

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ARTES, CIÊNCIAS E HUMANIDADES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MODELAGEM DE SISTEMAS
COMPLEXOS

JULIANA VIANA MENDES

Caracterização fenotípica de ritmos circadianos, sono e Índice de Massa Corporal (IMC) em estudantes universitários com diferentes genótipos para o polimorfismo VNTR no gene *PER3*

São Paulo

2022

JULIANA VIANA MENDES

Caracterização fenotípica de ritmos circadianos, sono e Índice de Massa Corporal (IMC) em estudantes universitários com diferentes genótipos para o polimorfismo VNTR no gene *PER3*

Versão original

Dissertação apresentada à Escola de Artes, Ciências e Humanidades da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação em Modelagem de Sistemas Complexos.

Área de Concentração: Sistemas Complexos Aplicados às Ciências Biológicas

Orientador: Prof. Dr. Mario Pedrazzoli Neto

Co-orientadora: Profa. Dra. Ana Amélia Benedito-Silva

São Paulo

2022

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca da Escola de Artes, Ciências e Humanidades,
com os dados inseridos pelo(a) autor(a)
Brenda Fontes Malheiros de Castro CRB 8-7012; Sandra Tokarevicz CRB 8-4936

Viana Mendes, Juliana

Caracterização fenotípica de ritmos circadianos, sono e Índice de Massa Corporal (IMC) em estudantes universitários com diferentes genótipos para o polimorfismo VNTR no gene PER3 / Juliana Viana Mendes; orientador, Mario Pedrazzoli Neto; coorientadora, Ana Amélia Benedito Silva. -- São Paulo, 2022.

92 p: il.

Dissertacao (Mestrado em Ciencias) - Programa de Pós-Graduação em Modelagem de Sistemas Complexos, Escola de Artes, Ciências e Humanidades, Universidade de São Paulo, 2022.

Versão original

1. Gene PER3. 2. Sono. 3. Índice de Massa Corporal. 4. Metabolismo. I. Pedrazzoli Neto, Mario, orient. II. Silva, Ana Amélia Benedito, coorient. III. Título.

Dedico este trabalho aos meus pais, Maria e Wilson, que com todo seu amor e compreensão sempre me apoiaram. Dedico também a todos os educadores, que passaram pela minha vida e a transformaram.

Agradecimentos

Aos meus pais, por todo apoio e incentivo que me deram ao longo de toda minha vida.

Aos meus orientadores, Prof. Dr. Mario Pedrazzoli Neto e Profa. Dra. Ana Amélia Benedito-Silva, por todos os ensinamentos (pessoais e profissionais) transmitidos ao longo destes anos em que trabalhamos juntos. Agradeço também pelas inúmeras oportunidades que me foram dadas, as quais foram fundamentais para meu crescimento pessoal.

Aos colegas do Grupo Interdisciplinar de Pesquisa em Sono (GIPSO), por todo conhecimento e experiência compartilhados. Agradeço também a todos que me ajudaram durante a coleta de dados durante o desenvolvimento do presente trabalho.

À Maria Augusta Medeiros Andrade (Guta) pela parceria que começou durante o mestrado e que pretendo levar para a vida. Guta, muito obrigada! Você me ajudou em cada pequena etapa, do começo ao fim. Você foi fundamental para que este projeto acontecesse!

À Daniel Vartanian (Dani) por todo ensinamento no ramo da bioinformática e pela ajuda com as questões organizacionais deste projeto.

Aos meus professores do Ensino Fundamental e Médio (Cinthia, Fabiana, Fabiane, Germano, João, Jorge e Ricardo), por me ensinarem muito mais do que os conteúdos da grade curricular. Obrigada por, tão cedo, me mostrarem a importância do senso crítico perante o mundo. Agradeço também pelas músicas, pelos filmes e livros compartilhados, os quais, hoje, fazem de mim quem sou.

Ao Prof. Dr. Fernando Mazzilli Louzada que, como meu orientador de Iniciação Científica, me apresentou o universo da Cronobiologia.

Aos meus amigos, por todo amor, toda paciência e compreensão durante a minha jornada acadêmica.

Aos voluntários do presente estudo, que sempre foram muito solícitos e receptivos.

À FAPESP, pelo apoio financeiro fornecido através da bolsa de mestrado concedida.

Este trabalho recebeu apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo nº 2019/06294-2.

“A noite

Lá na infância, Helena se fez de adormecida e escapou da cama. Vestiu-se com esmero, como se fosse domingo, e com todo sigilo deslizou até o quintal e sentou-se para descobrir os mistérios da noite de Tucumán. Seus pais dormiam, suas irmãs também. Ela queria ver como a noite crescia, e como viajavam a lua e as estrelas. Alguém tinha dito a ela que os astros se movem, e que às vezes caem, e que o céu vai mudando de cor enquanto a noite caminha. Naquela noite, noite da revelação da noite, Helena olhava sem piscar. Seu pescoço doía, doíam os olhos, e ela esfregava as pálpebras e tornava a olhar. E olhou e olhou e continuou olhando, e o céu não mudava, e a lua e as estrelas continuavam quietas em seu lugar. Foi acordada pelas luzes do amanhecer. Helena lacrimejou. Depois, se consolou pensando que a noite não gosta que espiem seus segredos.” (GALEANO, 2018, p.46¹)

¹ *Bocas do Tempo*. Eduardo Galeano – Porto Alegre, RS: L&PM, 2018.

Resumo

VIANA-MENDES, Juliana. **Caracterização fenotípica de ritmos circadianos, sono e Índice de Massa Corporal (IMC) em estudantes universitários com diferentes genótipos para o polimorfismo VNTR no gene *PER3***. 2022. 92 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Artes, Ciências e Humanidades, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

Introdução: O sistema molecular de temporização circadiana envolve genes conhecidos como “genes relógio”, tais como o gene *PER3*. Estes genes são associados à regulação de processos como a adaptação ao ciclo claro/escuro ambiental, ao ciclo sono/vigília e ao ciclo de temperatura corporal. Estudos demonstram a associação entre um polimorfismo de repetição (VNTR) do gene *PER3* com os cronotipos e com a ocorrência de distúrbios de ritmos circadianos. **Objetivo:** Investigar as possíveis relações entre o perfil de sono, o perfil do ritmo atividade/repouso, o metabolismo e o polimorfismo de repetição VNTR do gene *PER3*.

Materiais e métodos: O estudo foi realizado em uma amostra universitária da Escola de Artes, Ciências e Humanidades da Universidade de São Paulo em duas etapas: na primeira etapa, realizada em 2019, 513 alunos tiveram amostras de salivas coletadas e todos foram genotipados (de acordo com os três genótipos possíveis: *PER3*^{4/4}, *PER3*^{4/5} e *PER3*^{5/5}) para o polimorfismo de repetição VNTR do gene *PER3*. Nesta etapa, dados antropométricos e de hábitos de sono foram coletados via questionário *on-line*; na segunda etapa, durante a pandemia de COVID-19, dados de antropometria, dados de sono e de atividade motora foram obtidos de uma subamostra de 81 alunos, somente dos genótipos *PER3*^{4/4} e *PER3*^{5/5}, que concordaram em utilizar actígrafos de punho. **Resultados:** Na primeira etapa do estudo, 467 indivíduos (91,03% da amostra inicial) tiveram seu genótipo identificado:

196 eram *PER3*^{4/4}, 212 eram *PER3*^{4/5} e 59 eram *PER3*^{5/5}. Na segunda etapa do experimento, 48 sujeitos *PER3*^{4/4} e 33 sujeitos *PER3*^{5/5} utilizaram um actígrafo de punho por, em média, 15 dias consecutivos. Os horários de início e término do sono dos no grupo *PER3*^{5/5} ocorreram mais tarde do que os do grupo *PER3*^{4/4}, o mesmo ocorrendo com a meia-fase de sono dos dias de estudo (MSW) e dos dias livres (MSF), e com a meia-fase de sono corrigida pelo débito de sono acumulado ao longo da semana (MSFsc). Apesar das diferenças de fase encontradas entre os grupos *PER3*^{4/4} e *PER3*^{5/5}, não foram encontradas diferenças na duração de sono e no *jetlag* social. Contudo, o grupo *PER3*^{4/4} apresentou, em média, maior rebote de sono quando comparado aos *PER3*^{5/5}. O grupo *PER3*^{5/5} apresentou menor estabilidade circadiana (IS) e maior fragmentação (IV) do ritmo atividade/repouso do que o grupo *PER3*^{4/4}. Não houve associação entre a variação do IMC ao longo do tempo (Δ IMC) e as variáveis de sono. Foi observada uma correlação estatisticamente significativa entre Δ IMC e a estabilidade interdiária (IS) ($r=-0,279$; $p=0,027$) considerando-se todos os indivíduos; apenas no grupo *PER3*^{4/4} foi encontrada uma correlação significativa entre Δ IMC e a variabilidade intradiária (IV) ($r=0,375$; $p=0,022$). **Conclusão:** Os achados do presente estudo mostram que há associações entre gene *PER3*, sono, ritmos circadianos e aspectos do metabolismo. De forma geral, encontramos que o gene está ligado à expressão dos horários de sono e da fase do ritmo de atividade/repouso, e que há também uma mediação gênica de aspectos do metabolismo ligados ao IMC, em função de uma disrupção rítmica. Os experimentos aqui realizados contaram com o cenário da pandemia de COVID-19, o qual deve ser considerado como um elemento ambiental com potencial atuante nos resultados obtidos.

Palavras-chave: Gene *PER3*. Sono. Índice de Massa Corporal. Metabolismo.

Abstract

VIANA-MENDES, Juliana. **Phenotypic characterization of circadian rhythms, sleep, and Body Mass Index (BMI) in undergraduate students with different genotypes for the VNTR polymorphism in the *PER3* gene.** 2022. 92 p. Dissertation (Master of Science) – School of Arts, Sciences and Humanities, University of São Paulo, São Paulo, 2022.

Introduction: The molecular circadian system temporization involves genes known as “clock genes”, such as the *PER3* gene. These genes are associated with the regulation of processes such as adaptation to the environmental light/dark cycle, the sleep/wake cycle, and the body temperature cycle. Studies demonstrate the association between a repeat polymorphism (VNTR) of the *PER3* gene with chronotypes and with the occurrence of circadian rhythm disorders. **Objective:** To investigate the possible relationship between the sleep profile, the activity/rest rhythm profile, metabolism, and the VNTR repeat polymorphism of the *PER3* gene. **Material and methods:** The study was carried out on an undergraduate sample from the School of Arts, Sciences and Humanities of the University of São Paulo in two stages: in the first stage, carried out in 2019, 513 students had saliva samples collected and all were genotyped (according to the three possible genotypes: *PER3*^{4/4}, *PER3*^{4/5}, and *PER3*^{5/5}) for the VNTR repeat polymorphism of the *PER3* gene. At this stage, anthropometric and sleep habits data were collected via an online questionnaire; in the second stage, during the COVID-19 pandemic, anthropometry data and sleep and motor activity data were obtained from a subsample of 81 students, only of the *PER3*^{4/4} and *PER3*^{5/5} genotypes, who agreed to use wrist actigraphs. **Results:** In the first stage of the study, 467 individuals (91.03% of the initial sample) had their genotype identified: 196 were *PER3*^{4/4}, 212 were *PER3*^{4/5} and 59 were *PER3*^{5/5}. In the second stage of the experiment, 48 *PER3*^{4/4}

subjects and 33 *PER3^{5/5}* subjects used a wrist actigraph for, on average, 15 consecutive days. The sleep start and end times of the *PER3^{5/5}* group occurred later than those of the *PER3^{4/4}* group, the same occurring with the mid-sleep phase of study days (MSW) and days off (MSF), and with the mid-sleep phase corrected for sleep debt accumulated over the week (MSFsc). Despite the phase differences found between the *PER3^{4/4}* and *PER3^{5/5}* groups, no differences were found in sleep duration and social jetlag. However, the *PER3^{4/4}* group presented, on average, greater sleep rebound when compared to the *PER3^{5/5}*. The *PER3^{5/5}* group showed lower interdaily stability (IS) and greater fragmentation (IV) of the activity/rest rhythm than the *PER3^{4/4}* group. There was no association between BMI variation over time (BMI) and sleep variables. A statistically significant correlation was observed between BMI and interdaily stability (IS) ($r=-0.279$; $p=0.027$) considering all individuals; only in the *PER3^{4/4}* group, a significant correlation was found between BMI and intraday variability (IV) ($r=0.375$; $p=0.022$). **Conclusion:** The findings of the present study show that there are associations between the *PER3* gene, sleep, circadian rhythms, and aspects of metabolism. In general, we found that the gene is linked to the expression of sleep schedules and the phase of the activity/rest rhythm and that there is also a genetic mediation of aspects of metabolism linked to BMI, due to a rhythmic disruption. The experiments carried out here were based on the COVID-19 pandemic scenario, which should be considered as an environmental element with active potential in the results obtained.

