva Pereira, que com sua inteligência e paciência me ensinou muito (quase tudo, para falar a verdade). Esteve sempre ao meu lado durante todo esse mestrado passando-me seus conhecimentos, lembrando-me das responsabilidades, dando dicas e idéias cruciais, me corrigindo, apoiando e incentivando e, o mais importante, me presenteando com sua valiosa amizade. Muito obrigada Dany, você é demais!!

Ao Mario Pedrazzoli, que me admitiu em seu laboratório, me ajudou muito e sempre acreditou no meu trabalho. Além da amizade e confiança que sempre me ofereceu.

Ao Professor Sergio Tufik que apostou em mim e sem sua preciosa ajuda não teria conseguido trilhar este caminho acadêmico que sempre desejei. Obrigada professor, sua ajuda foi fundamental!

A Josy Carolina pela companhia, amizade, perrengues, cervejinhas, fofocas para descontrair, brigas, baladas, almoços, roles, etc, e seu inestimável conhecimento em neurociências que de grego passou a ser bem compreensível para mim (com uma ajudinha do curso da Tati Ferreira).

A Diva, Renata, Ana Barbosa, Luiz, Flavia, Rosa que tiveram que me agüentar todos esses anos os azucrinando com perguntas e falando sem parar no laboratório, atrapalhando a concentração de todos. Além de todo o apoio e ajuda.

Aos meus amigos pessoais, o meu mais profundo agradecimento por sempre incentivarem minhas escolhas e também por me aguentarem falando de neurociências em horas não tão oportunas, sobre meus grilos, idéias, planos e problemas. E principalmente por me permitirem compartilhar momentos e sentimentos incríveis ao longo de anos de amizade.

Aos meus amigos do departamento que me proporcionaram muitos momentos de curtição e também me ensinaram muito tanto profissional quanto pessoalmente.

A todos os professores do Departamento de Psicobiologia, os quais se empenharam em suas aulas transmitindo o conhecimento e permitindo o desenvolvimento de idéias nas cabeças dos alunos.

A todos os funcionários da Psicobiologia, meu profundo agradecimento por todo o suporte.

Este trabalho recebeu apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo nº 06/11379-1, CEPID, processo nº 98/14303-3, e da Associação Fundo de Incentivo à Psicofarmacologia (AFIP).

Lista de Figuras

Figura 1. Ilustração de corte sagital do cérebro indicando a localização do quiasma óptico, núcleos supraquiasmáticos, hipotálamo e glândula pineal.....	4
Figura 2. Esquema da via síntese de melatonina, indicando em qual fase ocorrem as reações.....	7
Figura 3. Esquema da via sinalizadora para a secreção de melatonina....	8
Figura 4. Esquema representativo do cromossomo 17 e gene <i>Aanat</i>	11
Figura 5. Esquema da estrutura da AANAT ilustrando os domínios funcionais da proteína.....	12
Figura 6. Ilustração da ação da enzima AANAT	13
Figura 7. Figura representativa da estrutura da molécula da AANAT ligada a um dímero da proteína 14-3-3	14
Figura 8. Esquema representativo do gene <i>Aanat</i> , com seus íntrons e éxons e polimorfismos descritos para esse gene.....	18
Figura 9. Gel de agarose 1% mostrando os amplicons da região promotora do gene <i>Aanat</i>	24
Figura 10. Esquema ilustrando a formação dos homoduplex e heteroduplex.....	25
Figura 11. Exemplo de cromatograma gerado pelo DHPLC.....	29
Figura 12. Cromatograma demonstrando o padrão de detecção de mutação no DHPLC para a região amplificada do éxon 1 do gene <i>Aanat</i>	34

Figura 13. Eletroferograma obtido por meio de seqüenciamento direto mostrando o polimorfismo encontrado no éxon 1.....	35
Figura 14. Cromatograma demonstrando o padrão de detecção de mutação no DHPLC para a região amplificada do éxon 2 do gene <i>AANAT</i>	36
Figura 15. Eletroferogramas obtidos por meio de seqüenciamento direto mostrando onde está o polimorfismo de T/C encontrado, tanto na fita sentido 5'-3' (A) quanto na fita reversa (B).....	37
Figura 16. Cromatograma demonstrando o padrão de detecção de mutação no DHPLC para a região amplificada do éxon 3 do gene <i>AANAT</i>	38
Figura 17. Eletroferogramas obtidos por meio de seqüenciamento direto mostrando o polimorfismo de T/A descrito nos bancos de dados.....	39
Figura 18. Cromatograma demonstrando o padrão de detecção de mutação no DHPLC para a região amplificada do éxon 4 do gene <i>AANAT</i>	40
Figura 19. Eletroferogramas obtidos por meio de seqüenciamento direto mostrando o polimorfismo de C/A na posição 777.....	40
Figura 21. Gráfico gerado pelo software Navigator indicando a porcentagem de denaturação a 50°C da fita de DNA.....	41
Figura 22. Cromatograma demonstrando o padrão de detecção de mutação no DHPLC para a região promotora do gene <i>AANAT</i> . Na temperatura de 50°C, na fase de análise do PCR.....	42

Figura 23. Cromatograma demonstrando o padrão de detecção de mutação no DHPLC para a região promotora do gene <i>AANAT</i> a 65°C.....	42
Figura 24. Eletroferogramas obtidos por meio de seqüenciamento direto mostrando o polimorfismo de G/C.....	43
Figura 25. Esquema representativo do gene <i>AANAT</i> e todos os polimorfismos encontrados neste estudo.....	43
Figura 26. Esquema resultante da análise de haplótipos	46

Lista de Tabelas

Tabela 1. Tabela mostrando os primers <i>forward</i> e <i>reverse</i> utilizados para cada região amplificada.....	22
Tabela 2: Tabela mostrando as condições de amplificação das PCRs.....	23
Tabela 3. Temperaturas utilizadas no DHPLC.....	27
Tabela 4. Características dos grupos utilizados nesse estudo.....	32
Tabela 5. Tabela resumo, mostrando todas as alterações do gene <i>AANAT</i>	33
Tabela 6. Frequência alélica para o polimorfismo A12G do gene <i>AANAT</i>	35
Tabela 7. Frequência alélica do polimorfismo rs61739395 do gene <i>AANAT</i>	37
Tabela 8. Frequência alélica do polimorfismo rs4646261 do gene <i>AANAT</i>	39
Tabela 9. Frequência alélica do polimorfismo rs4238989 da região promotora do gene <i>AANAT</i>	43
Tabela 10. Tabela geral das frequências genotípicas encontradas.....	44
Tabela 11. Haplótipos formados a partir dos polimorfismos encontrados no gene <i>AANAT</i> e suas frequências.....	47

Lista de Abreviaturas

AANAT	Arilalquilamina N-acetiltransferase
AC	Adenil Ciclase
acetil CoA	Acetil Coenzima A
AMPc	Adenosina Monofosfato cíclica
ATP	Adenosina Trifosfato
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CREB	Proteína de Ligação responsiva ao elemento AMPc
DHPLC	Cromatografia Líquida de Alta Performance Denaturante
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
GABA	Ácido gama aminobutírico
GCS	Gânglio Cervical Superior
HIOMT	Hidroxitindol-O-metiltransferase
IML	Coluna Intermédio Lateral
MgCl₂	Cloreto de Magnésio
MT1	Receptor de Melatonina 1
MT2	Receptor de Melatonina 2
NSQs	Núcleos Supraquiasmáticos
PACAP	Peptídeo ativador da pituitária adenil ciclase
PCR	Reação de Polimerase em Cadeia
PKA	Proteína Kinase A
PKC	Proteína Kinase C

PVH	Núcleo Paraventricular do Hipotálamo
RNA	Ácido Ribonucléico
RNA_m	Ácido Ribonucléico Mensageiro
SFAS	Síndrome de Fase Atrasada do Sono
SNP	do inglês <i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
SP1	Special Protein 1
UNIFESP	Universidade Federal de São Paulo
UV	Ultravioleta
VIP	Peptídeo Intestinal Vasoativo

RESUMO

Arilalkilamina N-Acetiltransferase (AANAT) é a enzima passo-limitante da via de síntese da melatonina. Polimorfismos no gene *AANAT* podem alterar a taxa de síntese e causar alterações no ritmo circadiano dos indivíduos. O objetivo deste trabalho foi realizar o rastreamento ao longo do gene *AANAT* e identificar quais polimorfismos estão presentes na população brasileira e buscar a associação dos polimorfismos encontrados com a preferência diurna. Para isso, foram selecionados indivíduos com preferência diurna extrema de acordo com a pontuação atingida no questionário de Horne-Ostberg. Os DNAs foram amplificados por reação de polymerase em cadeia (PCR) e analisados pela metodologia de cromatografia líquida de alta pressão denaturante (DHPLC). Foram realizados testes de associação para cada SNP encontrado e também a análise de haplótipos. Um total de seis polimorfismos foi encontrado nessa amostra da população brasileira. Sendo dois deles inéditos na literatura e nos bancos de dados. Todos os polimorfismos do gene *AANAT* encontrados nessa amostra, exceto um, apresentaram frequências bastante baixas. O polimorfismo mais frequente foi o C-263G que está localizado na região promotora do gene. Este polimorfismo é caracterizado pela mudança de apenas uma base (C para G) na posição -236, exatamente no sítio de ligação do fator de transcrição SP1, indicando que este polimorfismo pode vir a modular a taxa de expressão do gene *AANAT* com possíveis consequências na temporalidade da curva de secreção de melatonina. O alelo -236G é mais presente no grupo dos vespertinos extremos (~49%) do que no grupo dos matutinos extremos (~36%), no entanto a análise estatística revela uma diferença limitrofe para estas proporções

($p= 0,06$). O presente trabalho sugere que o gene *AANAT* é bastante conservado, visto que encontramos somente alguns polimorfismos e com frequência bastante rara na população brasileira. Um ponto importante deste trabalho foi a descoberta de dois novos polimorfismos no gene *AANAT*, A12G e C890T. O polimorfismo encontrado na região promotora do gene é o polimorfismo mais frequente na população estudada e apresentou uma associação limítrofe com os cronotipos extremos, portanto mais estudos são necessários a fim de se estabelecer a associação desse polimorfismo com a preferência diurna.

SUMÁRIO

Dedicatória	v
Agradecimentos	vii
Lista de Figuras	xii
Lista de Tabelas	xvi
Lista de Abreviaturas	xvii
Resumo	xxi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Melatonina.....	4
1.2. Síntese da Melatonina.....	6
1.3. AANAT (arilalquilamina N-acetiltransferase).....	10
1.4. Polimorfismos da AANAT.....	14
2. OBJETIVOS	18
3. MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1. Sujeitos.....	21
3.2. Extração de DNA de sangue periférico.....	21
3.3. Purificação do DNA.....	22
3.4. Planejamento dos Primers.....	23
3.5. Padronização das reações.....	24
3.6. Padronização no DHPLC.....	24
3.6.1. Uma breve introdução a metodologia.....	24

3.7. PCR Real Time.....	29
3.8. Seqüenciamento Direto.....	29
3.9. Análise de resultados.....	30
4. Resultados.....	31
4.1. Sujeitos.....	32
4.2. Amplificação dos fragmentos.....	32
4.3. Polimorfismos no gene AANAT.....	32
4.3.1. Éxon 1.....	34
4.3.2. Éxon 2.....	35
4.3.3. Éxon 3.....	37
4.3.4. Éxon 4.....	39
4.3.5. Região Promotora.....	41
4.4. Associações dos polimorfismos com o cronotipo.....	44
4.6. Desequilíbrio de ligação e análise por haplótipos.....	45
5. DISCUSSÃO.....	48
6. CONCLUSÕES.....	60
7. ANEXOS.....	62
7.1. Aprovação do CEP.....	63
7.2. Extração de DNA.....	65
7.3. Purificação de DNA.....	67
7.4. Concentração das reações de PCR.....	68
7.5. Protocolos das reações de PCR.....	69
7.6. Protocolo de seqüenciamento.....	70

7.7. Fragmentos amplificados..... 71

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 73

Abstract

1. INTRODUÇÃO

Praticamente todos os seres vivos apresentam algum tipo de oscilação regular em seu comportamento ou seus processos de regulação fisiológicos. Estas oscilações regulares são derivadas de mecanismos biológicos que produzem o padrão cíclico e estão associadas à modulação de eventos bioquímicos, fisiológicos e comportamentais que participam e estão intrinsecamente ligados a manutenção da vida e a interação e respostas adequadas aos sinais ambientais. Podemos citar como alguns exemplos o desenvolvimento embrionário, a reprodução, a expectativa de vida, o comportamento alimentar, o ciclo de atividade/ repouso nas diferentes espécies (para revisão ver Schibler e cols, 2005 e Marques e Menna-Barreto, 2003). Tais oscilações regulares praticamente ubíquas nos seres vivos podem ser denominadas ritmos biológicos e se manifestam em períodos que vão de milissegundos até anos, e são classificados como circadianos, infradianos ou ultradianos.

Os ritmos circadianos são oscilações de aproximadamente 24 horas, que se expressam em muitas variáveis fisiológicas como a temperatura corporal e o ciclo sono-vigília. A geração desses ritmos é controlada por um sistema de temporização interno, podendo ser sincronizados por pistas ambientais, como por exemplo, o ciclo claro/escuro dado pela rotação da terra em torno de si mesma e em torno do sol, além de fatores sociais (para revisão ver Schibler e cols, 2003).

A sincronização dos ritmos biológicos com as pistas cíclicas ambientais permite a antecipação destas últimas e maximiza chances de sobrevivência e reprodução. Este processo de sincronização às pistas ambientais é espécie-específico e idiossincrático dentro da população de uma mesma espécie, o que

estabelece diferenças individuais e, portanto padrões particulares de relações de fase entre o sistema temporizador interno e os ciclos ambientais.

Diferenças individuais na fase do sono e na preferência diurna para o desempenho das atividades estão associadas com variações nos processos circadianos e homeostáticos (Dijk e Schantz, 2005). Segundo Horne e Ostberg (1976), a população humana pode ser dividida em 3 tipos básicos de preferência para início e término da fase de sono e disposição para a realização de atividades, que são denominados cronotipos, a saber: os matutinos que acordam naturalmente mais cedo, aptos a desempenhar qualquer atividade logo pela manhã, preferem dormir mais cedo; os vespertinos que tendem a acordar e deitar mais tarde, dando preferência a desempenhar suas atividades à tarde ou à noite; e os chamados intermediários que se situam entre os dois extremos anteriores. Estes autores desenvolveram um questionário para avaliar o caráter de matutividade e vespertinidade dos indivíduos, usado até hoje, em várias partes do mundo.

Em mamíferos, o sistema de temporização compreende os núcleos supraquiasmáticos do hipotálamo (NSQs), uma das principais estruturas envolvidas na sincronização pela luz, que além de participarem da regulação do ritmo circadiano do ciclo sono/vigília, influenciam a atividade cardiovascular, temperatura corporal, acuidade do sistema sensorial, fluxo plasmático renal, sistema imune, peristaltismo intestinal, metabolismo hepático e funcionamento do sistema endócrino (Schibler e cols, 2003; Moore, 2007 para revisão).

Os núcleos supraquiasmáticos são dois aglomerados de células do sistema nervoso central e estão localizadas na base do cérebro (Figura 1), sobre o cruzamento das fibras nervosas originárias dos olhos, especificamente acima do quiasma óptico (Harrington e Mistlberger, 2000). Os NSQs recebem informações

sobre o nível de luminosidade do ambiente através do trato retino-hipotalâmico por meio das células ganglionares da retina, que expressam melanopsina. Sendo a retina a única estrutura sensível ao sinal luminoso, os osciladores circadianos nas células de todo o organismo devem ser sincronizados pelos sinais neuronais gerados neste sistema (Schibler e cols, 2005). Dos núcleos supraquiasmáticos partem diversas vias eferentes, e dentre essas a que envolve a secreção de melatonina (Harrington e Mistlberger, 2000).

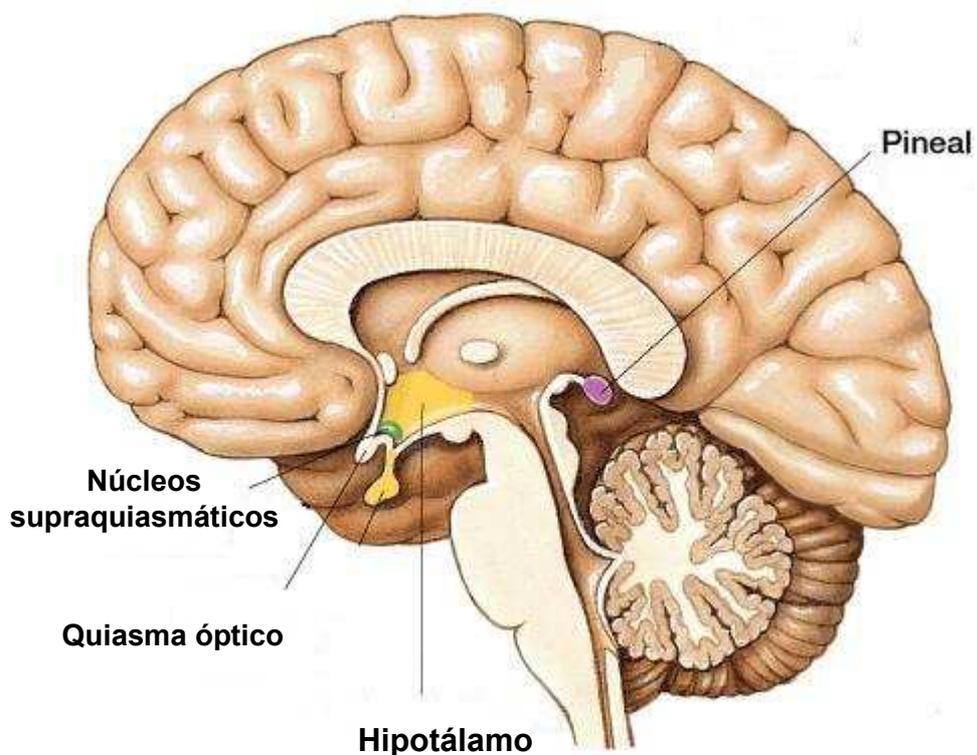


Figura 1. Ilustração de corte sagital do cérebro indicando a localização do quiasma óptico, núcleos supraquiasmáticos, hipotálamo e glândula pineal (Modificado de <http://history.wisc.edu/sommerville/351/351images/pineal.jpg>).