Keywords: *PER3* gene. Sleep. Body Mass Index. Metabolism.

Lista de figuras

Figura 1. Sincronização (arrastamento) de um ritmo endógeno a um ritmo exógeno.	16
Figura 2. Alça de <i>feedback</i> autorregulatória da ritmicidade circadiana em mamíferos.	18
Figura 3. Diagrama esquemático da proteína PER3 humana.	19
Figura 4. Representação dos três modos em que os dados de atividade são digitalizados e armazenados no actígrafo de punho.	23
Figura 5. Desenho do estudo.	28
Figura 6. Actígrafo de punho ActTrust, fabricado pela Condor Instruments.	29
Figura 7. Genotipagem para o polimorfismo VNTR do gene <i>PER3</i>	34
Figura 8. Exemplo de um registro actigráfico durante 14 dias consecutivos.	36
Figura 9. Comparação do perfil de sono entre os indivíduos portadores dos genótipos <i>PER3</i> ^{4/4} e <i>PER3</i> ^{5/5} durante os dias de estudo.	39
Figura 10. Comparação do perfil de sono entre os indivíduos portadores dos genótipos <i>PER3</i> ^{4/4} e <i>PER3</i> ^{5/5} durante o final de semana.	39
Figura 11. Diagrama de dispersão Δ IMC vs. Variabilidade intradiária (grupo <i>PER3</i> ^{4/4}).	43
Figura 12. Diagrama de dispersão Δ IMC vs. Estabilidade interdiária (todos os indivíduos).	43

Lista de tabelas

Tabela 1. Caracterização da amostra.	33
Tabela 2. Frequências alélicas e genóticas para o polimorfismo VNTR do gene <i>PER3</i>	34
Tabela 3. Sono noturno e sonecas no momento da coleta, dias de estudo ou dias livres, dentre genótipos <i>PER3</i> ^{4/4} e <i>PER3</i> ^{5/5}	38
Tabela 4. Dados de sono separados por genótipos.	40
Tabela 5. Caracterização das variáveis circadianas de atividade e repouso nos genótipos <i>PER3</i> ^{4/4} e <i>PER3</i> ^{5/5} para o polimorfismo VNTR do gene <i>PER3</i>	41
Tabela 6. Correlação de Pearson entre Δ IMC, variáveis de sono e variáveis circadianas.	42

Sumário

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	RITMOS BIOLÓGICOS E O CICLO CLARO/ESCURO AMBIENTAL	15
1.2	BIOLOGIA MOLECULAR DA RITMICIDADE CIRCADIANA	17
1.3	CRONOTIPO E SOCIEDADE	19
1.4	O MONITORAMENTO DA RITMICIDADE CIRCADIANA E A ACTIGRAFIA	22
1.5	COMO OS GENES RELÓGIO COORDENAM O METABOLISMO?	23
2	HIPÓTESE	25
3	OBJETIVOS	25
3.1	OBJETIVO GERAL	25
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
4	MATERIAIS E MÉTODOS	26
4.1	PARTICIPANTES	26
4.1.1	Primeira etapa	26
4.1.2	Segunda etapa	27
4.2	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	32
5	RESULTADOS	33
5.1	PRIMEIRA ETAPA	33
5.1.1	Caracterização da amostra	33
5.1.2	Genotipagem	33
5.2	SEGUNDA ETAPA	35
5.2.1	Actigrafia	35
6	DISCUSSÃO	44
6.1	Comparação entre os perfis de sono	44
6.2	Rebote de sono e homeostase	49
6.3	Perfil circadiano	50
6.4	Perfil de sono, perfil circadiano e metabolismo	51
7	CONCLUSÃO	55
	REFERÊNCIAS	56
	Anexo 1. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	63
	Anexo 2. Questionário <i>on-line</i> : dados pessoais, antropometria e MCTQ	65
	Anexo 3. Protocolo laboratorial para purificação de DNA a partir da amostra de saliva	82
	Anexo 4. Protocolo laboratorial para a genotipagem do polimorfismo VNTR do gene <i>PER3</i>	86
	Anexo 5. Devolutiva referente ao período no qual o voluntário utilizou o actígrafo de punho	90

1 INTRODUÇÃO

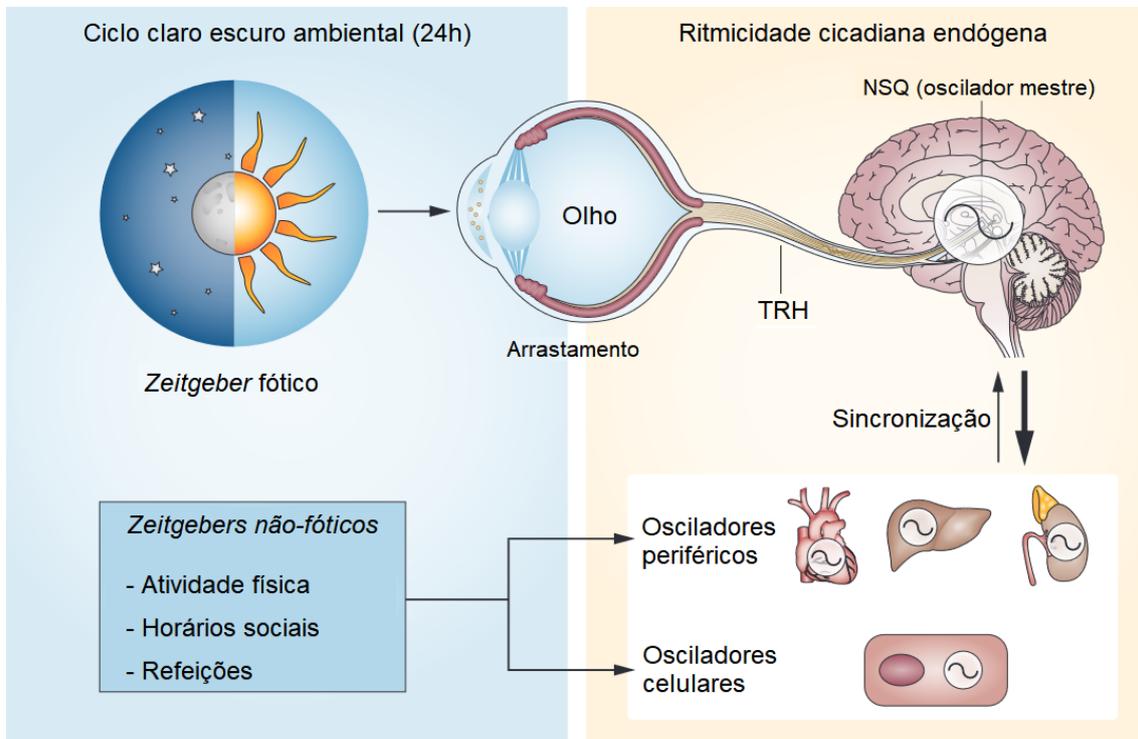
1.1 RITMOS BIOLÓGICOS E O CICLO CLARO/ESCURO AMBIENTAL

A Cronobiologia tem como objetivo investigar as características temporais da matéria viva, do nível molecular ao nível comportamental, sendo os ritmos biológicos o principal foco de estudo. Os ritmos biológicos podem ser definidos como variações periódicas de algum fenômeno vital, a partir de um sistema temporizador endógeno (ROTENBERG; MARQUES; MENNA-BARRETO, 2003, p. 32) e tais variações são geradas por oscilações autossustentadas, emergentes e persistentes. No entanto, o fato de um ritmo ser gerado endogenamente não significa que ele seja insensível às condições ambientais (MARQUES; GOLOMBEK; MORENO, 2003, p. 60). Devido às faixas com diferentes frequências de oscilação, os ritmos biológicos são genericamente classificados em infradianos, ultradianos e circadianos. Os primeiros são ritmos de baixa frequência, com períodos maiores de 28 horas (ex.: ciclo menstrual, que dura, aproximadamente, 28 dias). Os segundos são ritmos de frequência rápida, com períodos menores do que 24 horas (ex.: batimentos cardíacos). Por fim, os ritmos circadianos (do latim *circa diem*, ou “cerca de um dia”) têm um período aproximado de 24 horas e são associados ao ciclo geofísico que tem a mesma duração, isto é, o claro/escuro ambiental. De acordo com a espécie estudada, os ritmos circadianos podem variar de 20 a 28 horas (MARQUES; GOLOMBEK; MORENO, 2003, p. 58). Contudo, tais ritmos podem ser arrastados a fatores cíclicos ambientais chamados de *zeitgebers*, um neologismo alemão que significa “doadores de tempo” (ROENNEBERG; DRAGOVIC; MERROW, 2005; MARQUES; GOLOMBEK; MORENO, 2003, p. 60). O principal *zeitgeber* é

o fótico, ou seja, o ciclo claro/escuro ambiental, mas fatores não-fóticos, como atividades sociais, também podem auxiliar na sincronização (HASHIMOTO *et al.*, 2004).

A informação luminosa é transmitida ao cérebro através do trato retino-hipotalâmico (TRH). O TRH é uma via neural para a entrada fótica através de células fotossensíveis, que estão localizadas na retina. Na retina, há células denominadas como células ganglionares. Tais células possuem axônios que originam o nervo óptico e se projetam para estruturas intracerebrais, como os núcleos supraquiasmáticos (NSQ). Como os mamíferos não têm capacidade fotorreceptiva em seus tecidos periféricos, o sistema nervoso central fornece as dicas temporais (LIU; LEWIS; KAY, 2007) para o arrastamento ao ciclo claro/escuro ambiental (Figura 1).

Figura 1. Sincronização (arrastamento) de um ritmo endógeno a um ritmo exógeno.



Fonte: Adaptado de BUTTGEREIT *et al.*, 2015.

O caráter endógeno da ritmicidade biológica proporciona às espécies a possibilidade de uma capacidade antecipatória diante dos eventos ambientais, ou seja, as transições entre estados são preparadas progressivamente, seja pela liberação de hormônios ou pela mudança de comportamento (MARQUES; GOLOMBEK; MORENO, 2003, p. 60).

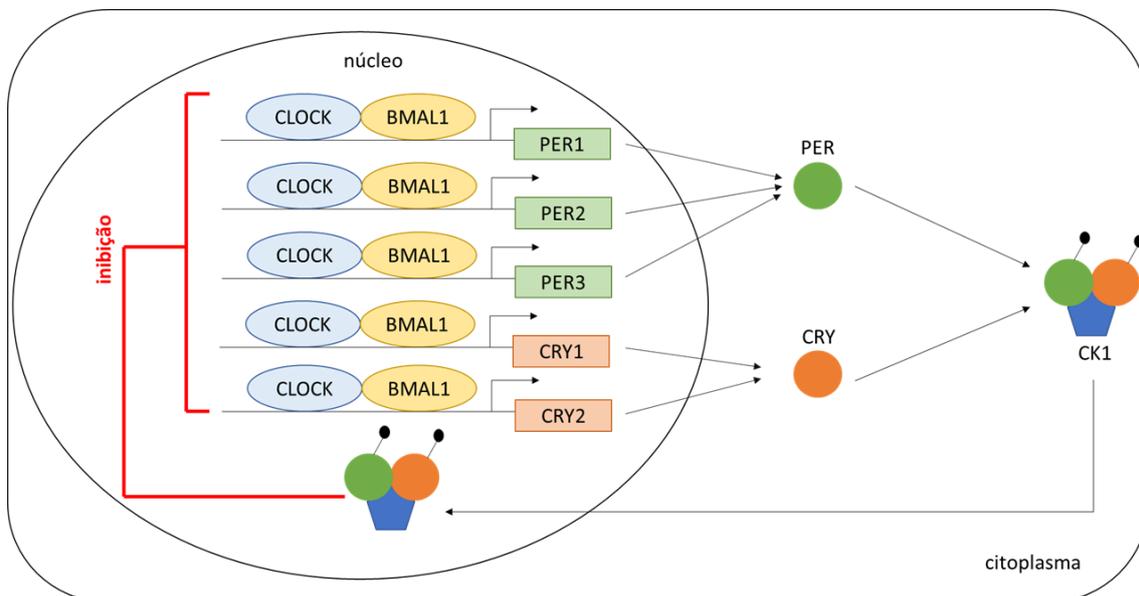
1.2 BIOLOGIA MOLECULAR DA RITMICIDADE CIRCADIANA

Desde a década de 1970 existem evidências sobre uma regulação genética dos mecanismos de ritmicidade circadiana (KONOPKA; BENZER, 1971). Sabe-se que a coordenação dos osciladores biológicos se dá, ao nível celular, pela expressão de um conjunto de genes chamados de “genes relógio” (*clock genes*). Os trabalhos iniciais com drosófilas e estudos subsequentes envolvendo mamíferos revelaram a participação dos genes relógio em uma alça de retroalimentação de transcrição gênica, resultando em uma ritmicidade metabólica celular, com período de aproximadamente 24 horas. Tal mecanismo molecular de temporização circadiana está presente em todas as células nucleadas do nosso organismo e responde ou se sincroniza com sinais nervosos e humorais; os participantes deste mecanismo são: os genes relógio *CLOCK*, *BMAL1*, *PER1*, *PER2*, *PER3*, *CRY1*, *CRY2* e as caseína-quinases (CK) ϵ/δ (PEDRAZZOLI; PEREIRA, 2004).