1.1. MELATONINA

A melatonina é o hormônio mensageiro que transforma a informação luminosa em sinais endócrinos. Está presente em todos os vertebrados, e é ritmicamente secretada principalmente pela glândula pineal, e também em outras células ou

orgãos como leucócitos, glândula pituitária, trato gastrointestinal, pele e retina também podem contribuir na secreção de melatonina em algumas espécies (Hardeland, 2005). Em seres humanos sua secreção pela pineal ocorre à noite, logo após o início da fase escura, atingindo os maiores valores entre 2 e 4 horas da manhã, caindo gradualmente na segunda metade da noite. Durante o período diurno, a secreção de melatonina é muito baixa (Illnerova, 1991).

Na população humana existe uma variabilidade interindividual na produção e liberação de melatonina, sendo que indivíduos matutinos têm o pico de liberação de melatonina mais cedo que os indivíduos vespertinos (Duffy e cols, 1999). Este hormônio atua principalmente em dois subtipos de receptores (MT1 e MT2), e desempenha um importante papel na sinalização interna do organismo do ciclo claro/escuro ambiental, participando, portanto do processo de sincronização. (Cagnacci e cols, 1997; Czeiler e cols, 2000; Reiter, 1993).

Não se sabe ainda a razão pela qual existe essa diferença interindividual e se tem sugerido que a produção diária de melatonina seja geneticamente determinada (Ying e cols, 2004). O fato de existir uma determinação genética parcial das características dos cronotipos demonstrada por correlações entre a preferência diurna e polimorfismos em genes relógio (Pereira e cols, 2009) reforça o ponto de vista de que genes associados à síntese, liberação e ao efeito da melatonina nas células participem de alguma forma da determinação do cronotipo.

Uma série de fatores está envolvida na liberação da melatonina, sendo o principal, o ciclo claro/escuro, pois a melatonina é liberada em maior quantidade à noite (Reiter, 2003). A quantidade de melatonina circulante aumenta cerca de dez vezes em todos os vertebrados no período escuro. E esse ritmo circadiano nos níveis de melatonina reflete, em grande escala, a atividade da enzima arilalquilamina

N-acetiltransferase (AANAT). O importante papel regulador da AANAT fez dela um objeto de grande interesse de estudo na pesquisa sobre a transdução do sinal, da bioquímica e da neuroquímica da melatonina (Coon, 1995 e 1996).

1.2. SÍNTESE DA MELATONINA

A melatonina é sintetizada a partir do aminoácido triptofano, que é captado pelos pinealócitos e, com a ação sucessiva das enzimas triptofano-hidroxilase e descarboxilase de aminoácidos aromáticos, é convertido em 5-hidroxitriptofano e em seguida em serotonina na fase clara do dia (Figura 2). A serotonina é um neurotransmissor monoaminérgico envolvido em várias funções cerebrais como controle de humor, regulação do sono e da temperatura corporal, ansiedade, abuso de drogas e comportamento sexual (Walter e Bader, 2003; Golombek e cols, 1997). Na fase escura, a serotonina sofre ação da enzima AANAT, que transfere um grupo acetil, retirado de uma molécula de acetil-coenzima A (acetil CoA), para a molécula serotonina (Figura 6), a qual finalmente é metilada pela enzima HIOMT (hidroxindol-O-metiltransferase) resultando em melatonina (Sudgen, 1989; Golombek e cols, 1997).

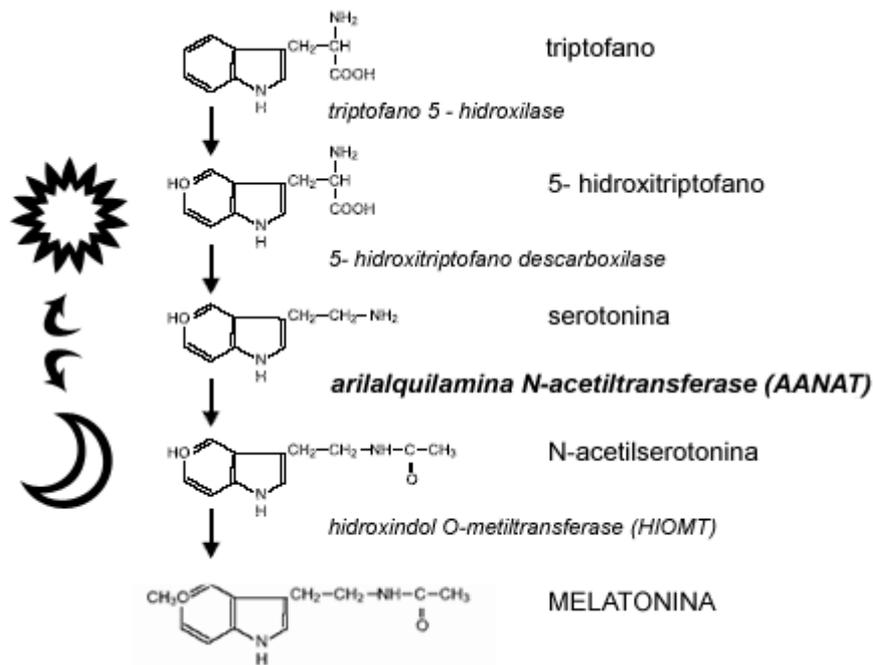


Figura 2. Esquema da via síntese de melatonina, indicando em qual fase ocorrem as reações (Modificado de Lakshminarayan e cols, 2004).

A sinalização para que a síntese da melatonina inicie, se dá pela redução da intensidade luminosa incidente sobre os olhos ao anoitecer. Da retina para os NSQs há uma via direta; o trato retino-hipotalâmico. As células ganglionares da retina são responsivas a luz, pois possuem um fotopigmento chamado melanopsina, e liberam glutamato e PACAP (peptídeo hipofisário ativador da adenil ciclase) sinalizando para os núcleos supraquiasmáticos (NSQ). Durante a fase clara do dia, os NSQs recebem essa sinalização e ficam ativos liberando ácido gama aminobutírico (GABA) nos neurônios do núcleo paraventricular, inibindo assim a via de conexão com a glândula pineal. Com a redução da intensidade luminosa incidente, toda a sinalização através do trato retino-hipotalâmico é reduzida, liberando menos glutamato e PACAP nos núcleos supraquiasmáticos. Dessa forma, os neurônios do NSQ tornam-se menos ativos, liberam menos GABA e peptídeos co-localizados (vasopressina e VIP) no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVH). O PVH por sua vez possui neurônios

glutamatérgicos, co-localizados com vasopressina e ocitocina, que se projetam para a coluna intermédia lateral (IML) excitando-a. As projeções da IML liberam acetilcolina no gânglio cervical superior (GCS), que através do *nervii coronari* sinaliza a liberação de noradrenalina na glândula pineal, ativando os receptores α - e β - adrenérgicos (Kalsbeek e cols, 2000; Markus e cols, 2003; Abrahamson e Moore, 2001; Simonneaux e Ribelayga, 2003; Moore, 2007). Podemos visualizar essa via de sinalização na figura 3.

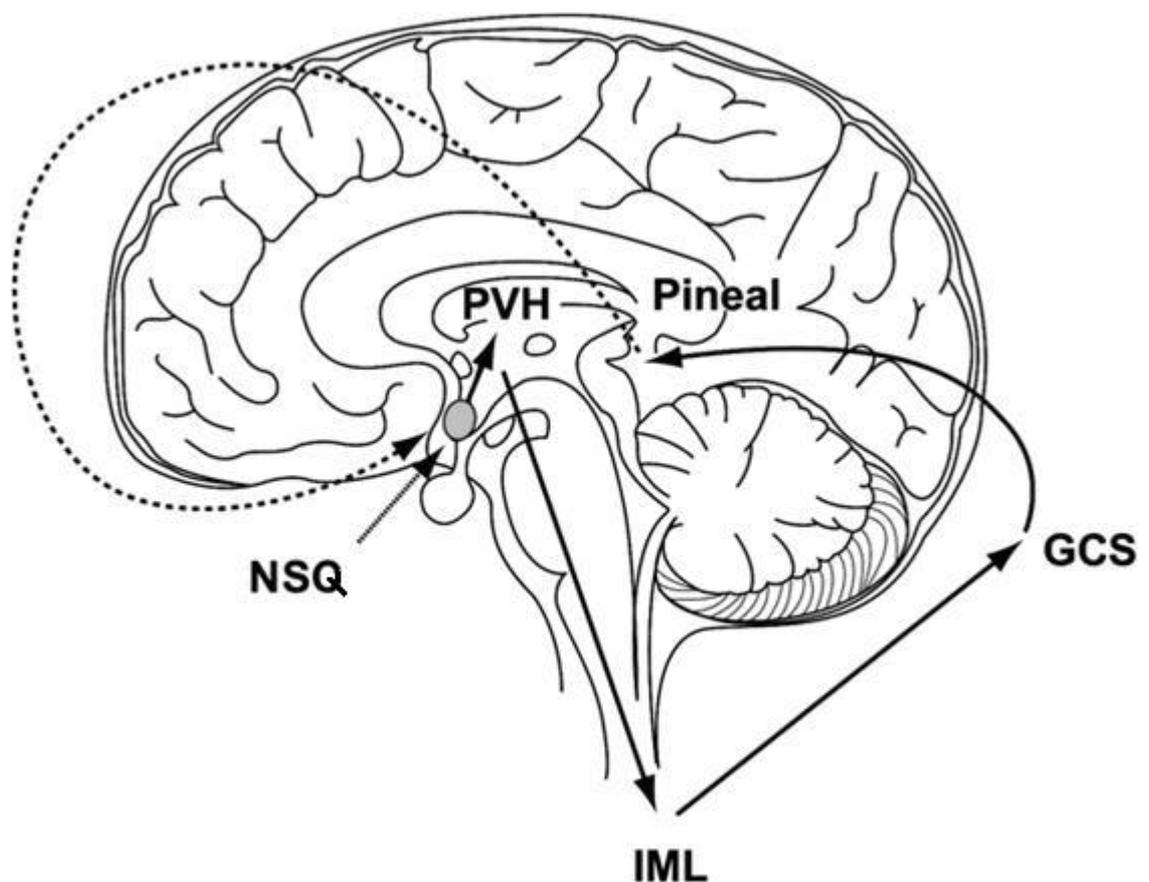


Figura 3. Esquema da via sinalizadora para a secreção de melatonina (Modificado de Moore, 2007).

A noradrenalina é o principal neurotransmissor envolvido na síntese da melatonina, principalmente por meio dos receptores β -adrenérgicos e em menor quantidade pelos receptores α_1 -adrenérgicos. Estes receptores estão localizados na membrana dos pinealócitos, as células endócrinas da glândula pineal (Sudgen,

1989; Reiter, 2003).

A estimulação dos β -adrenoceptores, que são acoplados a proteína Gs, ativa a enzima adenil ciclase (AC) que irá induzir a conversão de ATP em AMP-cíclico (AMPC). O aumento nos níveis de AMPC intracelular leva a ativação funcional da proteína quinase A (PKA). A PKA em seu estado ativo entra no núcleo da célula e fosforila o CREB (*Cyclic AMP Response Element Binding Protein*) que é fator de transcrição e estimula a transcrição da enzima passo limitante na produção de melatonina, a AANAT (Klein e cols, 1997; Roseboom e Klein, 1995). A estimulação β -adrenérgica do AMPC e da AANAT é marcadamente potencializada por ativação de α_1 -adrenoceptor. Os α_1 -adrenoceptores são acoplados a proteína Gq, que ativa fosfolipase C induzindo a produção de inositol trifosfato, que por sua vez induz o aumento intracelular de cálcio levando a ativação da PKC. A PKC age aumentando a produção de AMPC modulando positivamente a AC, potencializando dessa forma a estimulação β -adrenérgica. Entretanto, somente a ativação de α_1 -adrenoceptores não é capaz de aumentar os níveis de AMPC e nem induzir a transcrição da AANAT ou aumentar a síntese de melatonina (Sudgen, 1989; Reiter, 2003)

A melatonina secretada é liberada, difundindo-se rapidamente dos pinealócitos para a malha capilar sendo assim distribuída sistemicamente. Como é lipofílica, a melatonina chega ao sistema nervoso central provavelmente por meio do líquido cefalorraquidiano no terceiro ventrículo (Reiter, 2003; Seabra, 2000).

A melatonina livre é primeiramente é metabolizada no fígado, e depois no rim, para então ser convertida em 6-hidroximelatonina e conjugada ao sulfato, formando a 6-sulfatoximelatonina (principal metabólito), e assim é excretada pela urina (Reiter, 2003; Seabra, 2000).

A produção e a secreção cíclica de melatonina têm sido associadas com o

ciclo sono/vigília, bem como com outros ritmos circadianos. Sendo a AANAT a enzima passo limitante na produção de melatonina, alguns estudos sugerem que a modulação da AANAT possa influenciar na oscilação dos níveis circadianos de melatonina.

1.3. AANAT (arilalquilamina N-acetiltransferase)

O gene *AANAT* em humanos desperta um especial interesse porque pode nos levar a um melhor entendimento do papel da melatonina na fisiologia humana. Mais especificamente, a análise do gene *AANAT* pode revelar mutações ou polimorfismos que possivelmente expliquem a grande variação interindividual nos níveis séricos de melatonina.

A sequência completa do gene *AANAT* em humanos foi descrita por Coon e cols, em 1996. O gene possui 4 éxons e foi mapeado no cromossomo 17q25 (Figura 4). A sequência aberta de leitura codifica uma proteína de 23.2 kDa e mostra uma homologia de aproximadamente 97% com a AANAT de macacos, 84% com a das ovelhas e 90% com a AANAT de ratos. Já foi descrita estar presente em humanos, ratos, ovelhas, macacos, bovinos, hamsters e galinhas (Klein e cols, 1997).

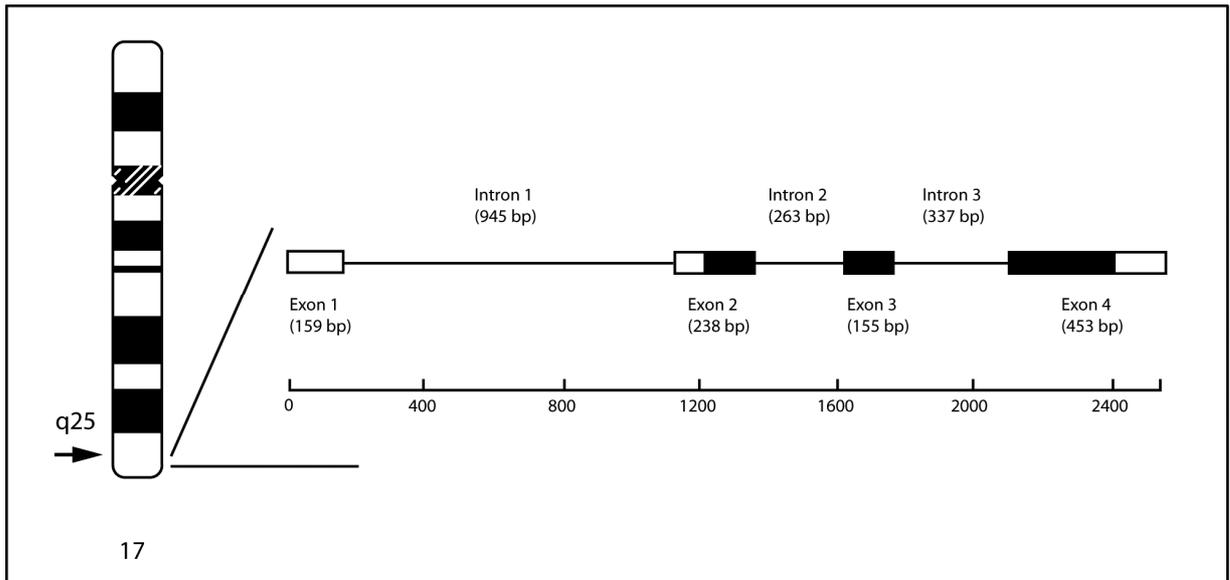


Figura 4. Esquema representativo do gene *AANAT* indicando como estão arranjados os éxons e íntrons com o respectivo número de pares de bases, sendo os retângulos em branco as regiões não traduzidas dos éxons, os retângulos pretos as regiões que serão traduzidas em proteína e as linhas, os íntrons. A esquerda da figura está representado o cromossomo 17 e a localização do gene (17q25) no cromossomo (Pereira, 2007 modificado de Coon e cols, 1996).

A Figura 5 mostra a estrutura da proteína *AANAT*. Ela possui dois sítios de fosforilação para a PKA, um N- e outro C-terminal, que permitem a ligação com a proteína 14-3-3. A porção central da proteína é altamente conservada e chamada de núcleo catalítico. No núcleo catalítico estão o sítio de ligação com a acetilCoA, o sítio de ligação arilalquilamina e um domínio catalítico rico em histidina (Klein e cols, 2003).

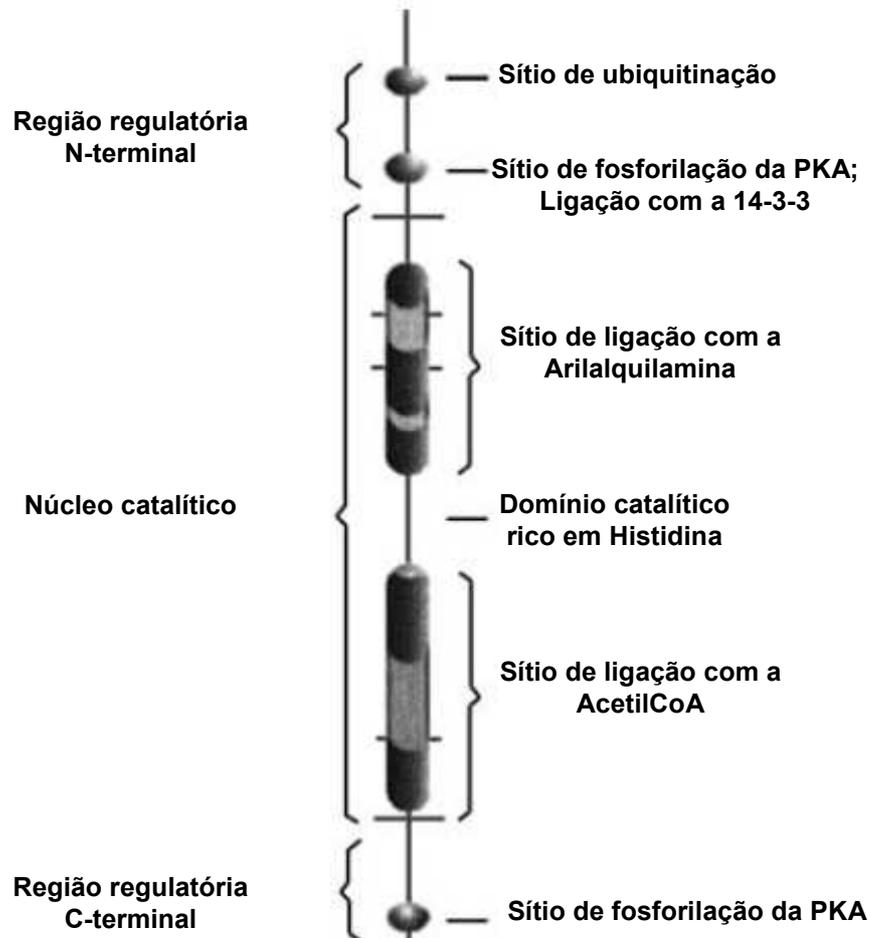


Figura 5. Esquema da estrutura da AANAT ilustrando os domínios funcionais da proteína (modificada de Klein e cols, 2003).