O mecanismo molecular da ritmicidade circadiana em mamíferos é gerado por uma alça de *feedback* autorregulatória composta por fatores ativadores e inibidores. Os genes *CLOCK* e *BMAL1* codificam os ativadores que formam um heterodímero (*CLOCK-BMAL1*), o qual se liga à região promotora dos genes *PERIOD (PER)* e *CRYPTOCHROME (CRY)*, induzindo a expressão de *PER1*,

PER2, *PER3*, *CRY1* e *CRY2*, que são genes codificadores de proteínas inibidoras. No citoplasma, as proteínas PER e CRY são traduzidas e fosforiladas pela caseína quinase 1 (CK1), facilitando a translocação para o núcleo celular, durante a noite, onde o heterodímero PER-CRY, para inibir sua própria transcrição, interage com CLOCK-BMAL1. Conforme o processo da inibição da alça de *feedback* progride, a concentração das proteínas PER e CRY diminui, uma vez que seu tempo de meia-vida é curto. Depois de algum tempo, CLOCK-BMAL1 está pronto para recomeçar um novo ciclo de transcrição gênica (TAKAHASHI, 2017) (Figura 2). Neste processo, as proteínas PER são acumuladas durante a noite e degradadas durante o dia, processo que oscila a cada 24 horas, em sincronia com o ciclo claro/escuro ambiental.

Figura 2. Alça de feedback autorregulatória da ritmicidade circadiana em mamíferos.

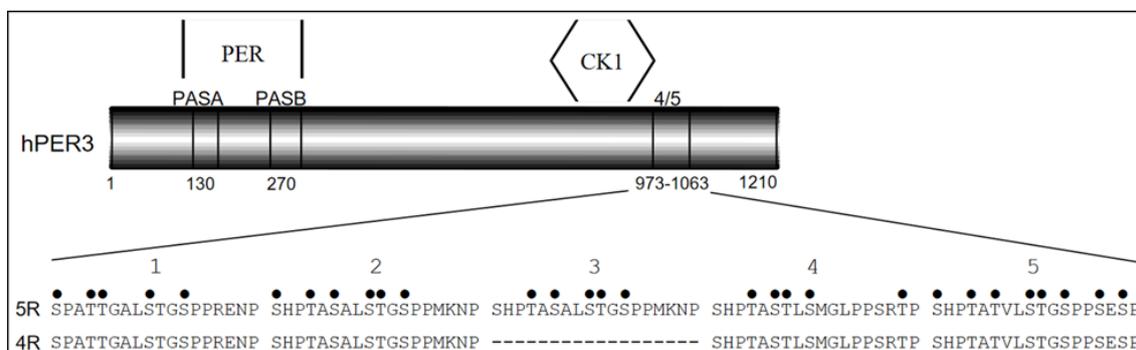


Fonte: Juliana Viana Mendes, 2022.

O gene *PER3*, que faz parte do sistema molecular de temporização circadiana, está envolvido na regulação de processos fisiológicos, como a adaptação ao ciclo claro/escuro ambiental, o ciclo sono/vigília e o ciclo de temperatura corporal. Em primatas (JENKINS; ARCHER; VON SCHANTZ, 2005;

SABINO *et al.*, 2014), este gene possui uma região de repetição polimórfica chamada VNTR, do inglês “Variable Number of Tandem Repeat”, localizada no braço curto do cromossomo 1, no éxon 18. No *Homo sapiens*, a região é composta por unidades de 54 pares de bases que se repetem quatro ou cinco vezes. O resultado é uma alteração no número de resíduos de aminoácidos da proteína, a depender dos alelos presentes no indivíduo (EBISAWA *et al.*, 2001; ARCHER *et al.*, 2003; PEREIRA *et al.*, 2005) (Figura 3). Foram observadas em uma população brasileira (PEREIRA *et al.*, 2005) e em uma população inglesa (ARCHER *et al.*, 2003) frequências semelhantes do polimorfismo VNTR – aproximadamente 65% têm o alelo de quatro repetições e cerca de 35% têm o alelo de cinco repetições. Levando em consideração a presença de tais alelos, há três genótipos possíveis: $PER3^{4/4}$, $PER3^{4/5}$ e $PER3^{5/5}$, sendo o genótipo $PER3^{5/5}$ menos frequente nas populações mencionadas.

Figura 3. Diagrama esquemático da proteína PER3 humana.



As sequências de aminoácidos da região de 5 e 4 repetições são mostradas expandidas na parte inferior da figura (5R e 4R, respectivamente). Fonte: adaptado de ARCHER *et al.*, 2003.

1.3 CRONOTIPO E SOCIEDADE

Estudos publicados na literatura especializada em Genética do Sono mostram associações do VNTR do gene *PER3* com os cronotipos, que são fenótipos dos ritmos circadianos e são caracterizados pela preferência em

exercer atividades em horas específicas do dia (PEREIRA; SABINO; UMEMURA, 2012). Em 1976, Horne e Östberg criaram o Questionário de Matutividade-Vespertinidade (HORNE; ÖSTBERG, 1976), o qual permite a categorização dos cronotipos baseando-se em uma pontuação alcançada pelo indivíduo ao preencher tal questionário; as possíveis classificações são: matutino extremo, matutino moderado, intermediário, vespertino moderado e vespertino extremo. Os matutinos são aqueles que preferem realizar suas atividades pela manhã, enquanto os vespertinos preferem realizar suas atividades durante a tarde ou a noite. A maior parte da população é considerada intermediária, isto é, escolhem horários intermediários entre os dois extremos para desenvolver suas atividades. Archer *et al.* (2003), bem como Pereira *et al.* (2005) mostraram que indivíduos que possuem o alelo de quatro repetições do gene *PER3* têm uma tendência maior a serem vespertinos do que indivíduos que possuem o alelo de cinco repetições.

Os estudos sobre os cronotipos trazem à tona o problema da adaptação dos indivíduos à organização temporal da sociedade e, por conseguinte, suas implicações para a saúde. A adaptação ou o ajuste temporal às condições socioambientais estão associados aos ritmos da expressão gênica (TAKAHASHI, 2017), da secreção hormonal (GAMBLE *et al.*, 2014; TSANG *et al.*, 2016), bem como à forma que um indivíduo aloca seus períodos de atividade e sono em um dia de 24 horas. Logo, em situações de conflito entre os horários sociais e os ritmos biológicos pode ocorrer uma ruptura temporal que resulta em malefícios à saúde, principalmente distúrbios psiquiátricos e metabólicos. Em termos de metabolismo, a ruptura circadiana pode resultar em resistência à insulina, obesidade e aumento do risco de diabetes tipo 2 (SCHEER *et al.*, 2009;

GARAULET; MADRID, 2010; SHI *et al.*, 2013; RAMOS-LOPEZ *et al.*, 2018; STENVERS *et al.*, 2019).

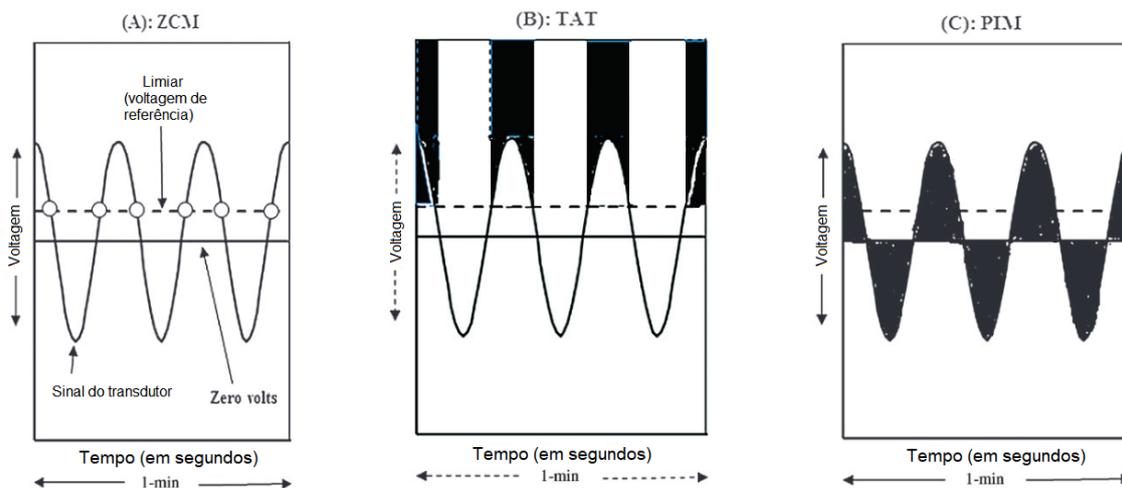
A homeostase dos ritmos circadianos está sob ação tanto da sinalização hormonal, que é importante para a integração do metabolismo, quanto da expressão gênica, proporcionada pelos genes relógio (ALBRECHT, 2002; TAKAHASHI, 2017). Em termos de organização temporal dos processos metabólicos, a melatonina é o mediador hormonal da integração entre o ciclo claro/escuro ambiental e a regulação fisiológica rítmica de um corpo (ARENDDT; BROADWAY, 1986). Como resultado dessa integração, um organismo sincronizado às demandas temporais ambientais aloca sua alimentação, por exemplo, em horários específicos ao longo das 24 horas (TAKAHASHI, 2017). Assim, distúrbios metabólicos observados em trabalhadores em turnos, por exemplo, podem estar relacionados à desorganização circadiana (RÜGER; SCHEER, 2009; SCHEER *et al.*, 2009).

No início de 2020, houve a emergência da pandemia do coronavírus (COVID-19), que representou uma crise aguda na saúde pública mundial, causando uma interrupção imediata de atividades de trabalho e estudantis (TASSO; SAHIN; ROMAN, 2020). Esse novo cenário global exigiu uma reorganização drástica nas sociedades pós-industriais contemporâneas, as quais são altamente dependentes de mídias digitais e de iluminação artificial; a maior parte das pessoas passou a trabalhar e estudar remotamente, em seus lares, a partir de um sistema conhecido como *home office*. Tal sistema culminou em uma baixa exposição à luz solar e uma alteração das rotinas sociais, fatores que podem afetar a regulação da temporalidade circadiana (LEONE; SIGMAN; GOLOMBEK, 2020).

1.4 O MONITORAMENTO DA RITMICIDADE CIRCADIANA E A ACTIGRAFIA

Em humanos, a mensuração de variáveis circadianas permite identificar e compreender o acontecimento de eventos em uma periodicidade de 24 horas. Um exemplo de variação circadiana é o ritmo atividade/repouso, que pode ser monitorado através da actigrafia de punho (HERMAN, 2017, p.1664). O actígrafo é um dispositivo não invasivo munido de um acelerômetro, o qual detecta o movimento do punho do usuário. O sinal elétrico gerado pela movimentação é digitalizado e processado em três formas diferentes: *Zero Crossing Mode* (ZCM), *Time Above Threshold* (TAT) and *Proportional Integration Mode* (PIM) (FEKEDULEGN *et al.*, 2020). O ZCM foca na frequência do movimento, dado que o número de vezes por época (60 segundos) que o sinal atinge voltagem igual a zero é contabilizado (Figura 4A). O método TAT conta por quanto tempo, por época (60 segundos), o nível do sinal produzido está acima de um dado limiar (*threshold*) de voltagem; neste caso, a duração do movimento é fornecida (Figura 4B). Por fim, o método PIM, também conhecido como *digital integration*, calcula, para cada época de 60 segundos, a área sob a curva do sinal captado; este método obtém a intensidade/o vigor do movimento (Figura 4C).

Figura 4. Representação dos três modos em que os dados de atividade são digitalizados e armazenados no actígrafo de punho.



(A) ZCM: Zero Crossing Mode; (B) TAT: Time Above Threshold; (C) PIM: Proportional Integration Mode. Fonte: adaptado de FEKEDULEGN *et al.*, 2020.

Após o processamento do sinal digitalizado em uma das três formas mencionadas no parágrafo acima, algoritmos são capazes de inferir, a partir do ritmo atividade/repouso, a vigília e o sono (COLE *et al.*, 1992; SADEH; SHARKEY; CARSKADON, 1994; JEAN-LOUIS *et al.*, 2001).

Em comparação com a polissonografia, o “padrão ouro” para avaliar o ciclo sono/vigília (STONE; ANCOLI-ISRAEL, 2017, p.1671), a actigrafia é uma técnica menos invasiva e mais barata, que pode gerar registros de atividade por 24 horas de atividade durante vários dias. Conseqüentemente, o monitoramento do ciclo sono/vigília ao longo de semanas pode ser inferido.

1.5 COMO OS GENES RELÓGIO COORDENAM O METABOLISMO?

Os ritmos circadianos controlam uma ampla variedade de eventos fisiológicos, incluindo o metabolismo (ECKEL-MAHAN; SASSONE-CORSI, 2013). A regulação metabólica ocorre de maneira extremamente rigorosa, pois o desequilíbrio no sistema energético leva ao acúmulo de metabólitos, os quais podem contribuir para o desenvolvimento de doenças (FENG; LAZAR, 2012).

A nível molecular, muitos genes que codificam enzimas importantes para o metabolismo são regulados direta ou indiretamente pelos genes relógio (ALBRECHT, 2017). Já é bem estabelecida a relação entre genes relógio e a homeostase do metabolismo da glicose e de lipídeos, visto que as variações hormonais, enzimáticas e de outros fatores regulatórios apresentam ritmicidade circadiana (ZANQUETTA *et al.*, 2010).

Em um estudo realizado em humanos, Gómez-Abellán *et al.* (2008) demonstraram que a expressão de genes relógio (*BMAL1*, *CRY1* e *PER2*) no tecido adiposo está relacionada a parâmetros da síndrome metabólica. Além disso, Dallmann e Weaver (2010) relataram que camundongos machos com deficiência tripla nos genes *Per* (*Per1*, *Per2* e *Per3*), assim como animais com deficiência única do gene *Per3*, ganharam mais massa corporal que os camundongos selvagens, após um protocolo de dieta rica em gordura. Neste último caso, sugeriu-se um papel anteriormente não reconhecido para *Per3* na regulação da massa corporal (DALLMANN; WEAVER, 2010).

Em função do exposto acima, é pertinente hipotetizar que o gene relógio *PER3* module não só o sono e o metabolismo como a integração entre esses processos biológicos. O presente estudo explora esta hipótese por meio de protocolo genético-comportamental, em vida real, usando principalmente como ferramenta de medida de sono a actigrafia.

2 HIPÓTESE

Dadas as relações entre sono, ritmos circadianos e metabolismo e a conhecida regulação genética destes fenômenos fisiológicos, a nossa hipótese é de que o polimorfismo VNTR no gene relógio *PER3* estaria associado à regulação do sono, dos ritmos circadianos e às relações entre sono, e os ritmos circadianos com o metabolismo.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar as possíveis relações entre o perfil de sono, o perfil do ritmo atividade/repouso, o metabolismo e o polimorfismo VNTR do gene *PER3*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar os perfis de sono entre os alunos com genótipo *PER3*^{4/4} e os alunos com o genótipo *PER3*^{5/5}.
- Analisar o ciclo de atividade/repouso, através da actigrafia, em indivíduos que apresentam o genótipo *PER3*^{4/4} ou *PER3*^{5/5}.
- Investigar possíveis associações entre os fenótipos analisados, genótipos e o Índice de Massa Corporal.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 PARTICIPANTES

O estudo, dividido em duas etapas, englobou 513 estudantes universitários matriculados na Escola de Artes, Ciências e Humanidades da Universidade de São Paulo, que aceitaram a participação via Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO 1). O projeto em questão foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da Universidade de São Paulo, sob o número #311.236.

4.1.1 Primeira etapa

Na primeira etapa do experimento, realizada no ano de 2019 (pré-pandemia do COVID-19), os voluntários forneceram amostras de saliva através do kit Oragene•DNA (OG-500) e preencheram um questionário *on-line*. Através do questionário, dados sobre antropometria e hábitos de sono (*Munich Chronotype Questionnaire*, ou MCTQ) puderam ser coletados (ANEXO 2).

Os critérios de inclusão para a participação neste trabalho foram ter entre 18 e 30 anos de idade e ser estudante da Escola de Artes, Ciências e Humanidades da Universidade de São Paulo. Os alunos que trabalharam em turno nos últimos três anos ou os que se alimentaram e/ou fumaram 30 minutos antes da coleta de saliva foram excluídos da amostra.

4.1.1.1 Avaliação genética

A extração do DNA genômico dos participantes foi realizada a partir de 0,5 mL de saliva, de acordo com o protocolo do fabricante do kit Oragene•DNA (OG-500) (DNA GENOTEK) (ANEXO 3). Para a amplificação da sequência nucleotídica de

interesse, o par de *primers* (iniciadores) utilizado na reação em cadeia da polimerase (PCR) possuía a mesma sequência que foi utilizada por EBISAWA *et al.* (2001). Os demais detalhes referentes ao protocolo de genotipagem podem ser verificados no (ANEXO 4).

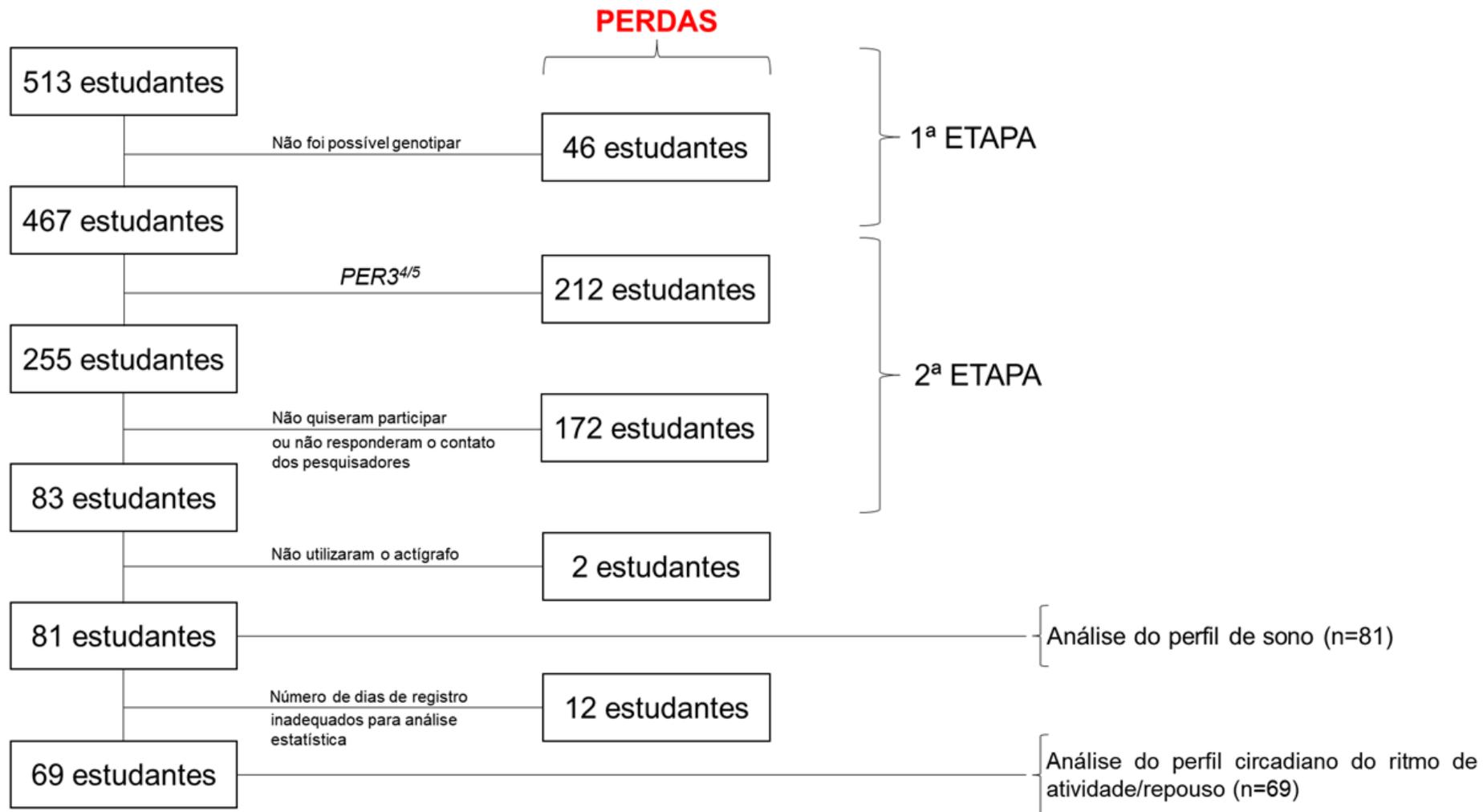
4.1.1.2 Variáveis antropométricas

A fim de identificar a distribuição do estado nutricional dos participantes do estudo, dados de peso (kg) e altura (m) foram coletados, para que o Índice de Massa Corporal (IMC) (kg/m^2) fosse calculado. Estes dados foram coletados em dois momentos da pesquisa: na primeira etapa (item 4.1.1) e na segunda etapa, que será descrita a seguir. O ΔIMC foi calculado como a diferença do IMC durante a segunda etapa menos o IMC durante a primeira etapa do estudo.

4.1.2 Segunda etapa

A segunda etapa do experimento ocorreu entre abril e junho de 2021, durante a quarentena imposta pela pandemia do COVID-19. Todos os participantes estavam no estado de São Paulo/Brasil, assistindo aula remotamente. A partir da genotipagem realizada na primeira etapa (item 5.1.2), apenas os indivíduos homozigotos para o polimorfismo VNTR do gene *PER3* foram selecionados para participar da segunda etapa do experimento. Da amostra inicial, 255 indivíduos do genótipo homozigoto *PER3*^{4/4} ou *PER3*^{5/5} foram contatados, e 83 aceitaram participar para ter seu ritmo atividade/repouso monitorado por actigrafia. A subamostra final foi constituída por 81 voluntários, pois dois estudantes foram excluídos pelo uso inadequado do actígrafo (Figura 5).

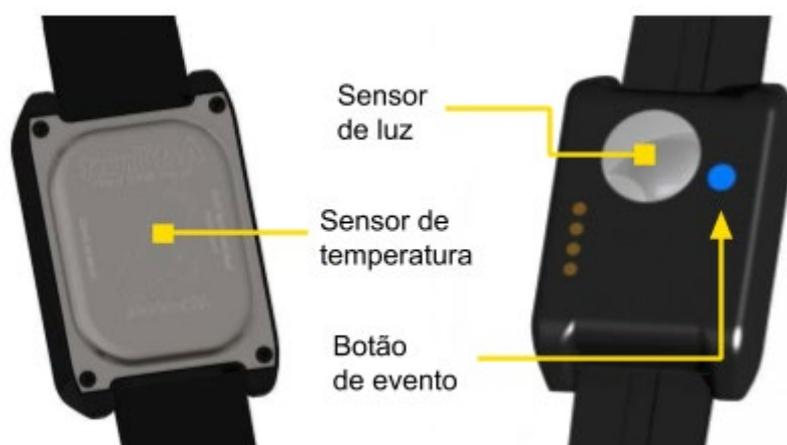
Figura 5. Desenho do estudo.