A AANAT primeiramente catalisa a transferência do grupo acetil da Acetil coenzima A (AcCoA) para a primeira amina da serotonina (Figura 6). Essa reação é passo limitante, ou seja, controla a velocidade da síntese de melatonina (Nelson e Cox, 2002; De Angelis e cols, 1998). O produto dessa reação, N-acetilserotonina, é então metilado na posição 5-hidroxi pela HIOMT para produzir a melatonina (De Angelis e cols, 1998).

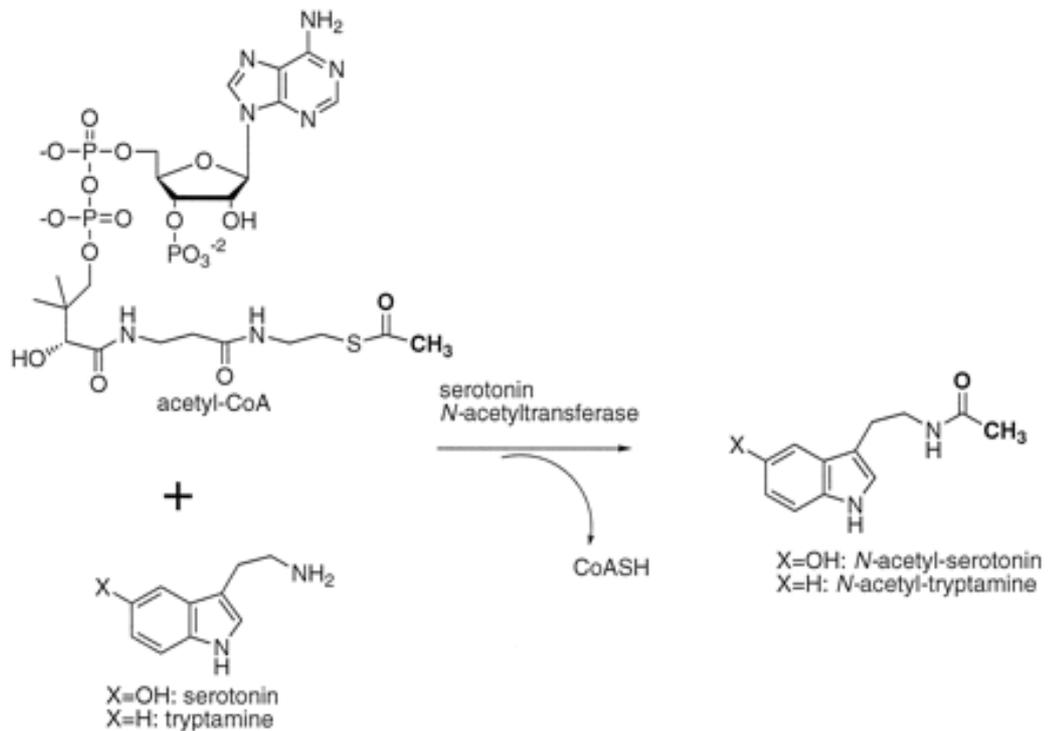


Figura 6. Ilustração da ação da enzima AANAT cuja função é retirar um grupo acetil da molécula Acetil Coenzima A e adicioná-lo a molécula de serotonina (De Angelis e cols, 1998)

A expressão de RNAm da AANAT é alta na pineal de todos os vertebrados. Entretanto, o padrão de expressão varia conforme a espécie. Em primatas não-humanos o RNAm da AANAT não exibe ritmo pronunciado de expressão, indicando que a regulação da produção de melatonina é semelhante a encontrada nos ungulados, onde o RNAm aumenta somente cerca de 1,5 vez a noite. Isso leva a crer que as mudanças na atividade e quantidade de proteína não é gerada pela expressão do RNAm. Parece que a AANAT é produzida continuamente e sua regulação se dá pela inibição da degradação por proteólise proteassomal (Gastel e cols, 1998). Esse tipo de regulação (por proteólise) tem sua importância funcional, pois pode causar rápidas mudanças na concentração da proteína AANAT, na sua atividade e conseqüentemente na produção de melatonina sem mudanças na expressão gênica. Em ratos, regulação da síntese ocorre de outra maneira. O ritmo

de expressão de RNAm é acentuado e reflete a quantidade da proteína AANAT em atividade, bem como a de melatonina secretada (Coon e cols, 2002).

Ganguly e cols (2001) revelaram que o principal mecanismo de regulação na produção de melatonina em primatas envolve modificações pós-traducionais via fosforilação e consequente ligação com a proteína 14-3-3. A fosforilação da região N-terminal da AANAT, no sítio de ligação da PKA, parece ser essencial para a interação direta da AANAT com a 14-3-3 para a formação do complexo 14-3-3/AANAT/14-3-3 e assim tornar a AANAT ativa (Figura 7). Isso explica como a fosforilação, ou quantidade de AMPc, pode rapidamente alterar os efeitos fisiológicos sem mudar a quantidade de proteína pronta.

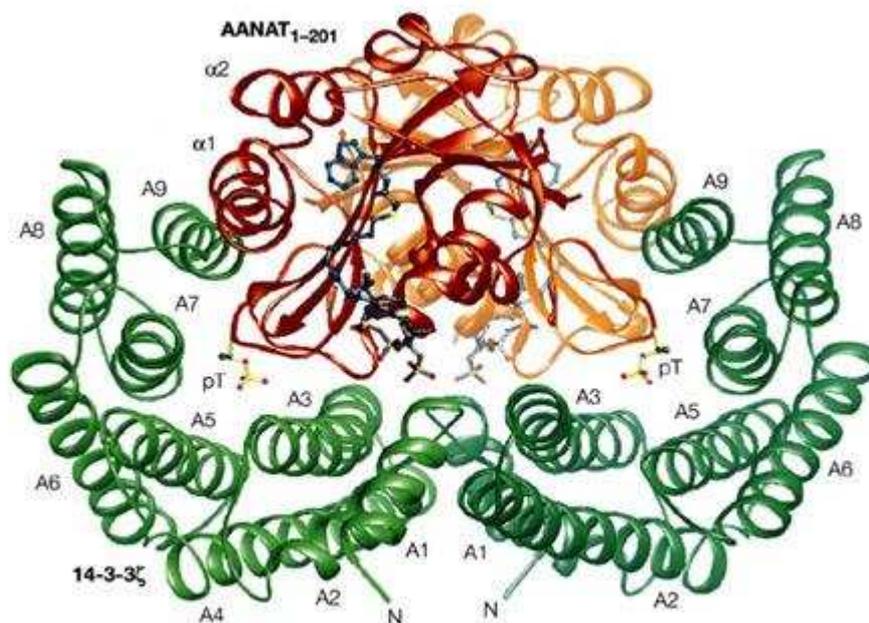


Figura 7. Estrutura da molécula da AANAT em vermelho e laranja, ligada a um dímero de 14-3-3 em verde (Obsil e cols, 2001).

A ligação da AANAT com a proteína 14-3-3 tem vários efeitos na biologia da enzima, mas o mais importante deles é a prevenção da destruição da enzima por proteólise proteossomal. Além de estabilizar a enzima e aumentar a meia-vida da AANAT, a 14-3-3 aumenta a afinidade do complexo pela serotonina, facilitando a reação de acetilação mesmo quando a concentração de serotonina está baixa. Ao mesmo tempo torna o sítio de fosforilação da AANAT inacessível para outras fosfatases enquanto ligada (Klein e cols, 2003).

1.4. Polimorfismos da AANAT

A estrutura da proteína, bem como seus sítios de ligação, são extremamente importantes e influentes na sua atividade e afinidade pelo substrato, como vimos anteriormente. Portanto, é possível que polimorfismos alterem a estrutura e a funcionalidade da proteína podendo causar desregulação (aumento ou redução) na atividade da AANAT.

Alguns polimorfismos para o gene *AANAT* estão depositados nos bancos de dados, como mostra a Figura 8.



Figura 8. Esquema representativo do gene *AANAT*, onde as linhas representam os íntrons e os retângulos os éxons. Em branco a parte não-codificada em proteína e os retângulos em cinza representam a região a ser codificada. O tracejado representa a região promotora do gene. Cada uma das estrelas indica os polimorfismos descritos na literatura para esse gene no banco de dados ensembl (http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/ProtVariations?db=core;g=ENSG00000129673;r=17:71961028-71977793;t=ENST00000250615).

Dada a estreita relação entre a AANAT, melatonina e sono, os pesquisadores têm direcionado a atenção em detectar variações genéticas dos indivíduos com diferentes padrões de sono, numa tentativa de relacionar os polimorfismos desse

gene com a preferência diurna dos indivíduos.

Em estudos realizados em uma amostra da população chinesa foram encontrados alguns polimorfismos, os SNPs (do inglês, Single Nucleotide Polymorphism ou traduzindo para o português polimorfismo de uma base): -542T/G e -263 G/C, na região promotora e o 397 G/A na região não codificante do éxon 4. Destes, somente o SNP -263 G/C parece estar associado predominantemente com o fenótipo vespertino/ curto dormidor. A variante -263C pode interromper o sítio de ligação do fator de transcrição, podendo alterar a regulação da expressão da AANAT e influenciar os níveis de melatonina e conseqüentemente o sono (Wang e cols, 2004).

Hohjoh e cols (2003) encontraram quatro polimorfismos numa amostra da população japonesa: -263 C/G, 619 G/A, 702 C/T e 756 C/T. Destes, estão presentes em regiões codificantes o 619 G/A, 702 C/T e 756 C/T. Enquanto os polimorfismos nas posições 702C/T e 756C/T são substituições sinônimas, não participam de mudanças de aminoácidos, o polimorfismo 619 G/A substitui o aminoácido alanina por treonina na posição 129 da proteína. Os resultados dos genótipos com polimorfismos -263 G/C, 702 C/T e 756 C/T indicaram que não há diferença significativa na frequência desses alelos entre pacientes com Síndrome de Fase Atrasada do Sono (SFAS) e indivíduos controle. Em contrapartida, o alelo 619A (129 Thr) apresentou uma frequência de 16% nos pacientes com SFAS e de apenas 3% nos controles, sugerindo uma associação significativa com a síndrome.

Um estudo realizado pelo nosso grupo em uma amostra da população brasileira (Pereira e cols, 2007) mostrou que o polimorfismo 619 G/A, descrito por Hohjoh e cols (2003), é extremamente raro na nossa população e por isso não deve ter papel algum na gênese da SFAS no Brasil. As frequências alélicas encontradas

na nossa população (0,02% para o alelo A) são bastante diferentes das observadas na população japonesa para o mesmo alelo (3%) (Hohjoh e cols, 2003).

Estudos com genes relógio também nos mostraram que alguns alelos apresentam frequências bem diversas conforme a etnia, como os polimorfismos do gene *PER3* e do gene *CLOCK* (Barbosa e cols, comunicação pessoal).

Como a população brasileira é bastante miscigenada, está localizada em latitude onde a variação sazonal do fotoperíodo é mínima e, além disso, o *zeitgeber* claro/escuro (a variação da intensidade luminosa) é bastante marcante, temos uma amostra singular para estudo genético.

Sendo a AANAT a enzima passo limitante da síntese de melatonina, talvez polimorfismos encontrados nesse gene modifiquem sua a estrutura e função como, por exemplo, a afinidade da proteína com seus ligantes e, portanto, possam influenciar na velocidade e quantidade de melatonina sintetizada, arrastando a curva de secreção, conseqüentemente modulando a preferência diurna.

Todos estes indícios aumentam o interesse científico em verificar se esses polimorfismos de fato existem na população brasileira, e mais, se eles estão influenciando na preferência diurna dos brasileiros.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivos:

- 1) Realizar um rastreamento em busca de polimorfismos ao longo de todos os éxons do gene *AANAT* e da região promotora em uma amostra da população brasileira.
- 2) Verificar se os polimorfismos encontrados estão associados com cronotipos extremos dessa amostra.

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Molecular do Sono do Departamento de Psicobiologia da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP).

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UNIFESP/EPM n° 0106/07 (Anexo 1).

3.1. Sujeitos

Um total de 1289 voluntários das universidades UNIFESP e UNISA responderam o questionário para determinação da preferência diurna (Horne e Ostberg, 1976) adaptado para a língua portuguesa (Benedito-Silva e cols, 1990). 10% dos indivíduos que pontuaram mais e 10% dos indivíduos que pontuaram menos foram selecionados para este estudo. Como a pontuação do HO vai de 18 a 82, os indivíduos que atingiram até 33 pontos foram classificados como vespertinos, e os que fizeram mais de 61 pontos, que foram classificados como matutinos, compondo os dois grupos do estudo. Os indivíduos que não tinham todas as informações pessoais completas (idade, questionário de etnia, preenchimento correto do HO) foram excluídos do estudo.

3. 2. Extração de DNA de sangue periférico

O DNA genômico foi extraído das células brancas do sangue (leucócitos), a partir de amostra de sangue periférico, utilizando a metodologia descrita por Miller e cols, em 1998 (Anexo 2).

3.3. Purificação do DNA

O DNA extraído foi submetido a uma técnica de purificação, para eliminar impurezas que possam interferir no cromatograma, nas reações de PCR ou sequenciamento (Anexo 3).

3.4. Planejamento dos Primers

Foi realizado um trabalho de bioinformática para o desenho e análise da qualidade dos primers, através dos programas Primer 3 (http://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi) e Primer Premier (www.premierbiosoft.com).

Foram desenhados os primers referentes ao éxon 3, éxon 4 e região promotora do gene *AANAT*, os primers referentes aos éxons 1 e 2 estão descritos no artigo de Hohjoh e cols (2003).

Os primers utilizados estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Tabela mostrando os primers forward e reverse utilizados para cada região amplificada.

REGIÃO	PRIMER FORWARD	PRIMER REVERSE
Éxon 1	5'-GTCATCCTGCCTGGGATAGC-3'	5'-TCCATGTCTAGAAGCTCCAAGT-3'
Éxon 2	5'-GATGAGGATGAGACCCCTGT-3'	5'-CCAGAGTGGAGCATCCCTCT-3'
Éxon 3	5'-CCTAACCCCATTTTCCTGT-3'	5'-CCATCTGGCTGACCTCTGTC-3'
Éxon 4	5'-CTGCCTGGGTTGGTGGTT-3'	5'-CAGCACCTCCCATTGTCC-3'
Promotora	5'-GTTTGGTAGGGCAACCTCCTG-3'	5'-GCCTGTGGTGCTGTTAGAGG-3'

3.5. Padronização das reações

A amplificação dos fragmentos foi realizada através da técnica de PCR (*Polimerase Chain Reaction*). As reações foram padronizadas com volume final de 50µl, exceto para o éxon 4 cujo volume final foi de 25µl. Os volumes correspondentes para as concentrações do tampão, dNTP, MgCl₂, primers e Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen) estão no anexo 4.

Para cada par de primers foi padronizada uma temperatura de anelamento ótima, apresentadas na tabela 2.

Tabela 2: Tabela mostrando as temperaturas ótimas de anelamento dos primers encontradas para a PCR, o número de ciclos do protocolo e o tamanho dos fragmentos amplificados para cada éxon.

Éxons gene AANAT	Temperatura de Anelamento	Número de ciclos	Produto da PCR
Éxon 1	58°C	30	276pb
Éxon 2	58°C	30	320pb
Éxon 3	58°C	30	335pb
Éxon 4	61,3°C	38	640pb
Região Promotora	65°C	34	425pb

O protocolo completo das reações de PCR com as condições de ciclagem e temperaturas encontram-se no anexo 5.

Os produtos das PCRs foram analisados em gel de agarose 1%, como exemplo veja a figura a seguir.

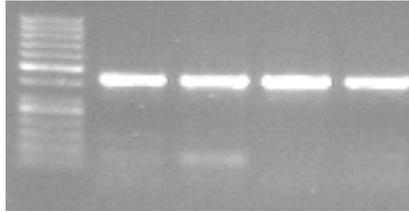


Figura 9. Gel de agarose 1%. À esquerda está o marcador de peso molecular de 50 pares de bases e à direita do marcador estão os amplicons da região promotora do gene *AANAT* com 425 pb.

3.6. Padronização no DHPLC

3.6.1. Uma breve introdução a metodologia

Como o DHPLC não é uma metodologia utilizada de forma corriqueira, a seguir explicaremos a técnica na qual o método é baseado.

Os produtos amplificados por PCR, os quais serão analisados no DHPLC, são submetidos à denaturação aquecidos a 95°C por 5 minutos e resfriados gradativamente até 37°C (-2°C a cada 30 segundos).

Esse procedimento é realizado para que as fitas de DNA se denaturem completamente e se renaturem aleatoriamente. Nas amostras heterozigotas, após a denaturação e renaturação, os alelos se misturam e as bases nitrogenadas não mais se complementam no local do polimorfismo (não formam pontes de hidrogênio) gerando uma espécie de “bolha” entre as fitas de DNA de não-pareamento neste local, o que chamamos de heteroduplex. São essas formações de heteroduplex que são detectadas na cromatografia pelo DHPLC (Figura 10). As amostras homozigotas são compostas somente por nucleotídeos complementares no local do polimorfismo, ou seja, com pareamento perfeito e sem “bolhas”, mostrando um padrão cromatográfico homoduplex.