4.1.2.1 Actigrafia

A coleta de dados actigráficos ocorreu por pelo menos 14 dias, através do actígrafo de pulso (ActTrust AT0503, Condor Instruments, São Paulo, SP, Brasil) (Figura 6). Tal equipamento é constituído por um acelerômetro, o qual armazena os dados de atividade no modo PIM; um sensor de temperatura periférica do pulso; um sensor de luz; bateria para armazenamento dos dados brutos e um botão de eventos, que serve para o voluntário sinalizar algum momento importante.

Figura 6. Actígrafo de pulso ActTrust, fabricado pela Condor Instruments.



Fonte: adaptado de Condor Instruments.

Durante a coleta de dados, os participantes foram instruídos a apertar o botão de eventos toda vez que retirassem e/ou recolocassem o actígrafo, bem como antes de dormir e ao acordar. No que diz respeito à análise das variáveis dos perfis de sono, primeiramente foi realizada a inspeção visual dos dados. Em seguida, os dados foram analisados pelo *software* de actigrafia, ActStudio (ActTrust - MANUAL DO USUÁRIO, 2019), que fornece estimativas da duração do sono, hora de dormir e hora de acordar com base no algoritmo originalmente

proposto por Cole-Kripke (COLE *et al.*, 1992) e modificado por Condor Instruments.

As variáveis não-paramétricas de atividade motora também foram extraídas do *software* ActStudio e podem ser identificadas no Quadro I.

Quadro I. Variáveis não-paramétricas de atividade motora utilizadas na pesquisa.

Variável	Definição
M10: média de atividade das 10 horas consecutivas de maior atividade motora em um dia de 24 horas (contagem/min)	Corresponde à média diária das 10 horas consecutivas de maior atividade motora de todos os dias de registro (MORGENTHALER <i>et al.</i> , 2007; GONÇALVES <i>et al.</i> , 2014; GONÇALVES <i>et al.</i> , 2015).
L5: média de atividade das 5 horas consecutivas de menor atividade motora em um dia de 24 horas (contagem/min)	Corresponde à média diária das 5 horas consecutivas de menor atividade motora de todos os dias de registro (MORGENTHALER <i>et al.</i> , 2007; GONÇALVES <i>et al.</i> , 2014; GONÇALVES <i>et al.</i> , 2015).
RA: amplitude normalizada do ritmo da atividade motora	$RA = (M10-L5)/(M10+L5)$. Corresponde à amplitude normalizada da variação entre as 10 horas consecutivas de maior atividade motora e as 5 horas consecutivas de menor atividade motora. Os valores de RA variam de 0 a 1, e valores altos indicam maior atividade durante o dia em relação à noite (GONÇALVES <i>et al.</i> , 2015).
F10: fase de início do M10 (hh:mm)	Corresponde ao horário de início das 10 horas consecutivas de maior atividade motora em um dia de 24 horas.
F5: fase de início do L5 (hh:mm)	Corresponde ao horário de início das 5 horas consecutivas de menor atividade motora em um dia de 24 horas.
IS: estabilidade interdiária	Corresponde ao grau de sincronização entre o ritmo atividade/repouso e o ciclo claro/escuro ambiental (WITTING <i>et al.</i> , 1990). Índice que varia de 0 a 1; valores altos de IS indicam um ritmo de atividade/repouso mais estável (VAN SOMEREN <i>et al.</i> , 1996).
IV: variabilidade intradiária	Corresponde ao grau de fragmentação do ritmo atividade/repouso (WITTING <i>et al.</i> , 1990). Índice que varia de 0 a 2; valores altos de IV indicam um ritmo atividade/repouso mais fragmentado (VAN SOMEREN <i>et al.</i> , 1996).

Fonte: adaptado de Benedito-Silva *et al.*, 2020.

4.1.2.1.1 Cálculos para identificação do cronotipo (ROENNEBERG; WIRZ- JUSTICE; MERROW, 2003)

O cronotipo baseia-se na meia-fase do sono, que é o ponto médio entre o horário de dormir e o de acordar, tanto nos dias de trabalho (MSW), quanto nos dias livres (MSF). Contudo, devido ao débito de sono acumulado durante os dias de trabalho, a meia-fase de sono nos dias livres é corrigida (MSFsc) considerando a compensação ocorrida nos dias de descanso (ROENNEBERG *et al.*, 2015).

Os cálculos (THE WORLDWIDE EXPERIMENTATION PLATFORM, 2015a) realizados para a identificação da MSW, MSF, da duração de sono média semanal (SDweek), MSFsc e do *jet lag* social (JLS) foram os seguintes:

- a. $MSW = \text{início de sono nos dias de trabalho} + ((\text{duração de sono nos dias de trabalho})/2);$
- b. $MSF = \text{início de sono nos dias livres} + ((\text{duração de sono nos dias livres})/2);$
- c. $SDweek = (\text{duração de sono nos dias de trabalho} \times n^{\circ} \text{ dias de trabalho} + \text{duração de sono nos dias livres} \times n^{\circ} \text{ dias livres})/7;$
- d. $MSFsc = MSF - ((\text{duração de sono nos dias livres} - SDweek)/2)$. O cálculo é válido apenas se o indivíduo não utilizar alarme nos dias livres;
- e. $JLS \text{ absoluto} = |MSF - MSW|.$

Neste trabalho, os dias de trabalho foram considerados como dias de estudo, isto é, de segunda à sexta-feira, e os dias livres como finais de semana.

4.1.2.1.2 Devolutivas

Todos os voluntários que utilizaram o actígrafo receberam um relatório (ANEXO 5) com os valores médios do seu perfil de sono respectivo aos dias em que utilizaram o equipamento.

4.2 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados das análises estatísticas foram expressos em termos de frequências absolutas e relativas para variáveis qualitativas e em termos de médias e desvios-padrão no caso de variáveis quantitativas.

A aderência da distribuição dos dados a uma curva de Gauss foi investigada através do teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov.

Para a verificação se as frequências genótípicas estavam de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg (HARDY, 1908), o teste do qui-quadrado (χ^2) de Pearson foi aplicado.

Para comparar perfis de sono e perfis circadianos entre genótipos (*PER3^{4/4}*; *PER3^{5/5}*) foi aplicado o teste *t* de Student e para comparar perfis de sono entre genótipos (*PER3^{4/4}*; *PER3^{5/5}*) e entre dias de estudo vs. dias livres foi aplicada a ANOVA de 2 vias com medidas repetidas, seguida do teste de comparações múltiplas de Tukey, quando necessário. O coeficiente de correlação de Pearson foi utilizado para avaliar possíveis associações entre IMC e variáveis de sono e variáveis circadianas.

Em todas as análises foi utilizado o nível de significância de $\alpha = 0,05$.

As análises estatísticas foram realizadas através do software Statistica 13.5™ (StatSoft, Inc.®, Tulsa, Oklahoma, USA, 2018).

5 RESULTADOS

5.1 PRIMEIRA ETAPA

5.1.1 Caracterização da amostra

A amostra estudada (n=513) é constituída por estudantes universitários residentes na cidade de São Paulo, sendo 275 do sexo feminino (53,61%) e 238 do sexo masculino (46,39%). A idade média da amostra é de $21,8 \pm 2,6$ anos.

Tabela 1. Caracterização da amostra.

	Média (DP)
Idade (anos) (n=500)	21,84 (2,64)
	N (%)
Sexo	
Masculino	238 (46,39%)
Feminino	275 (53,61%)

5.1.2 Genotipagem

Todos os indivíduos da amostra (n=513) foram genotipados para o polimorfismo VNTR do gene *PER3*. O êxito das reações de genotipagem laboratoriais, isto é, indivíduos com o genótipo identificado, foi de 91,03% (n=467). A partir disso, os cálculos de frequência alélicas e genotípicas foram realizados (Tabela 2). Foi possível verificar que a população está em equilíbrio segundo o critério de equilíbrio de Hardy-Weinberg (HARDY, 1908) ($\chi^2=0,020$; $gl=2$; $p=0,990$), pode-se concluir que as frequências alélicas e genotípicas para o polimorfismo VNTR do gene *PER3* se apresentam constantes ao longo de gerações e, portanto, não apresentam variações.

Tabela 2. Frequências alélicas e genóticas para o polimorfismo VNTR do gene *PER3*.

Amostra (n=467)	
Alelos	
4 repetições	604 (64,67%)
5 repetições	330 (35,33%)
Genótipos	
<i>PER3</i> ^{4/4}	196 (41,97%)
<i>PER3</i> ^{4/5}	212 (45,40%)
<i>PER3</i> ^{5/5}	59 (12,63%)

A figura abaixo (Figura 7) é um exemplo de fotodocumentação do gel de agarose após a corrida eletroforética. O texto em amarelo foi inserido pelos pesquisadores, a fim de facilitar a interpretação dos resultados. A numeração acima das bandas do gel refere-se à identificação de cada indivíduo. Na parte superior da figura (Figura 7), indicados pelas setas, exemplos dos três genótipos, *PER3*^{4/4}, *PER3*^{4/5} e *PER3*^{5/5}, foram destacados.

Figura 7. Genotipagem para o polimorfismo VNTR do gene *PER3*.

5.2 SEGUNDA ETAPA

5.2.1 Actigrafia

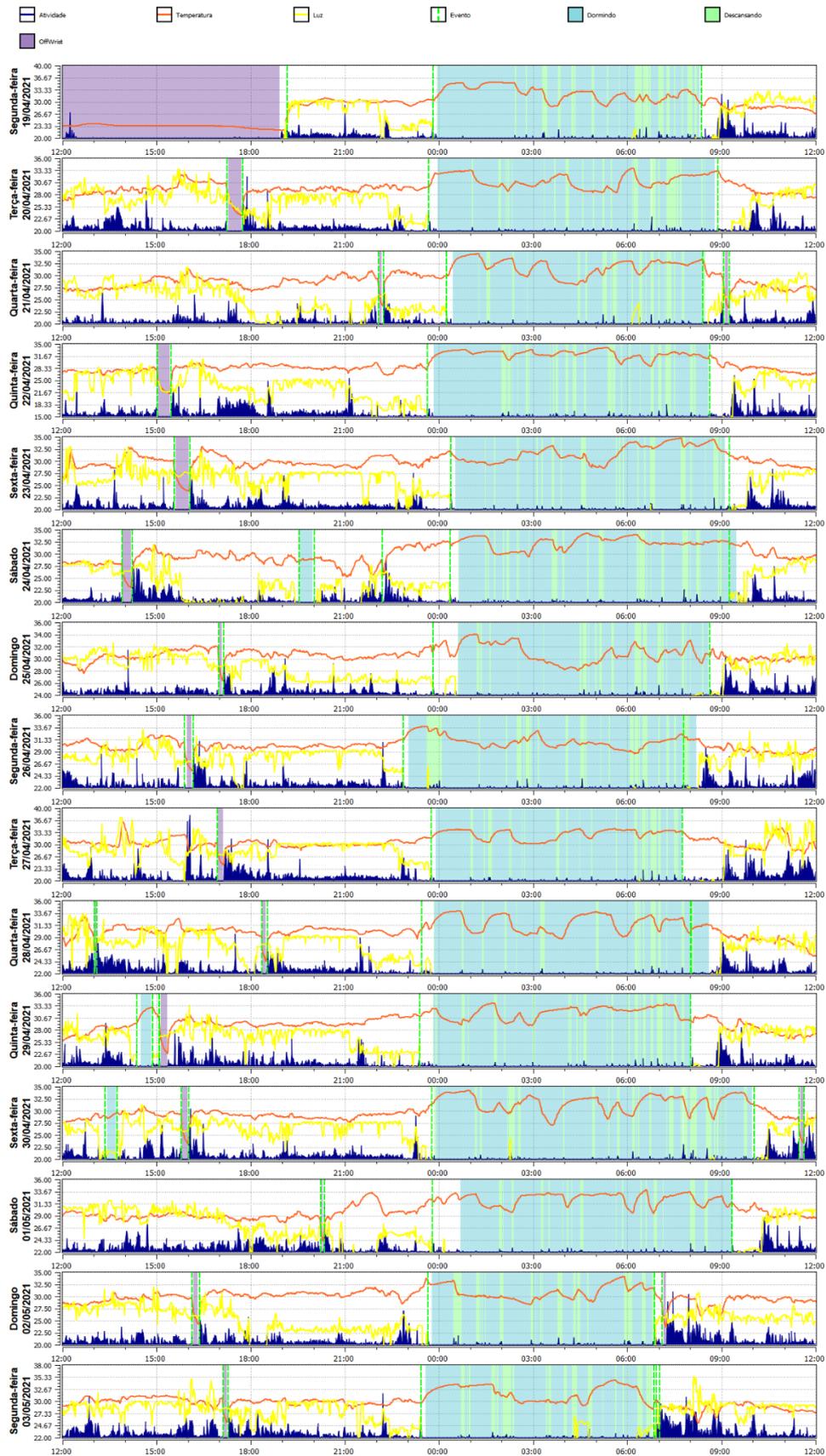
5.2.1.1 Perfil de sono

Foi formada uma subamostra de 81 estudantes com genótipos homozigotos, constituída por 44 mulheres (54,32%) e 37 homens (45,68%). Havia 33 (40,74%) portadores do genótipo *PER3^{5/5}* e 48 (59,26%) do genótipo *PER3^{4/4}*.