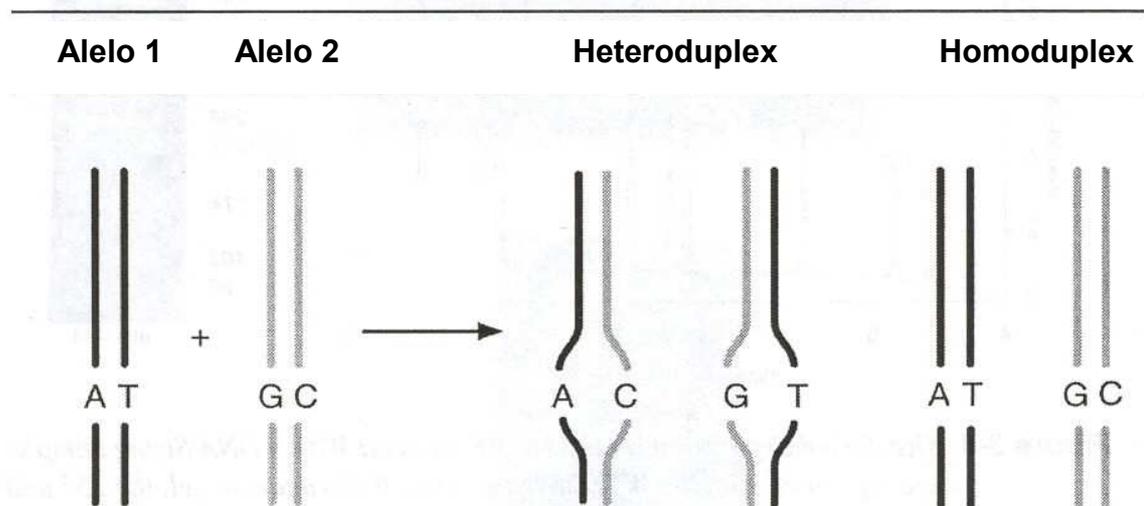


Figura 10. Esquema ilustrando amplificação de um fragmento de DNA polimórfico indicado pela representação das bases nitrogenadas numa dada posição. Supostamente os dois alelos são amplificados na reação de PCR e ambos estão presentes no produto de amplificação. Após o processo de denaturação e renaturação, há a formação de regiões não hibridizadas, os heteroduplex, que são detectados pelo DHPLC.

Após o processo de denaturação e renaturação descrito, aproximadamente 8µl dos produtos são submetidos à cromatografia de fase reversa denaturante no aparelho DHPLC (do inglês - Denaturing High Performance Liquid Chromatography). Para analisar a qualidade da PCR as amostras são injetadas na coluna cromatográfica do DHPLC a 50°C (fase denominada "*double-stranded sizing – single fragment*").

A coluna cromatográfica é de polietileno-divinilbenzeno (fase estacionária) eletrostaticamente neutra e hidrofóbica que não reage com ácidos nucleicos. As combinações de tampões que passam através da coluna carregam-na positivamente (fase móvel), permitem com que ela forme uma ligação e reaja com os ácidos nucleicos. A análise é feita pela capacidade que o fluxo de tampões tem em fixar e depois deslocar gradativamente os fragmentos de DNA da coluna em diferentes

momentos. O sistema detecta o fragmento quando ele sai da coluna, analisando quanto UV é absorvido, o que avalia a concentração do produto, e qual o tempo de deslocamento, ou tempo de passagem pela coluna, desse fragmento. E então é liberado um cromatograma que mostra quanto UV foi absorvido e qual o tempo de deslocamento dos fragmentos de cada amostra (como exemplo, veja figura 11).

Para a detecção dos heteroduplex, fase denominada – “*mutation discovery*” que indica a presença de mutações ou polimorfismos, é utilizada uma temperatura específica para cada fragmento de PCR que é determinada a partir de sua sequência de bases nitrogenadas. Nesta temperatura específica o pressuposto para a análise é que cerca de 50 a 80% da dupla fita de DNA do fragmento tem que estar pareada, o resto denaturado (Huber e cols, 1993). A temperatura utilizada nessa fase é calculada pelo software do aparelho (Navigator software – Transgenomic) baseado na proporção de bases C e G contra A e T presentes no fragmento. Dependendo do tamanho e da composição do fragmento, a análise no DHPLC é realizada em mais de uma temperatura para garantir que todas as partes do fragmento estejam denaturadas de 20% a 80%, pois dessa forma é possível detectar a formação da “bolha” heteroduplex pelo DHPLC. A tabela a seguir traz quais foram as temperaturas escolhidas para a análise.

Tabela 3. Temperaturas utilizadas no DHPLC para a análise de cada um dos fragmentos.

Fragmento	Temperatura(s)
Éxon 1	60°C e 63°C
Éxon 2	62,5°C e 65°C
Éxon 3	63,8°C
Éxon 4	61,1°C, 63,8°C e 66°C
Região Promotora	65°C

O registro de saída da análise na fase de *mutation discovery* é dado também por um cromatograma, o qual mostra um pico único no traçado para amostras não polimórficas, os homoduplex, e mais de um pico para amostras polimórficas, os heteroduplex (como exemplo, veja figura 11).

Como a metodologia identifica lócus polimórficos nos fragmentos de DNA amplificados, mas não permite identificar qual é o polimorfismo, se faz necessário o sequenciamento do fragmento para a identificação da(s) base(s) polimórfica(s) e qual é exatamente a sua posição. Uma vez identificado o polimorfismo através do sequenciamento inicia-se uma nova fase de análise para a diferenciação dos homozigotos.

Como descrito anteriormente o sistema DHPLC detecta os polimorfismos baseado no não pareamento de bases após a renaturação. Em um sistema bi alélico os dois possíveis homozigotos se comportam da mesma forma e re-hibridizam totalmente após a renaturação formando estruturas homoduplex que são indistinguíveis para o sistema. Assim em loci polimórficos as amostras que apresentaram somente um pico de saída no cromatograma (homoduplex) foram re-submetidas á análise cromatográfica para a diferenciação dos homoduplex. Nesta fase, o produto do PCR de uma amostra homoduplex foi misturado em igual quantidade com cada uma de todas as amostras que apresentaram padrão homoduplex na fase de análise anterior. Essa mistura foi submetida ao processo de denaturação e resfriamento para a formação de possíveis heteroduplex e re-analisadas no DHPLC. Assim, o sistema revela se a amostra é homozigota com o mesmo alelo da amostra usada como padrão para mistura ou se é homozigota para o outro alelo.

Identificando o genótipo de cada uma das amostras foi possível estabelecer a frequência em que são encontrados na população.

Essa metodologia realizada no DHPLC nos permite realizar um rastreamento completo dos fragmentos amplificados em busca de polimorfismos, mas não permite identificar quais são as bases nucleotídicas que estão alteradas. Por este motivo, algumas amostras foram submetidas ao sequenciamento direto para que os polimorfismos encontrados fossem identificados e as frequências alélicas e genotípicas estabelecidas.

3.7. PCR Real Time

A confirmação da genotipagem do polimorfismo localizado no éxon 2 foi feita com o kit SNP Genotyping Assay (Applied Biosystems, EUA) número de catálogo C_25757476_10, pelo método de PCR Real Time no aparelho Applied Biosystems 7500. A confirmação foi necessária devido à semelhança encontrada entre os padrões homoduplex e heteroduplex no traçado do cromatograma (Figura 11), o que dificultou a genotipagem das amostras. As amostras homoduplex apresentaram um pico menor antecedendo o pico de saída, o que tornou o resultado confuso já que este pico antecedente mostrou grande variação na sua amplitude, algumas vezes ficando bem semelhante às amostras heteroduplex.

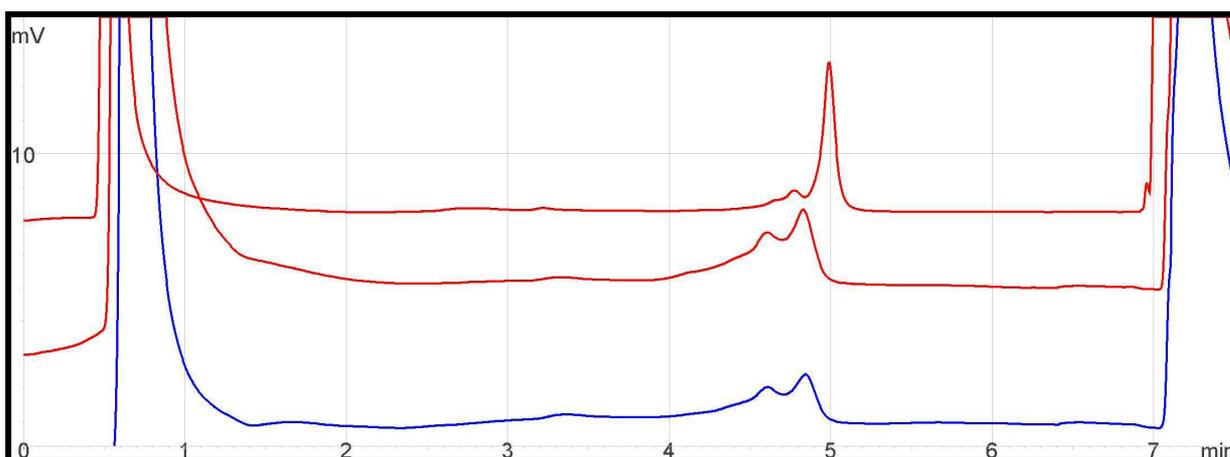


Figura 11. Cromatograma gerado pelo DHPLC. As linhas em vermelho representam amostras homoduplex, e em azul amostra heteroduplex.

3.8. Sequenciamento Direto

As reações de sequenciamento foram realizadas com o kit de sequenciamento DYEnamic™ ET Dye Terminator Kit (GE Healthcare) em um sequenciador automático modelo ABI PRISM 377 no Instituto de Farmacologia da

UNIFESP (INFAR). Foi utilizada a metodologia padrão descrita no Anexo 6. Ambas as fitas da PCR foram sequenciadas.

3.9. Análise de resultados

Foram analisadas estatisticamente as frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos encontrados. Foi verificado se a distribuição alélica da amostra está de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg. O teste exato de Fisher ou χ^2 foram utilizados para verificar as possíveis diferenças entre as frequências nos grupos, buscando associação com a vespertinidade e matutividade dos indivíduos. E, finalmente, a análise dos haplótipos foi feita através do programa Haploview (<http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview>). O nível de significância foi fixado em 5% ($p < 0,05$).

RESULTADOS

4. Resultados

4.1. Sujeitos

Foram selecionados 104 indivíduos classificados em dois grupos: matutinos e vespertinos. Os grupos estão equilibrados quanto à média de idade, proporção homens/mulheres e etnia. As características dos grupos podem ser analisadas na tabela a seguir (Tabela 3).

Tabela 4. Características como idade, sexo, etnia e o total de cada um dos grupos utilizados nesse estudo.

	Matutinos	Vespertinos
Idade	23,5±3,63	23,45±4,19
Sexo	♀ 70%	♀ 74%
	♂ 30%	♂ 26%
Etnia	88% caucasianos	83% caucasianos
Total	58	46

4.2. Amplificação dos fragmentos

As regiões amplificadas por cada par de primer e os polimorfismos descritos nos bancos de dados estão descritos em detalhes no anexo 7.

4.3. Polimorfismos no gene *AANAT*

A análise dos 4 éxons e região promotora do gene *AANAT* revelaram 2 polimorfismos inéditos na literatura, um localizado no éxon 1 e outro no éxon 4. Nos

éxons 2, 3, 4 e região promotora também foram encontrados polimorfismos, porém não inéditos: identificados códigos de identificação rs61739395, rs4646261, rs58504104 e rs4238989, respectivamente. Muitos dos polimorfismos já descritos não foram encontrados na população estudada (Tabela 5). Essa tabela traz todos os polimorfismos descritos na literatura e nos bancos de dados, bem como os encontrados neste estudo. Todos com sua devida localização, se já foram descritos anteriormente, a posição no gene, a identificação (rs), qual o tipo de polimorfismo, se não sinônimo qual foi a troca de aminoácidos e se foi encontrado neste estudo.

Tabela 5. Tabela resumo, mostrando todas as alterações do gene *AANAT*.

Localização	Descrito?	Posição	rs	Tipo de polimorfismo	Troca de aminoácido	Encontrado neste estudo?
Região	Sim	G-542T	rs3760138	-	-	Não
Promotora	Sim	C-263G	rs4238989	-	-	Sim
	Sim	-/C -184	rs35065674	-	-	Não
Éxon 1	Não	A12G	-	Untranslated	-	Sim
Íntron 1 – 2	Sim	íntron	rs36089799	Intrônico	-	Não
Éxon 2	Sim	C244T	rs61739395	Não sinônimo	Thr/Met	Sim
	Sim	C277T	rs34470791	Não sinônimo	Asp/Arg	Não
Íntron 3 – 4	Sim	Íntron	rs4646261	Íntronico	-	Sim
	Sim	G397A	-	-	-	Não
Éxon 4	Sim	G619A	rs28936679	Não sinônimo	Thr/Ala	Não
	Sim	T702C	rs2071031	Sinônimo	-	Não
	Sim	C777A	rs58504104	Sinônimo	-	Sim
	Sim	C756T	-	-	-	Não
	Sim	T834C	rs28697191	Sinônimo	-	Não
	Não	C890T	-	Untranslated	-	Sim

A seguir os resultados serão descritos individualmente para cada um dos fragmentos analisados.

4.3.1. Éxon 1

Identificamos apenas um padrão de alteração no cromatograma para o fragmento do éxon 1 (Figura 12). O sequenciamento deste fragmento revelou um locus polimórfico com a presença das bases A ou G. Este polimorfismo pode ser definido como um SNP, já que há a alteração de somente uma base no locus polimórfico (figura 13).

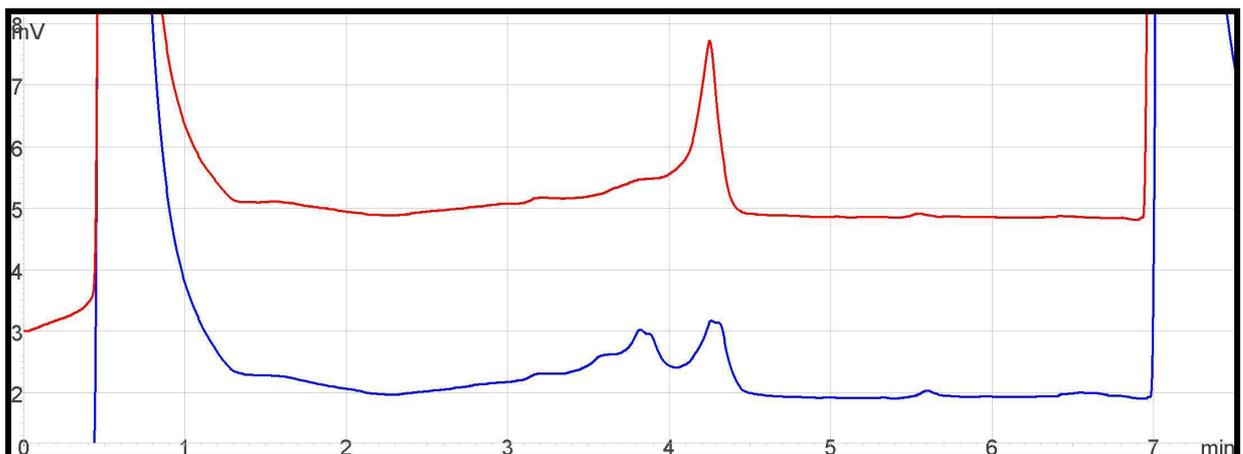


Figura 12. Cromatograma demonstrando o padrão de detecção de mutação no DHPLC para a região amplificada do éxon 1 do gene *AANAT*. Cada linha representa o resultado de uma amostra. A linha em vermelho representa uma amostra com padrão homoduplex e em azul uma amostra com padrão heteroduplex.

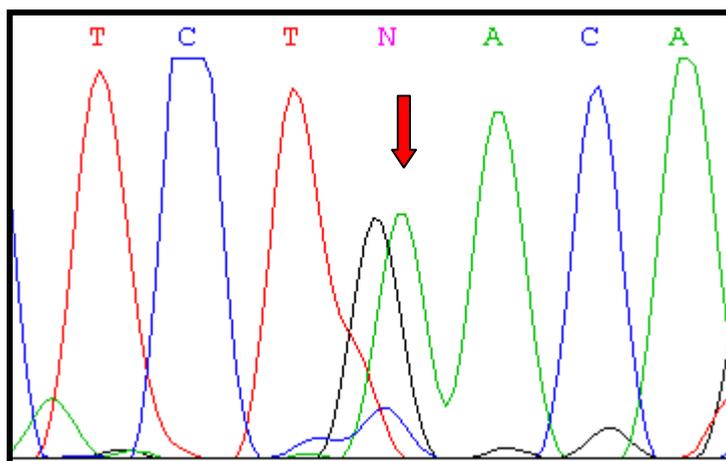


Figura 13. Eletroferograma obtido por meio de sequenciamento direto mostrando o polimorfismo encontrado no éxon 1 em uma amostra heterozigota AG.

Este polimorfismo ainda não foi descrito em nenhum banco de dados e se revelou pouco frequente na população estudada, como mostra a tabela 6. A nomenclatura adotada para identificá-lo foi A12G, segundo as normas descritas em Dunnen e Antonarakis, 2001.

Tabela 6. Frequência alélica para o polimorfismo A12G do gene *AANAT*.

SNP A/G	
Alelo A (nc)	Alelo G (nc)
98,1% (202)	1,9% (4)

nc = número de cromossomos

4.3.2. Éxon 2

No éxon 2 também encontramos uma alteração detectada pelo DHPLC, como mostra a figura a seguir (Figura 14).

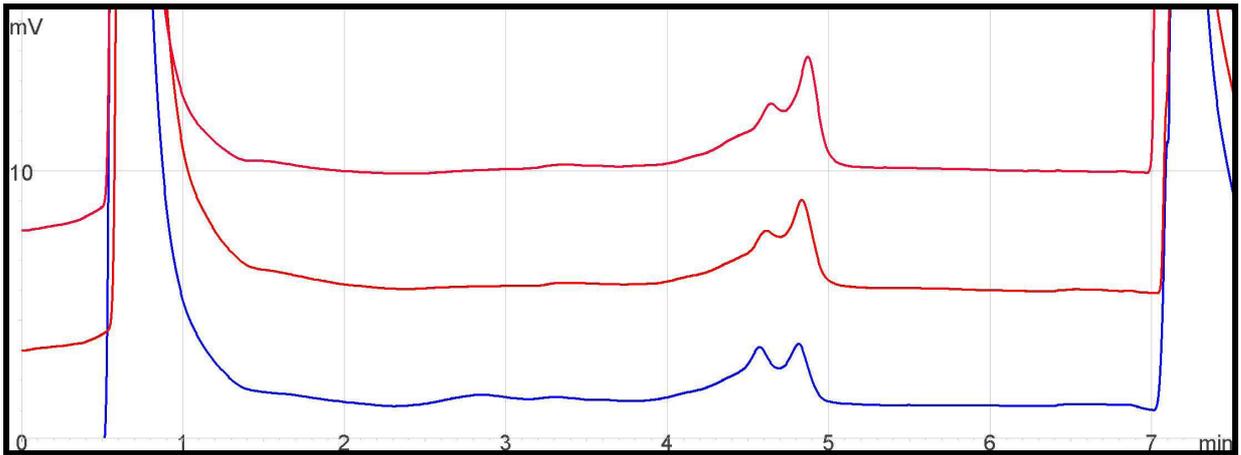


Figura 14. Cromatograma demonstrando o padrão de detecção de mutação no DHPLC para a região amplificada do éxon 2 do gene *AANAT*. As linhas em vermelho representam amostras com padrão homoduplex (homozigota) e em azul padrão heteroduplex (heterozigota).