Os estudantes utilizaram o actígrafo por, em média, 15 dias consecutivos.

A Figura 8 refere-se a um exemplo da face gráfica do registro de actigrafia.

Figura 8. Exemplo de um registro actigráfico durante 14 dias consecutivos.



Cada retângulo se refere a um período de 24h, começando às 12h de um dia e terminando às 12h do dia seguinte; as barras verticais em azul escuro se referem à atividade diária, ou seja, quando o indivíduo estava acordado; a linha amarela demonstra o quanto o indivíduo se expôs à luz ambiente, seja iluminação solar ou elétrica; a linha vermelha se refere à temperatura periférica, mensurada a partir do punho; o intervalo azul claro se refere ao período em que o indivíduo estava dormindo; os pequenos intervalos em verde claro se referem aos curtos despertares que o voluntário teve ao longo de um episódio de sono; o intervalo roxo se refere ao período em que o voluntário não estava utilizando o actígrafo; a linha vertical verde e tracejada indica quando o voluntário apertou o botão de eventos. Fonte: *software* ActStudio.

Os indivíduos *PER3^{5/5}*, em média, dormiram e acordaram mais tarde, tanto nos dias de estudo quanto nos finais de semana, comparados com os indivíduos *PER3^{4/4}* (comparação entre genótipos: horários de dormir e acordar, $p=0,014$ e $p=0,006$ respectivamente). Além disso, foi possível verificar que, em ambos os grupos, os indivíduos dormiram e acordaram mais tarde no fim de semana quando comparados com os dias de estudo (comparação entre momentos da coleta: horários de dormir e acordar, ($p<0,001$) e ($p<0,001$), respectivamente). Estes valores refletiram-se nos horários da meia-fase do sono dos dias de estudo (MSW) e dos dias livres (MSF). Quanto à duração do sono, só foi possível detectar diferenças entre dias de estudo e final de semana ($p<0,001$). Não foi observada, em nenhuma das variáveis analisadas, interação estatisticamente significativa entre os genótipos e momento da coleta (Tabela 3) (Figuras 9 e 10).

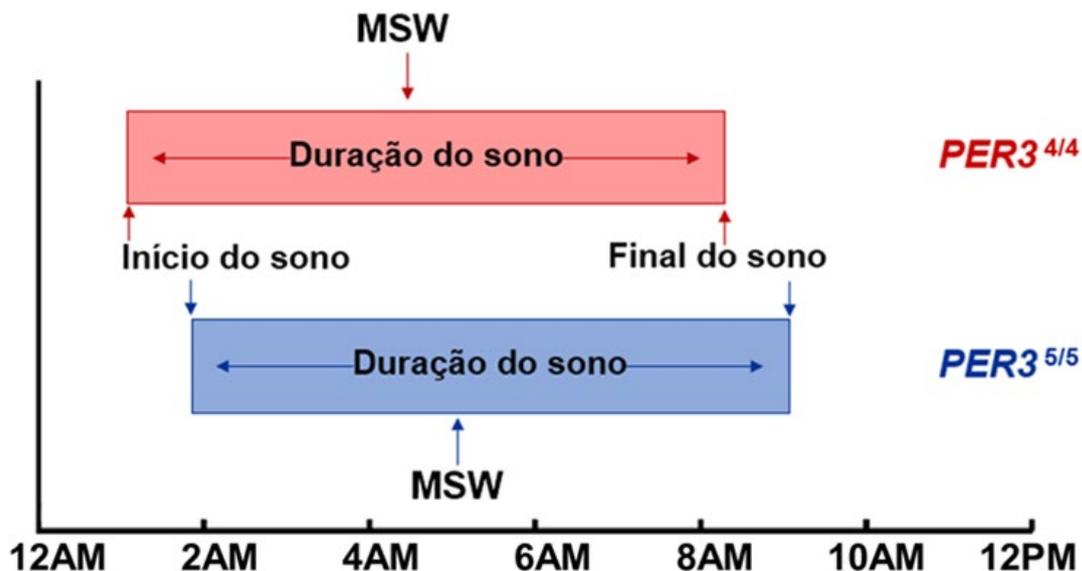
A Tabela 3 mostra os dados de sono obtidos a partir da actigrafia, separados por genótipo (*PER3^{4/4}* e *PER3^{5/5}*) e momento da coleta (dias de estudo e dias livres), e as comparações obtidas pela ANOVA de 2 vias de medidas repetidas.

Tabela 3. Sono noturno e sonecas no momento da coleta, dias de estudo ou dias livres, dentre genótipos *PER3*^{4/4} e *PER3*^{5/5}.

Variável	<i>PER3</i> ^{4/4}		<i>PER3</i> ^{5/5}		ANOVA de 2 vias		
	Dias de estudo	Dias livres	Dias de estudo	Dias livres	Genótipo	Momento da coleta (Dias de estudo x Dias livres)	Interação: Genótipo x (dias de estudo x dias livres)
	Média (DP)	Média (DP)	Média (DP)	Média (DP)			
Horário de dormir (hh:mm)	1:08 (1:26)	1:43 (1:31)	1:57 (1:26)	2:35 (1:48)	<i>0,014</i>	<i><0,001</i>	0,782
Horário de acordar (hh:mm)	8:16 (1:21)	9:54 (1:19)	9:12 (1:27)	10:34 (1:35)	<i>0,006</i>	<i><0,001</i>	0,387
Duração do episódio de sono principal (hh:mm)	6:27 (0:52)	7:20 (1:07)	6:35 (0:45)	7:14 (0:57)	0,927	<i><0,001</i>	0,333
Meia-fase do sono (hh:mm)	4:22 (1:24)	5:23 (1:22)	5:15 (1:27)	6:12 (1:40)	<i>0,009</i>	<i><0,001</i>	0,773
Duração das sonecas (hh:mm)	0:48 (0:28)	0:54 (0:33)	0:50 (0:38)	0:56 (0:38)	0,397	0,775	0,404

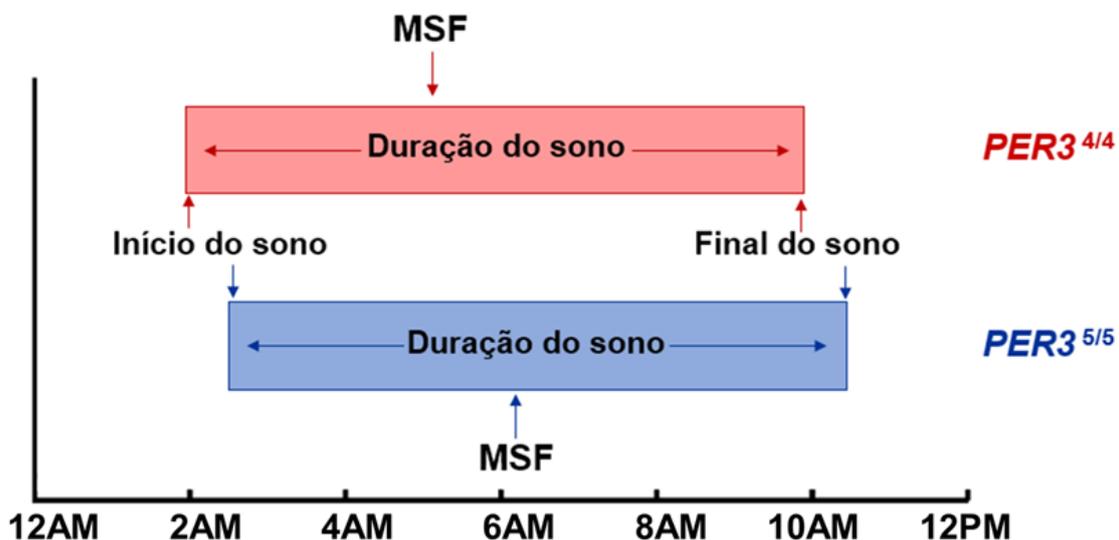
DP: desvio padrão. Os valores com significância estatística ($p < 0,05$) foram destacados em **negrito** e *itálico*.

Figura 9. Comparação do perfil de sono entre os indivíduos portadores dos genótipos $PER3^{4/4}$ e $PER3^{5/5}$ durante os dias de estudo.



MSW: meia-fase do sono nos dias de estudo.

Figura 10. Comparação do perfil de sono entre os indivíduos portadores dos genótipos $PER3^{4/4}$ e $PER3^{5/5}$ durante o final de semana.



MSF: meia-fase do sono no final de semana.

A Tabela 4 mostra que a meia fase de sono dos dias livres corrigida pelo débito de sono acumulado durante a semana (MSFsc) ocorre mais tarde nos

indivíduos do $PER3^{5/5}$ ($p=0,024$) e que o rebote de sono é maior no grupo $PER3^{4/4}$ ($p=0,002$).

Tabela 4. Dados de sono separados por genótipos.

Variável	$PER3^{4/4}$	$PER3^{5/5}$	p-valor
	Média (DP)	Média (DP)	
Duração de sono média semanal (<i>SD week</i>) (hh:mm)	6:42 (0:46)	6:46 (0:44)	0,694
MSFsc (hh:mm)	4:53 (1:26)	5:42 (1:17)	0,024
Rebote de sono (final de semana) (hh:mm)	1:31 (0:51)	0:53 (0:33)	0,002
<i>Jetlag</i> social (hh:mm)	1:11 (0:49)	1:08 (0:52)	0,783

DP: desvio-padrão. Os valores com significância estatística ($p < 0,05$) foram destacados em **negrito** e *itálico*.

5.2.1.2 Perfil circadiano de atividade motora

Os portadores do genótipo $PER3^{5/5}$ se movimentaram mais durante o dia (M10) ($p=0,005$), além de terem o início da atividade motora noturna (F5) mais tardio ($p=0,004$), quando comparado ao grupo $PER3^{4/4}$ (Tabela 5). Observou-se também que os indivíduos $PER3^{5/5}$ apresentaram um ritmo de atividade/repouso mais instável (IS) ($p=0,032$) e mais fragmentado (IV) quando comparados aos $PER3^{4/4}$ ($p=0,035$) (Tabela 5). Na Tabela 5, apresentam-se as variáveis não-paramétricas do ritmo atividade/repouso de 69 voluntários (39 do grupo $PER3^{4/4}$). A redução do número de voluntários se deve ao fato de 12 deles não apresentarem séries temporais compatíveis para a análise do perfil circadiano de atividade motora.

Tabela 5. Caracterização das variáveis circadianas de atividade e repouso nos genótipos *PER3*^{4/4} e *PER3*^{5/5} para o polimorfismo VNTR do gene *PER3*.

Variável	<i>PER3</i> ^{4/4}	<i>PER3</i> ^{5/5}	p-valor
	Média (DP)	Média (DP)	
Atividade motora diurna, M10 (contagem/min)	3764,72 (1036,99)	3108,49 (771,47)	0,005
Atividade motora noturna, L5 (contagem/min)	181,04 (94,09)	191,68 (102,23)	0,655
Amplitude relativa da atividade motora, RA	0,90 (0,04)	0,89 (0,04)	0,082
Início da atividade motora diurna, F10 (hh:mm)	9:42 (1:14)	9:55 (1:18)	0,498
Início da atividade motora noturna, F5 (hh:mm)	2:18 (1:17)	3:33 (2:08)	0,004
Estabilidade Interdiária, IS	0,33 (0,08)	0,28 (0,08)	0,032
Variabilidade Intradiária, IV	0,76 (0,12)	0,82 (0,12)	0,035

DP: desvio-padrão. Os valores com significância estatística ($p < 0,05$) foram destacados em **negrito** e *italico*.