Entretanto, a genotipagem através do DHPLC causou dúvidas em inúmeras amostras por apresentarem traçados no cromatograma muito semelhantes tanto para amostras homozigotas quanto heterozigotas. Por esse motivo, sequenciamos algumas amostras a fim de verificar se havia alguma amostra heterozigota.

O sequenciamento do fragmento correspondente ao éxon 2 em ambas as direções da fita de DNA revelou um SNP com as bases T ou C na posição 244 (Figura 15). Esse SNP já está depositado nos bancos de dados nomeado rs61739395.

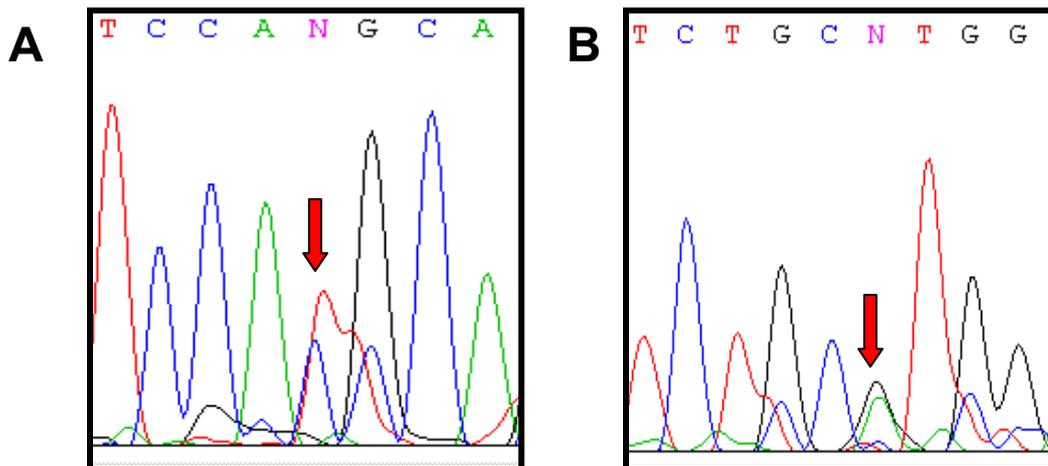


Figura 15. Eletroferogramas obtidos por meio de sequenciamento direto de uma amostra que apresentou padrão heteroduplex no cromatograma gerado pelo DHPLC mostrando onde está o polimorfismo de T/C encontrado, tanto na fita sentido 5'-3' (A) quanto na fita reversa (B).

Após identificar o polimorfismo, encomendamos um ensaio para discriminação alélica de PCR Real Time para confirmar a genotipagem de todas as amostras. Este polimorfismo mostrou-se pouco frequente na população estudada, como podemos ver na tabela 7.

Tabela 7. Frequência alélica do polimorfismo rs61739395, onde há troca de bases C>T na posição 244 do gene *AANAT*.

SNP C/T	
Alelo C (nc)	Alelo T (nc)
99,0% (204)	1,0% (2)

nc = número de cromossomos

4.3.3. Éxon 3

Foi encontrado somente um padrão de alteração na região do éxon 3, como mostra a figura 16.

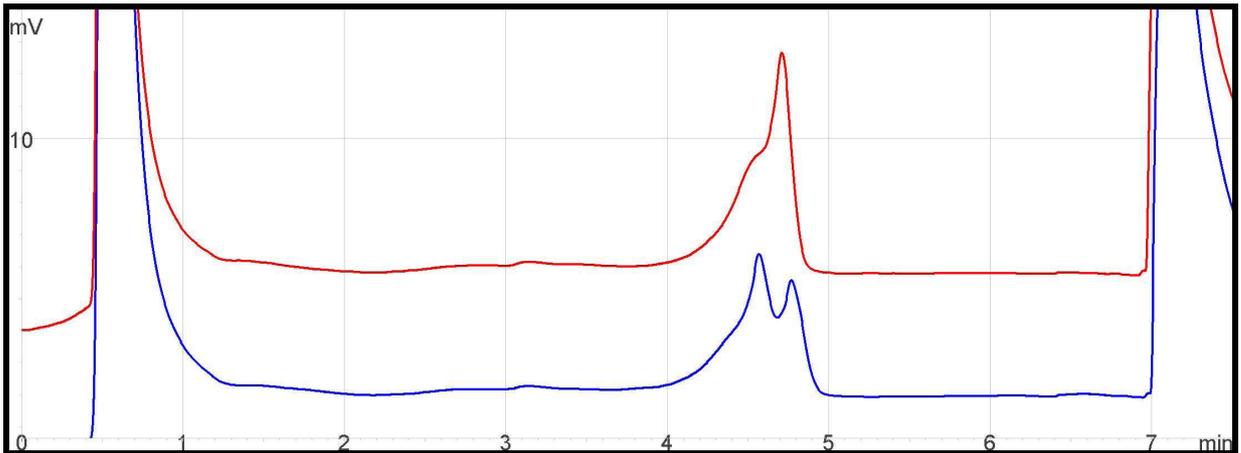


Figura 16. Cromatograma demonstrando o padrão de detecção de mutação no DHPLC para a região amplificada do éxon 3 do gene *AANAT*. A amostra em vermelho mostra o padrão homoduplex e a amostra em azul apresenta um padrão heteroduplex (amostra heterozigota).

Sequenciamos as amostras que apresentaram padrão heteroduplex e encontramos um SNP com as bases T ou A na mesma posição (figura 17). Esse polimorfismo está localizado no íntron 3-4. O *screening* dos íntrons não é o objetivo deste trabalho; entretanto, como este polimorfismo fica adjacente ao éxon 3, os primers desenhados para amplificar esta região incluem um pequeno fragmento do íntron englobando dessa forma esse SNP.

Este polimorfismo já foi descrito nos bancos de dados, sendo identificado como rs4646261, mas é pouco frequente na população brasileira (Tabela 8).

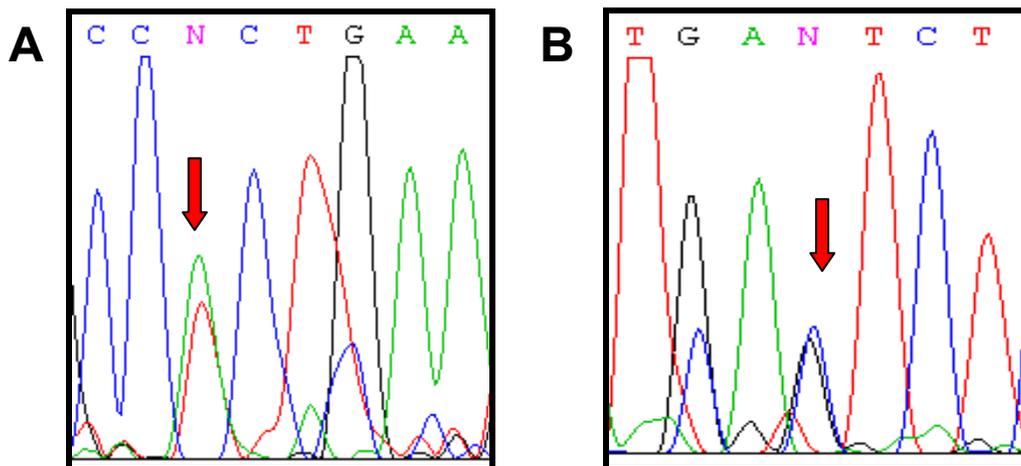


Figura 17. Eletroferogramas obtidos por meio de sequenciamento direto da amostra que apresentou padrão heteroduplex no cromatograma gerado pelo DHPLC mostrando o polimorfismo de T/A descrito nos bancos de dados, tanto na fita sentido 5'-3' (A) quanto na fita reversa (B).

Tabela 8. Frequência alélica do polimorfismo rs4646261 do gene *AANAT*.

SNP T/A	
Alelo T (nc)	Alelo A (nc)
94,2% (194)	5,8% (12)

nc = número de cromossomos

4.3.4. Éxon 4

Foi encontrado somente um padrão de alteração para este fragmento, na temperatura de 61,1°C, quando as extremidades estão denaturadas, mas a região central do fragmento ainda encontra-se 100% em dupla hélice, sugerindo que a alteração está na extremidade do fragmento (Figura 18).

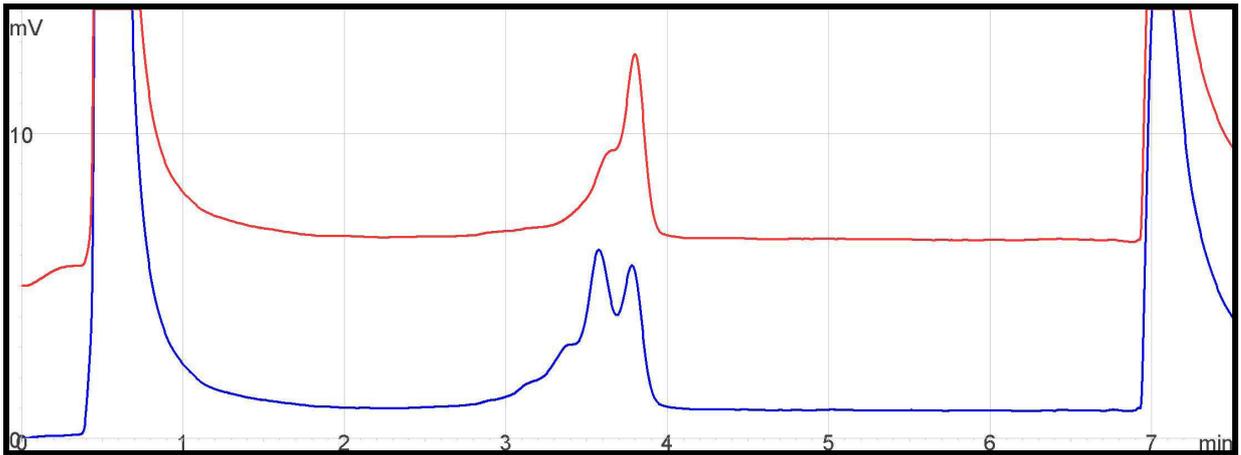


Figura 18. Cromatograma demonstrando o padrão de detecção de mutação no DHPLC para a região amplificada do éxon 4 do gene *AANAT*. A amostra em vermelho mostra o padrão de uma amostra homoduplex e a amostra em azul apresenta padrão heteroduplex, indicando que esta amostra é heterozigota.

Sequenciamos as duas amostras que apresentaram o padrão heteroduplex e encontramos dois polimorfismos diferentes. Um deles é o rs58504104, onde o locus polimórfico pode apresentar as bases C ou A na posição 777 (Figura 19). O outro polimorfismo encontrado ainda não foi descrito em bancos de dados ou na literatura, fica na região não codificante do éxon 4, na posição 890 e pode apresentar o alelo C ou T (Figura 20).

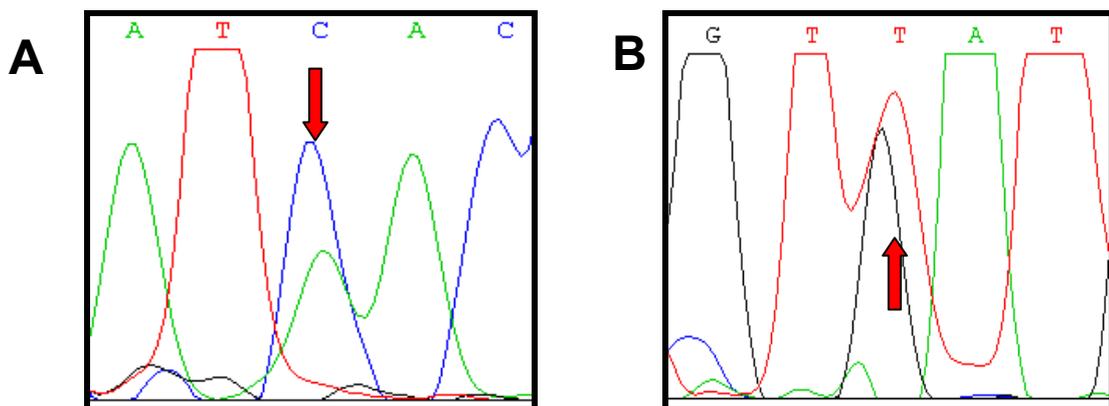


Figura 19. Eletroferogramas obtidos por meio de sequenciamento direto da amostra que apresentou padrão heteroduplex no cromatograma gerado pelo DHPLC mostrando o polimorfismo de C/A na posição 777, tanto na fita sentido 5'-3' (A) quanto na fita reversa (B).

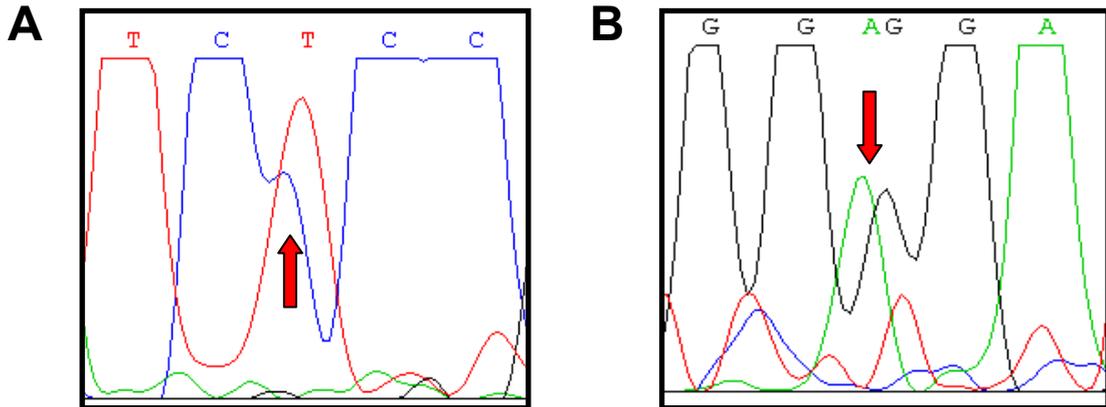


Figura 20. Eletroferogramas obtidos por meio de sequenciamento direto da amostra que apresentou padrão heteroduplex no cromatograma gerado pelo DHPLC mostrando o polimorfismo de C/T na posição 890 não descrito nos bancos de dados, tanto na fita sentido 5'-3' (A) quanto na fita reversa (B).

4.3.5. Região Promotora

Foram encontrados dois padrões de alteração na região promotora. Na temperatura de 50°C, na fase de análise da PCR (*double-stranded sizing – single fragment*), duas amostras apresentaram padrão heteroduplex (Figura 22), indicando que essa alteração fica na extremidade do fragmento amplificado, uma vez que a 50°C essa parte inicial do fragmento já está parcialmente denaturada, como mostra a figura 21. O outro padrão heteroduplex foi encontrado a 65°C (Figura 23).

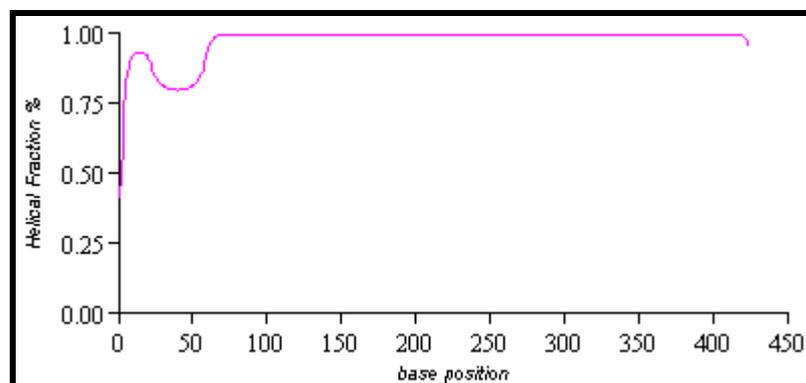


Figura 21. Gráfico gerado pelo software Navigator indicando a porcentagem de denaturação a 50°C da fita de DNA cuja sequência foi previamente informada.

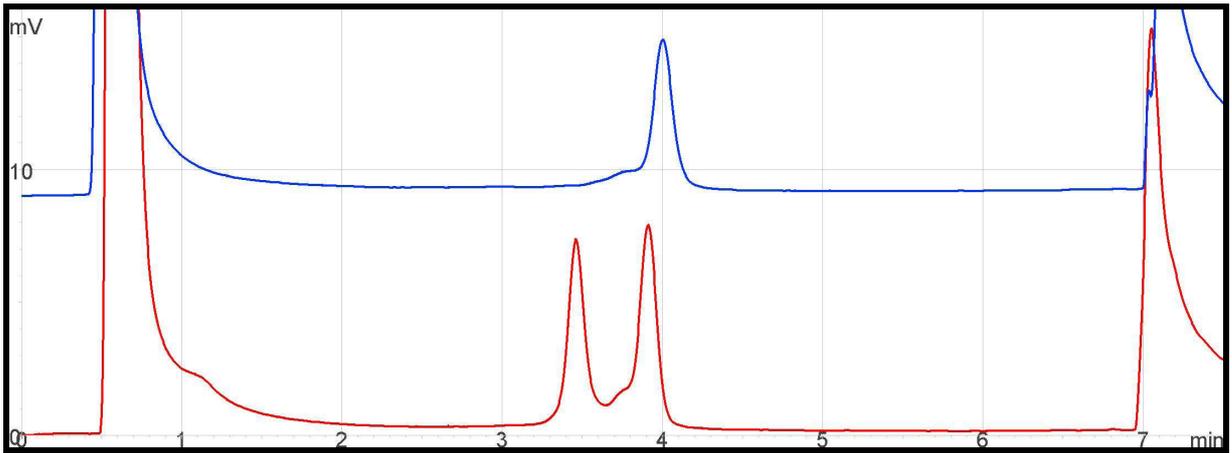


Figura 22. Cromatograma demonstrando o padrão de detecção de mutação no DHPLC para a região promotora do gene *AANAT*. Na temperatura de 50°C, na fase de análise do produto de PCR. A amostra em azul mostra o padrão homoduplex e a amostra em vermelho mostra um pico duplo do padrão heteroduplex.