5.2.1.3 Associação entre metabolismo, perfil de sono e perfil de atividade motora

A variação do IMC ao longo do tempo (Δ IMC) não foi diferente entre os grupos *PER3*^{4/4} e *PER3*^{5/5} ($0,73 \pm 1,68$); $0,67 \pm 2,05$); $p=0,899$).

As associações entre Δ IMC, variáveis de sono e variáveis circadianas (IS e IV) foram analisadas através do coeficiente de correlação de Pearson para todos os indivíduos e para cada grupo (*PER3*^{4/4} e *PER3*^{5/5}), separadamente (Tabela 6). Foi observada uma correlação positiva entre IV e Δ IMC no grupo

$PER3^{4/4}$ ($r=0,375$; $p=0,022$), sugerindo que quanto maior o ΔIMC , maior a fragmentação do ritmo atividade/repouso (Figura 11). Considerando-se todos os indivíduos ($PER3^{4/4}$ e $PER3^{5/5}$), foi observada uma correlação negativa e estatisticamente significativa entre IS e ΔIMC ($r=-0,279$; $p=0,027$), sugerindo que para todos os sujeitos, quanto menor a variação do ΔIMC , maior o índice IS, ou seja, quanto mais sincronizados ao ciclo claro/escuro ambiental, menor o ΔIMC dos indivíduos ao longo do tempo (Figura 12). Nenhuma associação estatisticamente significativa foi encontrada entre o ΔIMC e as variáveis de sono (Tabela 6).

Tabela 6. Correlação de Pearson entre ΔIMC , variáveis de sono e variáveis circadianas.

Variável	Todos os indivíduos		$PER3^{4/4}$		$PER3^{5/5}$	
	r (correlação com ΔIMC)	p-valor	r (correlação com ΔIMC)	p-valor	r (correlação com ΔIMC)	p-valor
Duração de sono	0,111	p=0,358	0,260	p=0,092	-0,073	p=0,714
MSFsc	0,074	p=0,582	0,073	p=0,671	0,082	p=0,725
Jetlag social absoluto	-0,136	p=0,258	-0,0003	p=0,999	-0,309	p=0,109
Variabilidade intradiária (IV)	0,128	p=0,317	0,375	<i>p=0,022</i>	-0,128	p=0,533
Estabilidade interdiária (IS)	-0,279	<i>p=0,027</i>	-0,319	p=0,054	-0,308	p=0,126

Os valores com significância estatística ($p<0,05$) foram destacados em **negrito** e *italico*.

Figura 11. Diagrama de dispersão Δ IMC vs. Variabilidade intradiária (grupo PER3^{4/4}).

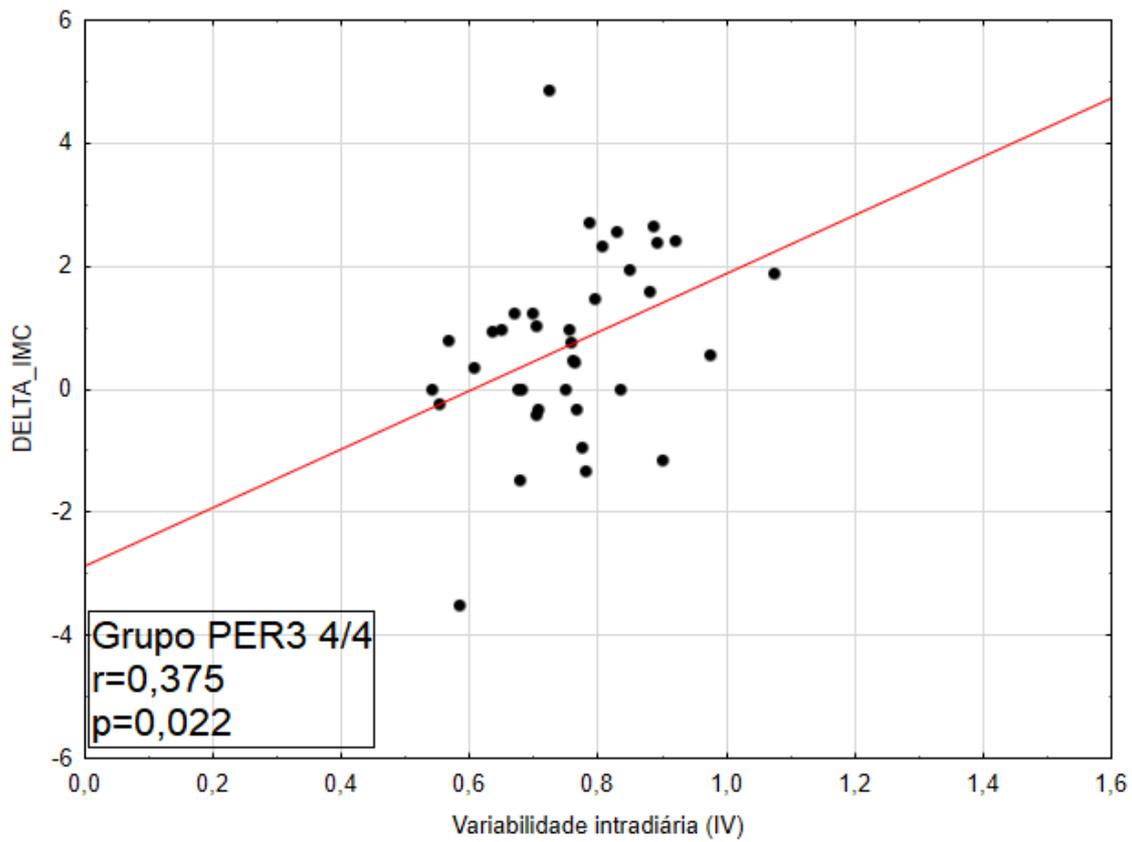
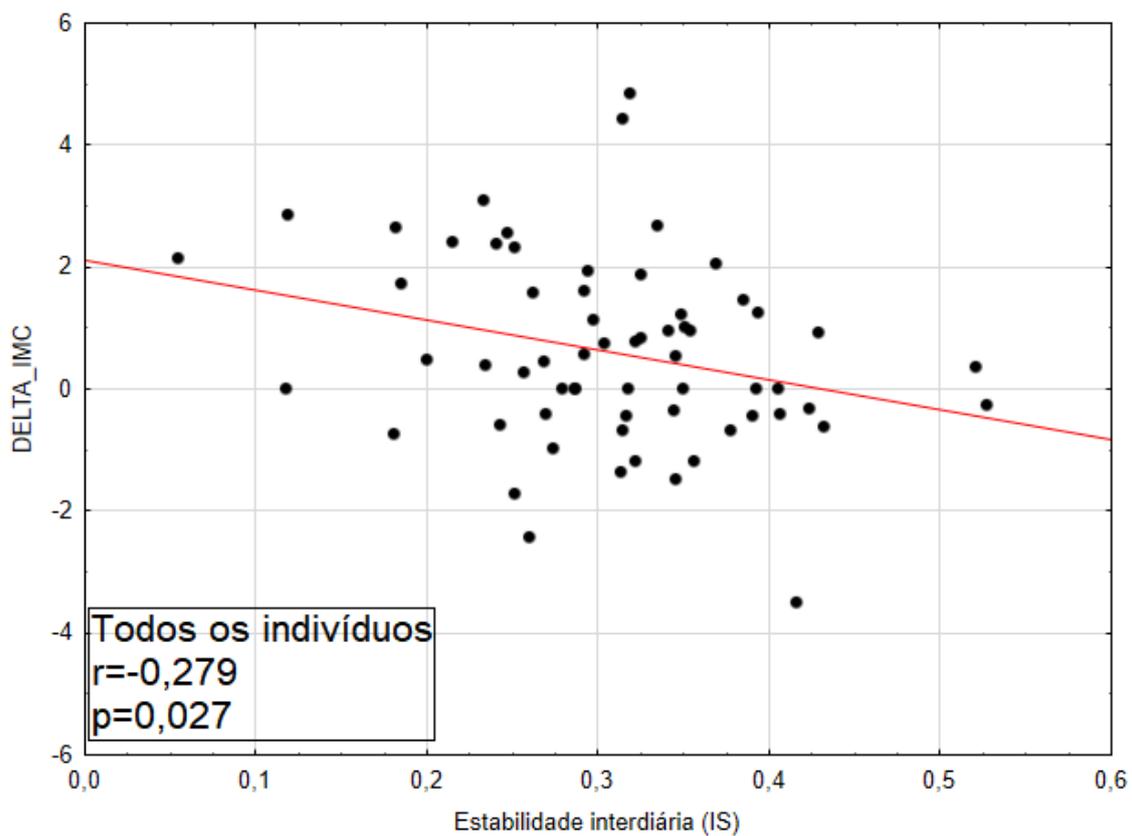


Figura 12. Diagrama de dispersão Δ IMC vs. Estabilidade interdiária (todos os indivíduos).



6 DISCUSSÃO

O objetivo geral do presente estudo foi investigar as possíveis relações entre o perfil de sono, o perfil do ritmo atividade/repouso, o metabolismo e o polimorfismo VNTR do gene *PER3* em uma amostra de estudantes universitários que foi genotipada, utilizou actígrafo de punho por duas semanas e teve seus dados de antropometria coletados. A nossa hipótese é de que o polimorfismo VNTR no gene relógio *PER3* estaria associado às relações entre sono e ritmos circadianos com o metabolismo. A seguir, discutiremos cada um dos resultados obtidos neste estudo.

6.1 Comparação entre os perfis de sono

A análise dos resultados obtidos indica que o grupo *PER3*^{5/5} teve uma tendência a ter uma fase de sono mais atrasada, ao ser comparado com o grupo *PER3*^{4/4}. A fase de sono atrasada do grupo *PER3*^{5/5} foi expressa nos horários tardios de início e término do sono, assim como na meia-fase dos dias de estudo (MSW) e dos dias livres (MSF), além da meia-fase de sono corrigida pelo débito de sono acumulado ao longo da semana (MSFsc). Apesar das diferenças de fase encontradas entre os grupos *PER3*^{4/4} e *PER3*^{5/5}, não foram encontradas diferenças na duração de sono e no *jetlag* social. Contudo, o grupo *PER3*^{4/4} apresentou, em média, maior rebote de sono nos finais de semana quando comparado aos *PER3*^{5/5}.

Por outro lado, aos finais de semana, desconsiderando o genótipo, os estudantes da nossa amostra dormiram e acordaram mais tarde, bem como dormiram por mais tempo, comparado aos dias de estudo.

Diante do que foi exposto, os nossos resultados com o gene *PER3* podem ser explorados sob três diferentes aspectos: latitude, instrumento de atribuição de cronotipos e contexto da coleta de dados.

Da perspectiva genética, o alelo de 4 repetições tem sido descrito como associado à vespertinidade e o alelo de 5 repetições à matutividade (ARCHER *et al.*, 2003; PEREIRA *et al.*, 2005). Nossos resultados, a partir da actigrafia, indicam ao contrário: alelo de 5 repetições associado à vespertinidade e alelo 4 repetições à matutividade.