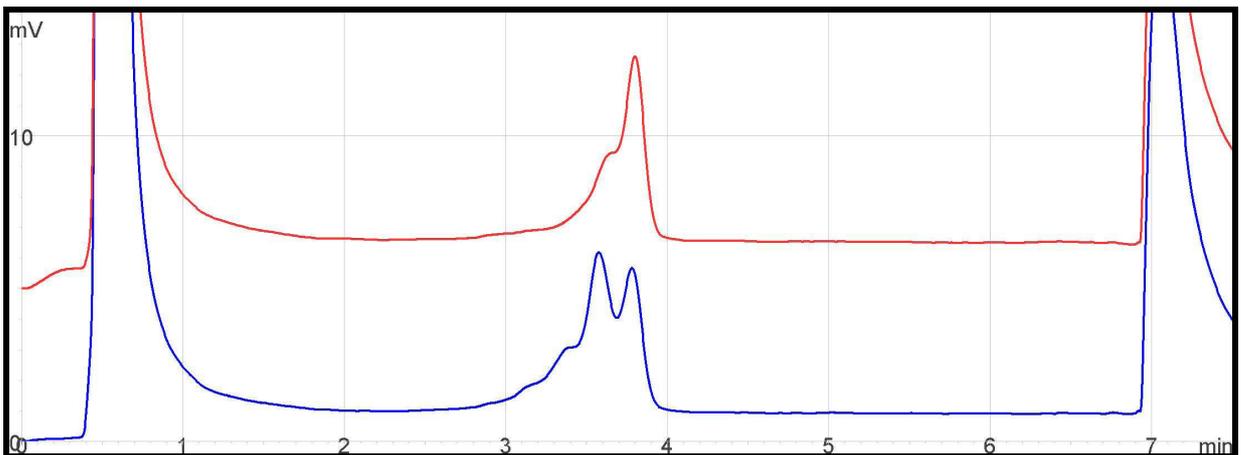


Figura 23. Cromatograma demonstrando o padrão de detecção de mutação no DHPLC para a região promotora do gene *AANAT*. A amostra em vermelho mostra o padrão homoduplex e a amostra em azul mostra um pico duplo do padrão heteroduplex a 65°C.

Sequenciando as amostras heterozigotas e homozigotas, verificamos que o polimorfismo encontrado corresponde ao polimorfismo identificado pelo código rs4238989, caracterizado pela presença da base C ou G na posição -263 (Figura 24). Este foi o único polimorfismo encontrado nesta população que apresentou frequências altas para ambos os alelos, como podemos observar na tabela 9.

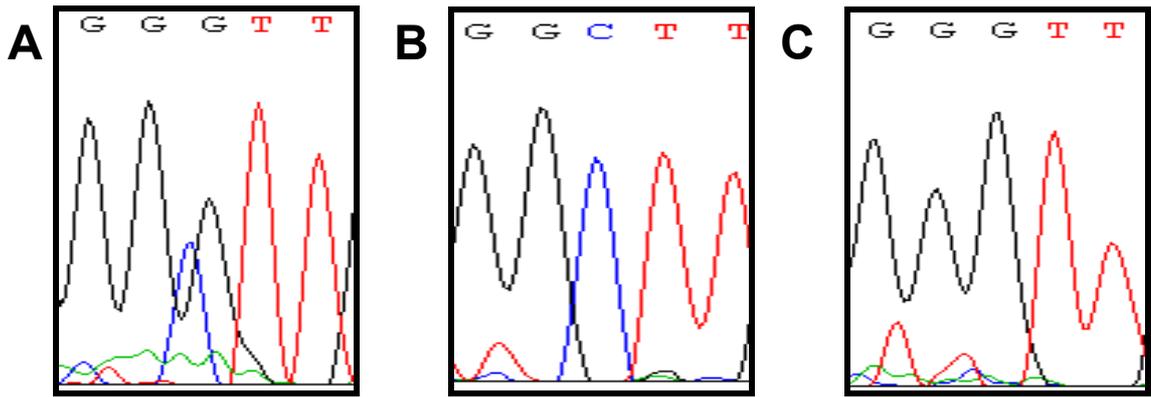


Figura 24. Eletroferogramas obtidos por meio de sequenciamento direto da amostra que apresentou padrão heteroduplex no cromatograma gerado pelo DHPLC mostrando o polimorfismo de G/C em uma amostra heterozigota (A), uma homozigota CC (B) e uma homozigota GG (C).

Não foi possível identificar a alteração encontrada no início do fragmento.

Tabela 9. Frequência alélica do polimorfismo rs4238989 da região promotora do gene *AANAT*.

SNP C/G	
Alelo C (nc)	Alelo G (nc)
57,8% (119)	42,2% (87)

nc = número de cromossomos

Para finalizar apresentamos um esquema com todos os seis polimorfismos encontrados com sua localização no gene e as frequências (Figura 25).



Figura 25. Esquema representativo do gene *AANAT* e todos os polimorfismos encontrados neste estudo. A área hachurada representa a região promotora do gene, e, branco os íntrons. Em cinza são as regiões exônicas não codificantes e em preto as regiões exônicas codificantes do gene. Cada traço em vermelho indica a localização aproximada dos polimorfismos encontrados neste estudo e entre parênteses a frequência do alelo mais presente.

4.4. Associações dos polimorfismos com o cronotipo

As frequências genotípicas de cada um dos polimorfismos em cada um dos grupos de cronotipos extremos são mostradas na tabela 10, e todas estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Individualmente, nenhum dos polimorfismos possui associação com um dos fenótipos. O único que demonstra uma tendência é o polimorfismo C-263G (rs4238989) localizado na região promotora ($\chi^2 = 3,404/p=0,06$).

Tabela 10. Tabela geral das frequências genotípicas encontradas na população estudada.

Região do SNP	Matutinos			Vespertinos		
Éxon 1	AA	AG	GG	AA	AG	GG
(A12G)	0,96	0,04	0	0,95	0,05	0
Éxon 2	CC	CT	TT	CC	CT	TT
(C244T)	0,96	0,04	0	1,0	0	0
Éxon 3	TT	TA	AA	TT	TA	AA
(rs4646261)	0,89	0,08	0,03	0,91	0,09	0
	TT	TC	CC	TT	TC	CC
Éxon 4	0,98	0,02	0	1,0	0	0
(C777A e C890T)	CC	CT	TT	CC	CT	TT
	0,98	0,02	0	1,0	0	0
Região Promotora	CC	CG	GG	CC	CG	GG
(C-236G)	0,44	0,39	0,17	0,33	0,37	0,30

4.6. Desequilíbrio de ligação e análise por haplótipos

Observamos que os polimorfismos individualmente não possuem associação com o fenótipo. Verificamos também que estes polimorfismos não estão em desequilíbrio de ligação, ou seja, a associação ou combinação dos alelos dos diferentes *lóci* ao longo do gene *AANAT* é randômica na população. Os poucos polimorfismos encontrados provavelmente não estão ligados entre si como num bloco de DNA que não se separa e, portanto não passam junto num bloco aos descendentes de geração em geração.

Com o auxílio do programa Haploview (www.broadinstitute.org/haploview) é possível realizar a análise dos polimorfismos em blocos. Cada bloco pode ser composto por no mínimo 2 polimorfismos, os quais são determinados pelo usuário. O haploview realiza a análise estatística (χ^2) para verificar se dentro do bloco de polimorfismos escolhidos algum deles está em desequilíbrio de ligação com o outro, se eles passam juntos para os descendentes ou segregam na formação dos gametas. Neste trabalho, chamamos de bloco os seis polimorfismos encontrados. Dessa forma, foi possível fazer a análise da combinação de cada um dos polimorfismos com todos os outros como mostra a figura 26. Está evidente a ausência de interação entre os polimorfismos localizados nas regiões exônicas do gene, representados por losangos lilás. Isso significa que os polimorfismos encontrados entre os éxons 1 a 4 não tem ligação genética entre si (equilíbrio de ligação). Entre o polimorfismo da região promotora (C-236G) e o polimorfismo A12G do éxon 1, e entre o mesmo SNP da região promotora (C-236G) e o polimorfismo encontrado no íntron 3-4 o índice que mede o desequilíbrio de ligação é diferente de 1, o que significa que não há um completo equilíbrio de ligação, pode ter ocorrido

pelo menos um evento de recombinação entre esses polimorfismos. Os números que observamos dentro desses losangos brancos indicam qual o valor de D' entre esses polimorfismos. O D é a diferença entre a frequência gamética do bloco haplotípico observada e a frequência gamética esperada, e o D' é a normalização da medida do desequilíbrio de ligação calculado por $D' = D / D_{máx}$ o valor de D' pode variar de 0 a 1 sendo o zero desequilíbrio completo (um conjunto de alelos em questão estará sempre ligado e passará junto para a próxima geração) e 1 equilíbrio completo (a ligação entre os alelos em questão será sempre randômica) (Mueller J, 2004). Entretanto, apesar do D' entre esses polimorfismos ser diferente de 1, o que sugere o desequilíbrio, não houve diferença significativa e, portanto esses polimorfismos não estão em desequilíbrio de ligação.

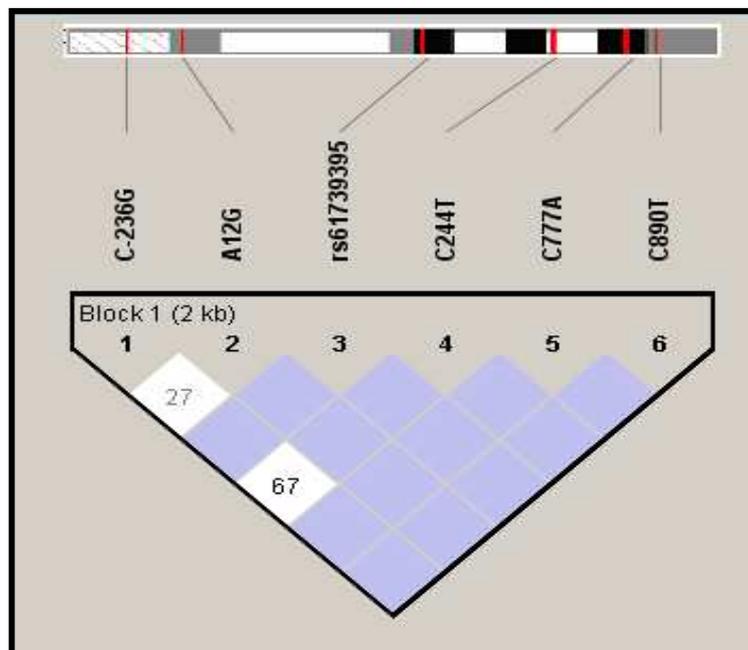


Figura 26. Esquema da distribuição dos SNPs encontrados ao longo do gene AANAT. Na parte superior da figura está representado o gene AANAT onde em preto estão representados as regiões exônicas codificantes, em cinza as regiões exônicas não traduzidas em proteína, em branco os íntrons e a região promotora é a parte hachurada da figura. Em vermelho, os polimorfismos encontrados nas suas devidas posições. Na parte inferior da figura está o esquema de blocos mostrando o equilíbrio de ligação entre os polimorfismos encontrados. Os losangos em lilás mostram completo equilíbrio de ligação e os losangos em branco apresentam o valor do D' em porcentagem em seu interior.

Realizando a análise haplotípica encontramos 5 haplótipos mais frequentes (Tabela 11). Entretanto, nenhum dos haplótipos revelou associação com algum dos fenótipos.

Tabela 11. Haplótipos formados a partir dos polimorfismos encontrados no gene *AANAT* e suas frequências.

Haplótipos	Frequências
GACTAA	0,558
CACTAA	0,350
CACAAA	0,047
CGCTAA	0,012
GACAAA	0,011

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Em nosso estudo foram encontrados seis polimorfismos:

- Um único polimorfismo intrônico (rs4646261) cujo lócus é no íntron 3-4.
- Em regiões exônicas não traduzidas do gene encontramos dois polimorfismos inéditos, não descritos na literatura ou em bancos de dados do genoma humano, localizados um no éxon 1 (A12G) e outro no éxon 4 (C890T).
- Em regiões exônicas que contém códigos para composição de aminoácidos na proteína, encontramos um polimorfismo no éxon 2 (C244T) que é um polimorfismo não sinônimo – muda o código de aminoácidos de treonina para metionina na posição 244 – e um polimorfismo no éxon 4 (C777A) que é sinônimo, ou seja, não codifica mudança de aminoácido na proteína.
- E finalmente, um polimorfismo mais relevante foi encontrado na região promotora do gene um polimorfismo de C para G na posição -263 (rs4238989) que foi observado numa maior frequência na população estudada.

Observamos que os polimorfismos encontrados na região codificadora do gene apresentam frequências muito baixas, ou seja, a maior parte da amostra estudada não apresenta polimorfismos. Este fato sugere que as possíveis variações neste gene que surgiram ao longo da evolução humana não foram selecionadas ou sofreram uma seleção negativa. A enzima AANAT tem uma função muito bem estabelecida e crucial no organismo que é a transferência de um radical acetil oriundo da AcetilCoA para outras moléculas, e modificações de função causadas por

polimorfismos podem afetar de maneira negativa essa função, inviabilizando o desenvolvimento e ou adaptação do organismo.

Do ponto de vista filogenético, o gene *AANAT* é encontrado desde bactérias e fungos passando por espécies de animais invertebrados até vertebrados superiores e a análise da sequência de aminoácidos da proteína ao longo da escala filogenética mostra poucas modificações mesmo entre os diferentes organismos. São observadas modificações em regiões não conservadas filogeneticamente principalmente flanqueando regiões regulatórias e pouquíssimas no núcleo catalítico (Coon e Klein, 2006). Desta forma este gene e seu produto se apresentam muito conservados ao longo da escala filogenética e, portanto, a pequena variação encontrada na nossa amostra faz bastante sentido em termos evolutivos.

Quando comparamos o número de polimorfismos encontrados nesta amostra com os descritos em estudos anteriores, observamos que muitos deles não estão presentes na nossa amostra. Um dos motivos para a ausência de mais polimorfismos pode ser o número pequeno de sujeitos na amostra, embora seja mais provável que tenham um padrão étnico específico, já que boa parte dos polimorfismos no gene *AANAT* foi descrita em populações asiáticas (Sekine e cols, 2001; Hohjoh e cols, 2003).

Outro exemplo que ilustra este ponto de vista são os resultados obtidos por Pereira e cols (2007) em relação ao polimorfismo G619A do gene *AANAT* em uma amostra da população brasileira. De um total de 1034 alelos em 517 indivíduos estudados, encontraram somente dois alelos A (1,9%), que curiosamente estavam presentes em um indivíduo de origem asiática e outro de origem africana. Enquanto nos estudos de Hohjoh e cols (2003) com amostras da população cuja origem étnica

é asiática 3,1% dos indivíduos apresentaram o alelo 619A. Muito semelhante a estes dados, mas de forma mais ampla Blömeke e cols (2008) estudando uma amostra caucasiana não encontraram nenhum indivíduo que apresentasse algum dos polimorfismos no gene *AANAT* descritos em populações asiáticas (Sekine e cols, 2001; Hohjoh e cols, 2003). Ciarleglio e cols (2008) estudaram amostras populacionais de diferentes regiões do planeta e encontraram uma distribuição bastante heterogênea dos polimorfismos do gene *AANAT* e de alguns genes relógio entre as populações.

Outro detalhe nesta discussão é que dois dos polimorfismos encontrados são exclusivos desta amostra, ou seja, nunca foram descritos anteriormente, o que pode indicar que estão ou estiveram presentes em populações das quais derivam a população brasileira e que nunca foram estudadas antes como, por exemplo, populações nativas indígenas.

Um fato muito interessante ocorreu durante a realização deste trabalho. Somente as reações de amplificação de DNA (PCR) de fragmentos do gene *AANAT* e do gene *HIOMT* sofriam contaminação. As PCRs de outros genes em estudo no mesmo laboratório não contaminavam. Examinando o problema a fundo, suspeitamos de alguma contaminação no ar condicionado, já que todas as outras fontes de contaminação haviam sido eliminadas. Foi descoberta uma contaminação fúngica nos filtros do ar condicionado, o qual circula por todo o andar do prédio que se encontra o laboratório onde foram realizadas as reações deste estudo. Esse fato anedótico corrobora os dados que mostram o nível de conservação desses genes da via de síntese da melatonina, onde primers desenhados para amplificar os genes *AANAT* e *HIOMT* humanos amplificaram também esses genes do fungo em questão.

Com a finalização do projeto genoma humano vários bancos de dados de variações genéticas presentes na nossa espécie foram criados, o que facilita a busca por variações existentes na espécie. Utilizamos frequentemente os bancos de dados como ferramenta de apoio para o estudo genético, Entre os mais acessados estão: Ensembl (www.ensembl.org), NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov), UCSC Genome Browser (genome.ucsc.edu) e o HapMap (WWW.hapmap.org). O ensembl foi criado alguns anos antes da publicação do genoma humano com a finalidade de deixar todos os dados de sequenciamento obtidos disponíveis para o público através da internet e também de integrar a anotação do genoma humano com outros dados biológicos. Desde o início do site, muitos outros genomas foram adicionados e o conjunto de dados disponíveis também tem se expandido para incluir genômica comparativa, dados de variação e de regulação gênica. O NCBI, pertencente ao National Institutes of Health (NIH), é um site que apresenta uma rede integrada de informações de grandes bases de dados que inclui o PubMed, dados de sequências de nucleotídeos, sequências e estruturas protéicas, genomas completos, taxonomia, entre outros. Outro site muito utilizado é o UCSC Genome Browser. Este site contém sequências referências e projetos de trabalho conjuntos para uma grande coleção de genomas. Há ferramentas para explorar as sequências, homologia, padrão de expressão e informações de outros grupos de genes que podem ser relacionados de várias formas, além da ferramenta *Blat* que pode localizar rapidamente uma sequência informada nos genomas. O HapMap vem com uma proposta um pouco diferente, é um projeto internacional para identificar e catalogar as diferenças e similaridades genéticas em seres humanos. Há a descrição de quais são variações (os polimorfismos), onde elas ocorrem no DNA, e como estão distribuídas entre as pessoas dentro das populações e entre as populações em diferentes partes do

mundo. O HapMap não visa associar os polimorfismos aos fenótipos, mas facilita com essas informações a pesquisa de genes, polimorfismos ou haplótipos que afetem a saúde, doença, respostas individuais a tratamentos e a fatores ambientais.

A busca de polimorfismos no gene *AANAT* pelo HapMap encontra somente dois polimorfismos, ambos localizados no éxon 4 e com frequência menor de 1% em populações caucasianas. Entretanto, nenhum destes foi encontrado no presente estudo. No ensembl constam apenas sete polimorfismos do gene *AANAT*, dos quais somente três foram encontrados no presente estudo (rs61739395, rs4646261 e rs58504104).

Agrupando dados da literatura e dos bancos de dados do genoma humano, há um total de treze polimorfismos descritos para esse gene (Tabela 5). Os dois polimorfismos inéditos encontrados neste estudo futuramente serão depositados nos bancos de dados por nós.

Com relação à possível alteração da função protéica derivada dos polimorfismos encontrados, podemos inferir que nos polimorfismos sinônimos e no intrônico, como não causam alteração de aminoácidos na proteína, podem estar relacionados ao funcionamento de elementos reguladores de expressão ou ativação da proteína. O polimorfismo no éxon 2 muda o código de aminoácido que compõe a proteína, podendo causar mudanças na funcionalidade enzimática ou afinidade ao substrato, o fato de estar localizado num éxon aumenta a probabilidade de ter um efeito na função enzimática. Entretanto há poucos estudos na literatura sobre polimorfismos afetando a expressão ou funcionalidade dessa enzima, os quais discutiremos mais adiante (Wang e cols, 2004; Ying e cols, 2004; Hohjoh e cols,

2003). Apesar de os dois alelos encontrados nesta amostra estarem no grupo dos matutinos extremos, não foi possível observar associação com o fenótipo.

Sabe-se que genes relacionados ao relógio circadiano molecular e seus polimorfismos têm grande influência na determinação da preferência diurna como mostrou o estudo com o polimorfismo T3111C do gene *CLOCK* onde o alelo menos frequente (C) está relacionado com o aumento da incidência de indivíduos vespertinos (Katzemberg e cols, 1998). Ainda polimorfismos nos genes *PER2* e *PER3* estão associados com as síndromes de avanço e atraso de fase do sono, respectivamente (Toh e cols, 2001 e Pereira e cols, 2005). Em animais *knockout* para algum dos genes relógio como *Per1*, *Per2*, *Per3*, *Cry1* e *Cry2* é possível observar alteração no ritmo circadiano e às vezes até o período circadiano em livre-curso torna-se instável (para revisão ver Schantz, 2008 e Pereira e cols, 2009).

De uma forma geral existem poucos estudos investigando o gene *AANAT* em humanos associado a fenótipos de sono ou ritmos circadianos. Basicamente quatro estudos procuram investigar esta associação: dois deles estudam populações asiáticas (Ying e cols, 2004; Hohjoh e cols, 2003), um investiga polimorfismos numa amostra caucasiana (Blomeke e cols, 2008), e outro uma amostra predominantemente caucasiana brasileira (Pereira e cols, 2007).

Wang e cols (2004) realizaram o rastreamento do gene *AANAT* em busca de polimorfismos em uma amostra da população chinesa de Singapura a fim de buscar associações com padrões de sono longo ou curto, escolhidos por meio de respostas de um questionário. De um total 210 questionários respondidos, os cinco indivíduos com sono mais longo e os cinco indivíduos com sono mais curto na amostra foram recrutados para a análise genética. Como resultado do rastreamento eles

encontraram dois polimorfismos localizados na região promotora os SNPs T-542G e o C-263G (rs3760138 e rs4238989, respectivamente) além de um polimorfismo no éxon 4. A análise do gene nestes indivíduos revelou que todos os indivíduos possuíam a região codificante do gene idênticas e que o polimorfismo T-542G estava representado igualmente entre os grupos, enquanto o SNP C-263G teve o alelo G associado ao fenótipo curto dormidor, pois estava presente em quatro dos cinco indivíduos desse grupo em contraste com apenas um indivíduo longo dormidor.

Como polimorfismo C-263G está localizado na região promotora do gene *AANAT* existe a possibilidade dele influenciar a ligação de fatores de transcrição, modulando diretamente taxa de transcrição do RNA mensageiro e alterando, portanto a taxa de tradução da enzima. Ying e cols (2004) testaram esta hipótese ao estudar os níveis de excreção urinária do principal metabólito da melatonina, 6-OHMS (6-hidroximelatonina sulfato) em indivíduos com diferentes genótipos relativos ao polimorfismo C-263G. Os autores observaram que não houve diferença de excreção de 6-OHMS quando comparados os diferentes genótipos. Uma crítica a este trabalho é a de que a dosagem do metabólito foi realizada com todo o volume urinário noturno, mensurando dessa forma a concentração resultante da metabolização de toda melatonina produzida na fase escura. Talvez a análise da curva de secreção por meio da coleta de várias amostras ao longo da noite fosse uma melhor medida para avaliar o efeito deste polimorfismo. Interessantemente, o mesmo polimorfismo (C-263G) que tem associação com fenótipos de sono, aparece em nossa amostra com uma associação limítrofe ao fenótipo vespertino extremo. O alelo -263G está presente em maior porcentagem ($\approx 49\%$) neste grupo do que no grupo dos matutinos extremos (36%).

Indivíduos com diferentes padrões de sono em relação a duração – curto ou longo dormidores – apresentam diferenças mensuráveis em variáveis fisiológicas que são paralelas a duração do sono, como por exemplo a duração da fase de secreção de melatonina (Aeschbach e cols, 2003). Desta forma todos estes dados em conjunto, incluindo o nosso, reforçam a suspeita de que este polimorfismo na região promotora do gene *AANAT* tenha efeito em fenótipos relacionados ao sono, apesar de em nenhum destes estudos o efeito aparecer muito forte.

Do ponto de vista funcional, surpreendentemente este polimorfismo está localizado exatamente no sítio de ligação do fator de transcrição SP1 (www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html). Desta forma é uma possibilidade bastante interessante que o polimorfismo C-263G possa modular a expressão gênica da *AANAT*, alterando a velocidade da síntese dessa enzima com possíveis consequências na temporalidade da curva de secreção da melatonina. O fator de transcrição SP1 é ubiquamente expresso e funciona como um domínio de transativação, ou seja, tem um papel na inibição do recrutamento de proteínas repressoras na região promotora de genes e também age como protetor para metilação dessas regiões (Tan e Khachigian, 2009). Um papel adicional da proteína SP1 é o aumento da expressão gênica do próprio CREB como demonstrado para células epiteliais dos brônquios (Hong e cols, 2008). E no caso do gene *AANAT*, o sítio de ligação SP1 está a 30 pares de bases do sítio de ligação do CREB (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>).

Além da análise de associação de cada polimorfismo dentro da amostra separadamente, realizamos a análise em conjunto, ou seja, a análise haplotípica. Do ponto de vista químico, os genes e as regiões que estão entre eles, as regiões

intergênicas, compõem uma fita contínua, ininterrupta, de DNA, ao longo da qual estão escritas as mensagens genéticas. As diferenças genéticas entre os indivíduos são resultantes de diferenças na composição de DNA. Diferentes versões de certa sequência de DNA em um determinado *locus* são chamadas de polimorfismos. A origem dos polimorfismos são as diferentes mutações que podem ocorrer na sequência de DNA. Qualquer sítio no qual existam alelos múltiplos como componentes estáveis da população (cuja frequência seja maior de 1%) é, por definição, polimórfico. Os indivíduos podem, então, ser classificados de acordo com a composição que possuem destes polimorfismos numa determinada região genômica (como exemplo ver tabela 11 e figura 26). Cada tipo particular de composição de polimorfismos numa dada região genômica é denominado um haplótipo (Thompson e Thompson, 2002).

Em alguns casos, não se observa efeitos no fenótipo quando se analisa um único polimorfismo, mas quando se analisa a combinação ou composição de determinados polimorfismos em um gene ou região genômica, ou seja, um haplótipo, o efeito da carga genética no fenótipo se torna observável. Podemos citar como exemplo o efeito de um determinado haplótipo no gene da hemoglobina beta que está associado com a anemia falciforme, e é determinante para o estabelecimento desta doença (Costa e cols, 2006). Outro exemplo que podemos citar é o complexo de histocompatibilidade humano (HLA) onde existe uma grande variação polimórfica que resulta em um grande número de haplótipos diferentes para a região, sendo alguns destes determinantes para a suscetibilidade ou resistência a um grande número de infecções, doenças autoimunes e outras como a doença celíaca (Popat e cols, 2002 e para revisão Traherne, 2008). Associação de haplótipos com a função enzimática como no caso da *AANAT* também podem ser citados, como no caso da

Identificação da atividade enzimática da Arilamina N-acetiltransferase 2 associada a determinados haplótipos do gene (Walravedn e cols, 2008). Com relação aos genes relógio alguns haplótipos também têm sido associados com fenótipos circadianos, um haplótipo específico do gene *CLOCK* foi associado com a suscetibilidade a obesidade (Sookoian e cols, 2008) e o outro no gene *REV-ERB α* associado com o distúrbio bipolar (Severino e cols, 2009).

Em todos estes estudos descritos acima a análise de somente um polimorfismo no gene em questão em cada estudo não é suficientemente informativa, mas a análise do conjunto ou composição de polimorfismos no gene revela o efeito no fenótipo.

Tendo em mente esta questão sobre análise do possível efeito do conjunto de polimorfismos em um gene, realizamos a análise dos possíveis haplótipos formados a partir dos polimorfismos encontrados no gene *AANAT* no presente estudo. Observamos que dois dos haplótipos estavam presentes em mais de 90% da amostra, e a diferença entre esses dois haplótipos é somente o alelo presente na região promotora (o SNP C-236G, ver tabela 11). A análise haplotípica também foi realizada com a finalidade de verificarmos se esses polimorfismos estavam em desequilíbrio de ligação, ou seja, se na formação das células gaméticas não ocorre recombinação genética, favorecendo a preservação de certas combinações de loci gênicos. Nesse caso, a recombinação genética é aleatória, não há desequilíbrio de ligação (Nussbaum e cols, 2002; Mueller, 2004).

Descrevemos neste estudo a primeira identificação de polimorfismos no gene *AANAT* em uma amostra da população brasileira e a tentativa de associações dessas alterações com a preferência diurna.

Dado a associação limítrofe encontrada entre o polimorfismo C -263G no gene *AANAT* e os cronotipos extremos na nossa amostra será importante a partir dos nossos resultados, genotipar este polimorfismo em uma amostra maior para verificar se a associação realmente existe. Ainda um próximo passo será posteriormente analisar em conjunto o papel de variações nos genes *AANAT* e *H1OMT*, pois eles possuem um claro padrão de interação gênica (epistasia) na formação da melatonina e, portanto, estudos associando polimorfismos existentes nestes dois genes são importantes para determinar a possível influência destas variantes gênicas sobre a curva de temporização da síntese de melatonina em indivíduos classificados pela preferência diurna.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

No presente trabalho o rastreamento do gene *AANAT* descreve um grupo pequeno de polimorfismos com frequência bastante rara na amostra da população brasileira estudada. Um ponto importante foi a descoberta de dois novos polimorfismos no gene *AANAT*, A12G e C890T que parecem ser exclusivos da nossa população. O polimorfismo encontrado na região promotora do gene é o mais frequente na população e apresentou uma associação limítrofe com o cronotipo, portanto mais estudos serão necessários a fim de se estabelecer o possível efeito deste polimorfismo no fenótipo.

7. ANEXOS

7.1. Aprovação do CEP



Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

São Paulo, 5 de abril de 2007.
CEP 0106/07

Ilmo(a). Sr(a).
Pesquisador(a) BRUNA DEL VECHIA KOIKE
Co-Investigadores: Sergio Tufik
Disciplina/Departamento: Psicobiologia da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo
Patrocinador: Recursos Próprios.

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA INSTITUCIONAL

Ref: Projeto de pesquisa intitulado: **“Busca de possíveis associações de polimorfismos do gene Aa-nat com os diferentes cronotipos em uma amostragem da população brasileira”.**

CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO: estudo de levantamento genético.

RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE: risco mínimo, desconforto leve com coleta de sangue.

OBJETIVOS: Verificar os polimorfismos e mutações existentes nos 4 éxons do gene Aa-nat e em sua região promotora, buscando associações com diferentes cronotipos em uma amostragem da população brasileira.

RESUMO: Participarão 100 indivíduos, 50 matutinos extremos e 50 vespertinos extremos, que responderam ao questionário de maturidade-vespertinidade adaptado para a língua portuguesa. Os indivíduos serão classificados por sexo e origem étnica. Caso seja encontrado algum polimorfismo, serão comparados a uma amostra de 100 indivíduos da população geral brasileira. Será estudado o DNA estocados do projeto 476/04 aprovado por este CEP. Será realizado após extração, a amplificação por PCR, para cada exon e região promotora a ser analisada, utilizando-se Kit comercial e primers específico as amostras de DNA amplificados por PCR serão submetidas a cromatografia de fase reversa denaturante para a pesquisa de mutações e polimorfismos. Nos indivíduos que mostrarem alteração no cromatograma em alguns exons analisados ou na região promotora, o DNA amplificado será submetido à reação de sequenciamento e os resultados analisados estatisticamente.

FUNDAMENTOS E RACIONAL: Verificar a frequência dos polimorfismos existentes em diferentes etnias para poder estudar a influência que eles exercem na curva de temporização da melatonina e na ritmicidade circadiana.

MATERIAL E MÉTODO: descritos os procedimentos moleculares que serão realizados.

TCLE: haverá utilização de material estocado, anterior à resolução 347/05.

DETALHAMENTO FINANCEIRO: Fapesp.

CRONOGRAMA: 24 meses.

OBJETIVO ACADÊMICO: mestrado.

ENTREGA DE RELATÓRIOS PARCIAIS AO CEP PREVISTOS PARA: **4/4/2008 e 4/4/2009.**

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



Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

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

RECOMENDAÇÃO: De acordo com a resolução 347/05, o armazenamento de material biológico e sua utilização futura, deverá ocorrer somente mediante autorização do paciente

7.2. Extração de DNA

1° dia:

- Centrifugar os tubos de EDTA com sangue total por 5 minutos a 3000 rpm para a retirada da camada de leucócitos
- Pipetar a camada de leucócitos e transferi-la para um tubo falcon 15mL
- Acrescentar *blood lysis* 1X até completar o tubo
- Homogeneizar bem no vortex
- Deixar por 30 minutos no gelo
- Centrifugar 20 minutos a 3000 rpm
- Entornar o sobrenadante e manter o precipitado
- Colocar 3mL de *núcleo lysis*1X e vortexar até soltar o precipitado
- Acrescentar 300µL de SDS 10% e 100 µL de proteinase K
- Vortexar por 10 minutos
- Colocar na estufa a 37°C até o dia seguinte

2° dia:

- Ligar o banho seco a 65°C
- Retirar da estufa e adicionar 1mL de NaCl 6M saturado
- Homogeneizar bem
- Centrifugar por 60 minutos a 3000 rpm
- Transferir o sobrenadante para um tubo limpo e desprezar o precipitado
- Precipitar o DNA adicionando etanol absoluto
- Homogeneizar por inversão
- Coletar o DNA

- Passar o DNA para um eppendorf contendo uma solução de etanol 70%
- Retirar o etanol, deixando o DNA no tubo
- Deixar o eppendorf aberto por 15 minutos para evaporar o restante do etanol
- Diluir o DNA em 200 μ L de água milliQ
- Incubar a 65°C no banho seco durante 60 minutos para eliminar a contaminação por DNase
- Estocar a 4°C

7.3. Purificação de DNA

- volume inicial 100µL de DNA
- adicionar 400µL de isopropanol 100%
- agitar 5 minutos por inversão
- centrifugar 15 minutos a 12.000 rpm
- retirar o sobrenadante
- adicionar 400 µL de etanol 70%
- agitar 5 minutos por inversão
- Retirar o sobrenadante
- Secar a 55°C por 15 minutos
- Ressuspender em 100µL de água milliQ

7.4. Concentração das reações de PCR

Exon 1, 2, 3 e Promotor

H₂O – para completar 50µL

Tampão 10X – 5µL – 1X

dNTP – 2µL – 0,4mM de cada base

Mg – 1,5 µL – 1,5 mM

Primer 1 – 1,0µL – 0,2µM

Primer 2 – 1,0µL – 0,2µM

Platinum Taq DNA polimerase – 0,25µL – 1,25 unidades

DNA – 100ng

Exon 4

H₂O – para completar 25 µL

Tampão 10X – 2,5 µL – 1X

dNTP – 1,0 µL – 0,4mM de cada base

Mg – 0,5 µL – 0,25mM

Primer 1 – 0,25 µL – 0,05µM

Primer 2 – 0,25 µL – 0,05µM

Platinum Taq DNA polimerase – 0,25 µL – 1,25 unidades

DNA –100 ng

7.5. Protocolos das reações de PCR

Éxons 1, 2 e 3

95°C – 5:00 minutos
95°C – 0:30 minutos
58°C – 0:30 minutos
72°C – 0:30 minutos
75°C – 5:00 minutos
4°C – for ever

} 30 vezes

Éxon 4

95°C – 5:00 minutos
95°C – 0:30 minutos
61,3°C – 0:30 minutos
72°C – 0:30 minutos
72°C – 5:00 minutos
4°C – for ever

} 38 vezes

Região Promotora

95°C – 5:00 minutos
95°C – 0:30 minutos
64,8°C – 0:30 minutos
72°C – 0:30 minutos
75°C – 5:00 minutos
4°C – for ever

} 34 vezes

7.6. Protocolo de seqüenciamento Dyanamic:

H₂O – para completar 20 µL

Tampão 10X – 4,0 µL

Mix – 4,0 µL

Primer – 0,2µL

Produto de DNA – 1,0 µL

Ciclagem:

95°C – 20 segundos	}	25 vezes
50°C – 15 segundos		
60°C – 60 segundos		
4°C – forever		

Precipitação:

- Adicionar 2µL de acetato e 80 µL de etanol 95%
- Vortexar
- Centrifugar 15 minutos a 14000 rpm
- Aspirar o sobrenadante
- Lavar com 200µL de etanol 70%
- Centrifugar 5 minutos a 14000 rpm
- Aspirar o sobrenadante
- Secar 4 minutos a 90°C

7.7. Fragmentos amplificados por PCR

Seqüência do éxon 1

```
GTCATCCTGCCTGGGATAGCTcgagagggtgggggtggggggattacaaaccttaacagcaccac  
aggctgcccggggaacatctgctactacagccttgagcccggagtcgggattttactggttcccgtgctgcgg  
acaggccccagggttagcggctttgtggaggggaacactgggtatcctctccacagtccaggtagggtgggacc  
cccactcctggctctcagccttaggaacaggagcttctctACTTGGAGCTTCTAGACATGGA
```

Em vermelho estão representados os primers utilizados para a amplificação da PCR, em azul a região intrônica que flanqueia o éxon 1 e em preto a seqüência gênica correspondente ao éxon 1 que não é traduzido em proteína.

Seqüência do éxon 2

```
GATGAGGATGAGACCCCTGTcccttgctgttccaacagggtgctgggaggccctccttgcttagg  
aggacactccaaagctggggcgcccaaggaggcaccagtggccagaATGTCCACGCAGAGCA  
CCCACCCCTGAAACCTGAGGCCCA[C/T]GTCTGCCACCTGGGATCCCCG  
AGTCCCCGAGCTGTCAGCGGCCACACACTCCCTGCCAGTGAGTTTCGCT  
GCCTCACCCCGGAGGACGCTGTCAGCGCCTTTGAGATCGAGCGTGAAGgtga  
gtggccccgcacagggtcAGAGGGATGCTCCACTCTGG
```

Em vermelho estão representados os primers utilizados para a amplificação da PCR, em azul está a parte intrônica adjacente ao éxon 2, em preto a região correspondente ao éxon 2 sendo representada em letras minúsculas a parte não traduzida em proteína (“untranslated region”) e em maiúsculas a parte codificante. Entre colchetes está o polimorfismo rs34470791.

Seqüência do éxon 3

```
CCTAACCCCATTTTCCTGTggggaacggggcatctgagtgacactcgggggtgcagcagacag  
tgagcgcgaggcacagcgactaccagtcacccacctgagcctcctgccacagCCTTCATCTCCGTCT  
TGGGCGTCTGCCCCCTGTACCTGGATGAGATCCGGCACTTCCTGACCCTAT  
GTCCAGAGCTGTCCCTGGGCTGGTTCGAGGAGGGCTGCCTTGTGGCCTTCA  
TCATCGGCTCGCTCTGGGACAAGGAGAGACTCATGCAGgtgaggacagggctgcga  
cgcccagctccaggaggcc[t/a]ctgaaGACAGAGGTCAGCCAGATGG
```

Em vermelho estão representados os primers utilizados para a amplificação da PCR, em azul está a parte intrônica adjacente ao éxon 3, e em preto a região correspondente ao éxon 3, que é traduzido inteiramente. Entre colchetes, o polimorfismo rs4646261.

Seqüência do éxon 4

```
CTGCCTGGGTTGGTGGTTgggggggagcacgtgtcagcagaagtgacctgggatctcatcccttgc
tcgctcccagGAGTCACTGACGCTGCACAGGTCTGGGGGCCACATAGCCCACCT
GCATGTGCTGGCCGTGCACCGC[G/A]CCTTCCGGCAGCAGGGCAGGGGCC
CCATCCTGCTGTGGCGCTACCTGCACCACCTGGGCAGCCAGCCGGCCGTG
CGCCGGGC[C/T]GCGCTCATGTGCGAGGACGCGCTGGTACCCTTCTATGAG
AGGTTCACTTCCACGCCGTGGGCCCTGCGCCATCACCGTGGGCTCCCTC
ACCTTCATGGAGCTCCACTGCTCCCTGCGGGGCCACCCCTT[C/T]CTGCGCA
GGAACAGCGGCTGCTGAactgggctgccacctggctgccaacatgatccccgtctctgccctgggc
tcctcttagctcagctgagcatggagacagcagttccagagagtggagagagcagggctaaataaagagga
gataaggtggctctcacggcctgagctggagtggtgtgtctgtctgtccccacgaggcctctggacctctgtgtt
ctgaactctgtacctgagaccgggctgggttgtaagcggGGACAATGGGAGGTGCTG
```

Em vermelho estão representados os primers utilizados para a amplificação da PCR, em azul está a parte intrônica adjacente ao éxon 4, em preto a região correspondente ao éxon 4 sendo representada em letras minúsculas a parte não traduzida em proteína (“untranslated region”) e em letras maiúsculas a parte codificante. Entre colchetes estão os polimorfismos rs28936679, rs2071031 e rs28697191, descritos nos bancos de dados.

Seqüência da Região Promotora

```
GTTTGGTAGGGCAACCTCCTGaatatttaaatttaattaaattaaatttaataaacttgaagta
gaacgtacttaaagtcacaaattgtagcttgaattcccaccccctccccacataagaggtggg[c/g]ttgtc
caagactccgagggacagagggagaatcgctggtgccagccagtcggtgacagagcagggattagagatg
ga[c/*]ccctgaggcttagccccacgctctctccccaaaccctggggcctcagtcagcctctgtaatcccttctg
tgccagggcaccagagctgacgttcccttcagcaaggcaggggcccaggtgccagagccctgctggcgtc
atcctgcctgggatagctcgagaggtgggtgggggattacaaaCCTCTAACAGCACACAGGC
```

Em vermelho estão representados os primers utilizados para a amplificação da PCR, em preto a região correspondente a região promotora. Em realce amarelo estão indicados os sítios de ligação CREB/CRE. E entre colchetes estão indicados os polimorfismos rs4238989 e rs35065674 descritos para esta região.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abrahamson EE, Moore RY. Suprachiasmatic nucleus in the mouse: retinal innervation, intrinsic organization and efferent projections. *Brain Res*, Oct 19;916(1-2):172-91, 2001.

Aeschbach D, Sher L, Postolache TT, Matthews JR. A Longer Biological Night in Long Sleepers Than in Short Sleepers. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 88(1):26–30, 2003.

Barbosa AA, Pedrazzoli M, Koike BDV, Tufik S. Do Caucasian and Asian Clocks tick differently? Dados submetidos.

Benedito-Silva AA, Menna-Barreto L, Marque N, Tenreiro S. A Self-Assessment Questionnaire for the Determination of Morningness-Eveningness Types in Brazil. In: Hayes DK, Pauly JE & Reiters RJ eds. *Cronobiology: Its Role in Clinical Medicine, General Biology and Agriculture, Part B*. Alan R. Liss, Inc., New York, 341B, p. 89-98, 1990.

Blomeke B, Golka K, Griefahn B, Roemer HC. Arylalkylamine N-acetyltransferase (AANAT) genotype as a personal trait in melatonin synthesis. *J Toxicol Environ Health A*.71(13-14):874-6, 2008.

Cagnacci A, Krauchi K, Wirz-Justice A, Volpe A. Homeostatic versus circadian effects of melatonin on core body temperature in humans. *J Biol Rhythms*. 12(6):509-517, 1997.

Ciarleglio CM, Ryckman KK, Servick SV, Hida A, Robbins S, Wells N, Hicks J, Larson SA, Wiedermann JP, Carver K, Hamilton N, Kidd KK, Kidd JR, Smith JR, Friedlaender J, McMahon DG, Williams SM, Summar ML, Johnson CH. Genetic differences in human circadian clock genes among worldwide populations. *J Biol Rhythms*. 2008 Aug;23(4):330-40.

Coon SL, Roseboom PH, Baler R, Weller JL, Namboodiri MMA, Koonin EV, Klein DC. Pineal serotonin N-acetyltransferase: expression cloning and molecular analysis. *Science (Wash DC)*. 270:1681-1683, 1995.

Coon SL, Mazuruk K, Bernard M, Roseboom PH, Klein DC, Rodriguez IR. The human serotonin N-acetyltransferase (EC 2.3.1.87) gene (AANAT): structure, chromosomal localization, and tissue expression. *Genomics*. 34:76-84, 1996.

Coon SL, Del Olmo E, Young WS 3rd, Klein DC. Melatonin synthesis enzymes in *Macaca mulatta*: focus on arylalkylamine N-acetyltransferase (EC 2.3.1.87). *J Clin Endocrinol Metab*. Oct;87(10):4699-706, 2002.

Coon SL, Klein DC. Evolution of arylalkylamine N-acetyltransferase: emergence and divergence. *Mol Cell Endocrinol*. Jun 27;252(1-2):2-10, 2006.

Costa PJMS, Vilela RQB, Cipolotti R e Figueiredo MS. Clinical and laboratorial diversity in the bantu haplotype of sickle cell anemia. *Rev. bras. hematol. hemoter*. 28(1):40-44, 2006.

Czeiler CA & Khalsa SBS. The human circadian timing system and sleep-wake regulation. In: Kryger MH, Roth T, Dement WC; editors. *Principles and practice of sleep medicine*. Philadelphia:WB Saunders. 353-375, 2000.

De Angelis J, Gastel J, Klein DC, Cole PA. Kinetic analysis of the catalytic mechanism of serotonin N-acetyltransferase (EC 2.3.1.87). *J Biol Chem*. Jan 30;273(5):3045-50, 1998.

Dijk DJ e Schantz M. Timing and consolidation of human sleep, wakefulness, and performance by a symphony of oscillators. *J Biol Rhyth*. 20(4):279-290, 2005.

Duffy LF, Dijk DJ, Hall EF, Czeisler CA. Relationship of endogenous circadian melatonin and temperature rhythms to self-reported preference for morning or evening activity in young and older people. *J Investig Med*. 47:(3):141-150, 1999.

Dunnen JT e Antonarakis E. Nomenclature for the description of human sequence variations. *Hum Genet* 109 :121–124, 2001.

Ganguly S, Gastel JA, Weller JL, Schwartz C, Jaffe H, Namboodiri MA, Coon SL, Hickman AB, Rollag M, Obsil T, Beauverger P, Ferry G, Boutin JA, Klein DC. Role of a pineal cAMP-operated arylalkylamine N-acetyltransferase/14-3-3-binding switch in melatonin synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jul 3;98(14):8083-8, 2001.

Gastel JA, Roseboom PH, Rinaldi PA, Weller JL, Klein DC. Melatonin production: proteasomal proteolysis in serotonin N-acetyltransferase regulation. *Science* 279:1358–1360, 1998.

Golombek D, Cardinali D, Aguilar-Roblero R. Mecanismos de temporização em vertebrados. In: Marques N.; Menna-Barreto L. (Orgs.). *Cronobiologia princípios e aplicações*. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, p. 153-161, 1997.

Hardeland R. Antioxidative protection by melatonin - Multiplicity of mechanisms from radical detoxification to radical avoidance. *Endocrine*. 27:119-130, 2005.

Harrington & Mistlberger. In: Kryger MH, Roth T, Dement WC. *Principles and practice of sleep medicine*. Philadelphia:WB Saunders, 2000.

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*. 4(3):151-3, 2003.

Hong JS, Kim SW e Koo JS. Sp1 up-regulates cAMP-response-element-binding protein expression during retinoic acid-induced mucous differentiation of normal human bronchial epithelial cells. *Biochem. J.* 410: 49–61, 2008.

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

Huber CG, Oefner PJ, Preuss E, Bonn GK. High-resolution liquid chromatography of DNA fragments on non-porous poly(styrene-divinylbenzene) particles. *Nucleic Acid Res*; 21 (5): 1061-6, 1993.

Illnerova H. The suprachiasmatic nucleus and rhythmic pineal melatonin production. In *Suprachiasmatic Nucleus. The Mind's Clock*, ed. Klein DC, Moore RY & Reppert SM, pp.197–216. Oxford University Press, New York. 1991.

Kalsbeek A, Garidou ML, Palm IF, Van Der Vliet J, Simonneaux V, Pévet P, Buijs RM. Melatonin sees the light: blocking GABA-ergic transmission in the paraventricular nucleus induces daytime secretion of melatonin. *Eur J Neurosci.* Sep;12(9):3146-54, 2000.

Katzenberg D., Young T., Finn L., Lin L., King D. P., Takahashi J. S., and Mignot E. 1998 A *CLOCK* polymorphism associated with human diurnal preference. *Sleep* 21, 569–576.

Klein DC, Coon SL, Roseboom PH, Weller JL, Bernard M, Gastel JA, Zatz M, Iuvone PM, Rodrigues IR, Begay V, et al. The melatonin rhythm generating enzyme: molecular regulation of N-acetyltransferase in pineal gland. *Recent Prog Horm Res.* 52:307-358, 1997.

Klein DC, Ganguly S, Coon SL, Shi Q, Gaildrat P, Morin F, Weller JL, Obsil T, Hickman A, Dyday F. 14-3-3 Proteins in Pineal Photoneuroendocrine Transduction: How Many Roles? *Journal of Neuroendocrinology*, 15:370–377, 2003.

Lakshminarayan K, Anderson DC, Gensinger RA Jr. Using a stroke database to develop an optimal vascular imaging protocol for ischemic stroke. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* May-Jun;13(3):113-7, 2004.

Markus RP, Santos JM, Zago WM, Reno LAC. Melatonin Nocturnal Surge Modulates Nicotinic Receptors and Nicotine-Induced [3H]Glutamate Release in Rat Cerebellum Slices. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 305, p. 525-530, 2003.

Marques N e Menna-Barreto L. *Cronobiologia: Princípios e Aplicações*. 3ª edição. São Paulo: Editora da Universidade São Paulo, 2003.

Miller AS, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acid Res*, 16(3):1212, 1998.

Moore RY. Suprachiasmatic nucleus in sleep–wake regulation. *Sleep Medicine* 8 S27–S33, 2007.

Mueller JC. Linkage disequilibrium for different scales and applications. *Briefings in Bioinformatics.* Dec 5(4): 355-365, 2004.

Nelson DL e Cox MM. *Lehninger Princípios de Bioquímica*. 3º edição. Editora Sarvier, 2002.

Nussbaum RL, McInnes RR, Williard HF. Thompson & Thompson Genética Médica. 6. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 2002.

Obsil T, Ghirlando R, Klein DC, Ganguly S, Dyda F. Crystal structure of the 14-3-3^ζ:serotonin N-acetyltransferase complex. A role for scaffolding in enzyme regulation. *Cell* 105, 257–267, 2001.

Pedrazzoli M e Pereira DS. 24h timing molecules: implications for circadian rhythms phenotypes in humans. *Hypnos*, 1 suppl:130-141, 2004.

Pereira D. S., Tufik S., Louzada F. M., Benedito-Silva A. A., Lopez A. R., Lemos N. A. *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* 28, 29–32, 2005.

Pereira DS, Pedrazzoli M, Koike Bdel V, Louzada FM, Benedito-Silva AA, Lopez AR, Tufik S. The G619A *AANAT* gene polymorphism does not contribute to sleep time variation in the Brazilian population. *Behav Genet.* Jul;37(4):637-8, 2007.

Pereira DS. Análise Molecular de genes envolvidos na via de síntese da melatonina e suas relações com fenótipos circadianos em humanos. Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, para obtenção do Título de Mestre em Ciências. 2007.

Popat S, Hearle N, Hogberg L, Braegger CP, O'Donoghue D, Falth-Magnusson K, Holmes GK, Howdle PD, Jenkins H, Johnston S, Kennedy NP, Kumar PJ, Logan RF, Marsh MN, Mulder CJ, Torinsson Naluai A, Sjoberg K, Stenhammar L, Walters JR, Jewell DP, Houlston RS. Variation in the CTLA4/CD28 gene region confers an increased risk of celiac disease. *Ann Hum Genet.* 2002 Mar;66(Pt 2):125-37.

Reiter RJ. The melatonin rhythm: both a clock and a calendar. *Experientia.* 49(8):654-664. Review, 1993.

Reiter RJ. Melatonin: Clinical relevance. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 17(2):273-85. Review, 2003.

Roseboom PH, Klein DC. Norepinephrine stimulation of pineal cyclic AMP response element-binding protein phosphorylation: primary role of a beta-adrenergic receptor/cyclic AMP mechanism. *Mol Pharmacol.* Mar;47(3):439-49, 1995.

Schibler U, Ripperger J, Brown SA. Peripheral circadian oscillators in mammals: time and food. *J Biol Rhythms.* 18(3):250-60, 2003.

Schibler U. The daily rhythms of genes, cells and organs. Biological clocks and circadian timing in cells. *EMBO Rep.* 6 Spec No:S9-13, 2005.

Seabra MLV. Melatonina e sono. In: Tufik S. Sono aspectos básicos. São Paulo: Departamento de Psicobiologia/ Instituto do Sono - UNIFESP, IX-1 - IX-14, 2000.

Sekine A, Saito S, Iida A, Mitsunobu Y, Higuchi S, Harigae S, Nakamura Y. Identification of single nucleotide polymorphisms (SNPs) of human N-acetyltransferase genes NAT1, NAT2, AANAT, ARD1, and L1CAM in the Japanese population. *J Hum Genet* 46:314-319, 2001.

Severino G, Manchia M, Contu P, Squassina A, Lampus S, Ardu R, Chillotti C, Del Zompo M. Association study in a Sardinian sample between bipolar disorder and the nuclear receptor REV-ERB α gene, a critical component of the circadian clock system. *Bipolar Disord.* Mar;11(2):215-20, 2009.

von Schantz M. Phenotypic effects of genetic variability in human clock genes on circadian and sleep parameters. *J Genet.* Dec;87(5):513-9, 2008.

Simonneaux V, Ribelayga C. Generation of the melatonin endocrine message in mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters. *Pharmacol Rev.* Jun;55(2):325-95, 2003.

Sookoian S, Gemma C, Gianotti TF, Burgueño A, Castaño G, Pirola CJ. Am J Clin Nutr. Genetic variants of Clock transcription factor are associated with individual susceptibility to obesity. *Jun;87(6):1606-15*, 2008.

Sudgen D. Melatonin biosynthesis in the mammalian pineal gland. *Experientia* 45:932-992, 1989.

Tan NY e Khachigian LM. SP1 Phosphorylation and Its Regulation of Gene Transcription. *Mol Cell Biol.* 29 (10): 2483-2488, 2009.

TFSEARCH: Searching Transcription Factor Binding Sites (ver 1.3). Parallel Application TRC Laboratory, RWCP, Japan. Disponível em: www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html.

Thompson & Thompson. *Genética Médica – 6ª edição*. Editora Guanabara Koogan S.A. Rio de Janeiro, RJ. 2002.

Toh KL, Jones CR, He Y, Eide EJ, Hinz WA, Virshup DM, Ptáček LJ, Fu YH. Na hPer2 phosphorylation site mutation in familial advanced sleep phase syndrome. *Science.* Feb 9; 291(5506): 1040-3, 2001.

Traherne JA. Human MHC architecture and evolution: implications for disease association studies. *Int J Immunogenet.* Jun;35(3):179-92, 2008.

Walraven JM, Zang Y, Trent JO, Hein DW. Structure/function evaluations of single nucleotide polymorphisms in human N-acetyltransferase 2. *Curr Drug Metab.* Jul;9(6):471-86, 2008.

Walter DJ, Bader M. A unique central tryptophan hydroxylase isoform. *Biochem Pharmacol.* 66(9):1673-80, 2003.

Wang GY, Lee CG, Lee EJ. Genetic variability of N-acetyltransferase (AA-NAT) gene and human sleep/wake pattern. *Chronobiol Int.* 21(2):229-37, 2004.

Ying GW, Lee CG, Lee EJ. A naturally occurring -263 GC variant of the human AA-NAT gene and overnight melatonin production. *Mol Genet Metab.* 81(1):65-9, 2004.