Além de estudo sobre o gene *PER3* e os cronotipos, existem estudos que descrevem associação entre este gene e a Síndrome da Fase Atrasada do Sono (SFAS), uma síndrome relacionada aos ritmos circadianos (EBISAWA *et al.*, 2001; ARCHER *et al.*, 2003), considerada uma entidade nosológica (ICSD-3), e caracterizada pelo início do sono no final da noite. A SFAS pode ser considerada um fenótipo vespertino extremo. Estudos têm mostrado que, em geral, o alelo de 4 repetições está associado com a SFAS (EBISAWA *et al.*, 2001; ARCHER *et al.*, 2003), entretanto, no estudo realizado no Brasil, Pereira *et al.* (2005) encontraram ao contrário: uma associação entre o alelo de 5 repetições e a SFAS. De forma geral, estes estudos que exploram um possível papel do gene *PER3* na regulação de fenótipos circadianos, analisados em conjunto, permitem uma interpretação na qual a latitude seja um mediador do efeito do gene na regulação do fenótipo. Isto se deve ao fato de parte das associações entre gene e fenótipos estar em função do hemisfério no qual foi realizado o experimento (Pereira *et al.* 2005). Se considerarmos um contínuo fenotípico que vai da matutividade extrema (Doença da Fase Adiantada de Sono, DFAS), passando pela matutividade moderada, por categorias intermediárias, pela vespertividade

moderada até a vespertinidade extrema, podemos inferir que genes que influenciem estes fenótipos o façam de acordo com este contínuo. No estudo de Archer *et al.* (2003), a influência do gene neste contínuo é como esperado, ou seja, o alelo de 5 repetições está associado com a matutividade e o alelo de 4 repetições com a vespertinidade e com a SFAS. No estudo de Pereira *et al.*, (2005) no entanto esta influência genética de acordo com continuidade fenotípica é quebrada, pois o alelo de 5 repetições está associado com os dois extremos do contínuo; com a matutividade e com SFAS. Nosso presente resultado mostra a associação das 4 repetições com matutividade e das 5 repetições com vespertinidade e com a SFAS (se considerarmos os dados relativos a SFAS de Pereira *et al.*, 2005), restaurando o acordo entre o efeito do gene e o contínuo matutividade-vespertinidade. Além disso, a interpretação dos dados neste formato corrobora a hipótese da latitude como mediador do efeito do gene, desde que, o contínuo e a ação gênica aconteceriam como um todo de forma invertida em função do hemisfério no qual o experimento é feito.

Tais resultados nos convidam a visitar o artigo de Pereira *et al.* (2005) e refletir sobre possíveis razões, além de um possível erro tipo alfa, que explicariam os conflitos entre nossos presentes resultados e outros de alguns anos atrás (Pereira *et al.*, 2005).

A primeira explicação possível para os conflitos entre os resultados diz respeito ao instrumento utilizado para a atribuição de cronotipos. Archer *et al.* (2003), Pereira *et al.* (2005) e Kunorozva *et al.* (2012) utilizaram o Questionário de Matutividade-Vespertinidade de Horne & Östberg (HORNE; ÖSTBERG, 1976) para avaliar associações entre o polimorfismo VNTR do gene *PER3* e os fenótipos circadianos e identificaram maior prevalência do genótipo *PER3*^{5/5} no

grupo matutino. O Questionário de Matutividade-Vespertividade de Horne & Östberg (HORNE; ÖSTBERG, 1976) é um instrumento que reflete um traço pessoal (ROENNEBERG *et al.*, 2019): as perguntas do questionário se referem sempre a um horário de preferência de realização de atividades, que tem que ser imaginado pelo respondente, como, por exemplo, qual horário que ela ou ele prefere fazer exercícios, comer, dormir, trabalhar e outras coisas do dia a dia. A actigrafia, por outro lado, reflete um estado vivido atual, um estado pessoal no qual ajustes temporais devem estar se expressando. Tais diferenças entre traço e estado podem ser as razões para os resultados contraditórios entre os achados na literatura (ARCHER *et al.*, 2003; PEREIRA *et al.*, 2005; KUNOROZVA *et al.*, 2012) e o nosso estudo.

O Questionário de Cronotipo de Munique (MCTQ) (THE WORLDWIDE EXPERIMENTATION PLATFORM, 2015b), utilizado para a avaliação de cronotipo, é uma ferramenta que tem como resultante o cronotipo como estado pessoal. No presente estudo, o MCTQ foi aplicado (dados não mostrados) e os resultados corroboram com aqueles obtidos com a actigrafia, ou seja, mostram que o grupo *PER3*^{5/5} é mais vespertino que o *PER3*^{4/4}, o que reforça a ideia de que os conflitos entre os resultados de outros estudos e nosso seja decorrente do instrumento utilizado. Contudo, a ausência de estudos na literatura que tenham investigado a associação entre o polimorfismo VNTR do gene *PER3* e o cronotipo utilizando o MCTQ limitam as nossas conclusões.

Por fim, no que diz respeito às circunstâncias da coleta de dados, os registros actigráficos foram coletados durante a pandemia do COVID-19, período em que a população estava submetida ao *lockdown*. Deste modo, o contexto social e a forma de exposição à luz diante de tais condições são fatores que

podem ter mediado a relação entre o gene *PER3*, o sono e os ritmos circadianos (SALFI *et al.*, 2021; GUO *et al.*, 2021; GIUNTELLA *et al.*, 2021).

Estudos realizados durante a pandemia mostram que, de forma geral, não há um efeito uniforme do *lockdown* sobre o sono (BENHAM, 2020; KOCEVSKA *et al.*, 2020; LEONE; SIGMAN; GOLOMBEK, 2020; WRIGHT *et al.*, 2020; TARGA *et al.*, 2021). De acordo com Kocevska *et al.* (2020), o *lockdown* pode ter tido dois efeitos na qualidade do sono das pessoas: pessoas que dormiam bem antes da pandemia, apresentaram piora na qualidade de sono. Por outro lado, um subconjunto de pessoas que apresentavam insônia grave em um contexto pré-pandêmico sofreu um alívio dos sintomas durante a pandemia.

Apesar de Benham (2020) relatar que não houve alteração na qualidade de sono, o autor observou que estudantes universitários apresentaram horários de dormir e acordar mais tardios durante a pandemia, comparado ao período pré-pandêmico. Segundo Benham (2020), uma possível justificativa foi a transição das aulas presenciais para um contexto *on-line*, uma vez que a maioria das aulas assumiu um formato assíncrono. Logo, neste cenário, surgiu uma maior flexibilidade para os horários de dormir e acordar dos alunos: eles passaram a ter liberdade de escolher os horários para assistir às aulas. Além das aulas, Benham (2020) sugere que a eliminação do tempo de deslocamento até a universidade durante a pandemia também pode ter reduzido mais ainda a necessidade de acordar cedo.

Leone *et al.* (2020) também encontraram horários de dormir e acordar mais tardios durante a pandemia, bem como maior duração de sono, mas apenas durante os dias úteis. Os autores ainda discorrem sobre o atraso de fase encontrado no cronotipo e a diminuição do *jetlag* social durante o *lockdown*. A

possível explicação para estes resultados estaria relacionada às pistas sociais e ambientais: a mudança no estilo de vida, com rotinas mais flexíveis, bem como a baixa exposição à luz pela manhã e/ou alta exposição à luz durante a noite. Na nossa amostra, ambos os grupos, *PER3^{4/4}* e *PER3^{5/5}*, apresentaram horários de dormir e acordar mais tardios aos finais de semana, porém a duração de sono não foi alterada quando comparada com os dias de estudo.

Em nossos resultados, é possível que o grupo *PER3^{4/4}* e o grupo *PER3^{5/5}* estejam apresentando um atraso de fase durante a pandemia pelas mesmas justificativas apresentadas por Benham (2020) e Leone *et al.* (2020). No entanto, uma limitação de nosso estudo é o fato de não termos registros actigráficos realizados em um contexto pré-pandêmico para comparação.

6.2 Rebote de sono e homeostase

Apesar dos grupos *PER3^{4/4}* e *PER3^{5/5}* apresentarem, em média, a mesma duração de sono, o grupo *PER3^{4/4}* apresentou maior rebote de sono, o que sugere que a necessidade de sono é maior para o grupo *PER3^{4/4}* por tal grupo estar mais privado de sono.

A privação ou o encurtamento do sono, comumente vividos na vida contemporânea, principalmente nos grandes centros urbanos (CZEISLER, 2013), podem resultar em um fenômeno chamado “rebote de sono”. De acordo com este fenômeno, um indivíduo privado de sono no dia a dia apresenta, quando possível (normalmente no final de semana), o aumento da duração do sono em decorrência do tempo excessivo que passou acordado nos dias anteriores. Logo, uma forma de expressão para tal rebote poderia ser tanto a duração de sono prolongada e/ou o aumento da sonolência diurna. Em um

estudo de campo, Viola *et al.* (2007) não encontraram diferenças significativas na duração de sono entre grupos de pessoas $PER3^{4/4}$ e $PER3^{5/5}$ em uma amostra de jovens adultos. Por outro lado, em idosos, encontrou que o grupo $PER3^{4/4}$ demonstrou maior probabilidade de adormecer durante o dia, ou seja, possivelmente maior sensibilidade à privação de sono, quando comparados ao grupo $PER3^{5/5}$ (VIOLA *et al.*, 2012). O polimorfismo VNTR do gene $PER3$ também já foi associado com mecanismos homeostáticos do sono em jovens adultos, foi demonstrado que pessoas com genótipo $PER3^{5/5}$ permanecem mais tempo em sono de ondas lentas (SOL), tanto no sono basal, quanto após um protocolo de privação de sono. (VIOLA *et al.*, 2007). De acordo com a literatura especializada, a densidade de SOL no início do sono é um dos marcadores principais da necessidade de sono (FRANKEN; DIJK, 2009; DIJK; ARCHER, 2009). Ainda segundo Viola *et al.* (2007), o grupo $PER3^{5/5}$ também dormiu mais rápido (apresentou menor latência de sono) e teve a dissipação da pressão de sono (representada pela densidade de ondas delta no EEG) mais rápida. Deste modo, é possível sugerir que o genótipo $PER3^{5/5}$ esteja associado com uma eficiência maior na recuperação da privação de sono, o que explicaria o menor rebote de sono encontrado neste grupo, comparado ao grupo $PER3^{4/4}$ no presente estudo.

6.3 Perfil circadiano

A análise dos resultados do presente estudo revela que os indivíduos do grupo $PER3^{5/5}$, em média, expressam um ritmo de atividade/repouso mais instável (IS) e mais fragmentado (IV), além de se movimentarem menos durante o dia (M10). Segundo van Someren *et al.* (1996), valores baixos de M10 indicam

que o indivíduo tem uma rotina inativa. No que diz respeito aos parâmetros de estabilidade (IS) e de fragmentação (IV), até o momento não há pontos de corte disponíveis que diferenciem um ritmo de atividade/repouso normal de um alterado (MAASKANT *et al.*, 2013). Entretanto, apesar desta limitação, a literatura apresenta alguns estudos na área da Psiquiatria que avaliam os valores IS e IV como índices de saúde mental. Witting *et al.* (1990) demonstraram que idosos portadores da Doença de Alzheimer apresentam um ritmo de atividade/repouso mais fragmentado (IV) do que idosos sem a doença. Em outro estudo, Jones *et al.* (2005) verificaram que pessoas saudáveis têm um ritmo de atividade/repouso mais estável (IS) e menos fragmentado (IV) do que o grupo de pacientes portadores do transtorno afetivo bipolar.

No presente estudo, os indivíduos *PER3*^{5/5} apresentam, em média, ritmos circadianos menos estáveis (IS) e mais fragmentados (IV), sugerindo um potencial papel diagnóstico deste genótipo em distúrbios psiquiátricos. Neste sentido, Benedetti *et al.* (2008) demonstraram uma associação entre o polimorfismo VNTR do gene *PER3* e a idade de início do transtorno afetivo bipolar. Logo, diante deste contexto, mais estudos são necessários para explorar este potencial diagnóstico.

6.4 Perfil de sono, perfil circadiano e metabolismo

Um dos objetivos deste trabalho foi investigar possíveis associações entre os fenótipos circadianos, os genótipos e o Índice de Massa Corporal (IMC). De acordo com os resultados obtidos, não encontramos associação entre os parâmetros do IMC e as variáveis de sono, mas encontramos associações entre IMC e perfis circadianos.

A relação entre sono de má qualidade e/ou duração encurtada do sono e problemas metabólicos já é bem estabelecida (KNUTSON; VAN CAUTER, 2008; PATEL *et al.*, 2008; LEPROULT; VAN CAUTER, 2010), uma vez que os hormônios que influenciam a regulação da glicose e o controle do apetite são afetados pelo sono (LEPROULT; VAN CAUTER, 2010). Segundo Knutson e van Cauter (2008), mais de 30% dos adultos entre 30 e 64 anos relatam dormir menos de 6 horas por noite. Nos Estados Unidos, este cenário de duração de sono encurtada coincidiu com o aumento da prevalência de obesidade e diabetes na população (KNUTSON; VAN CAUTER, 2008).

A explicação para a ausência de associação entre IMC e sono em nossos resultados pode ser atribuída a três fatores: fragilidade da mensuração do IMC pelo relato do voluntário, o curto intervalo de tempo que se sucedeu entre a primeira e a segunda medidas de IMC desenvolvidas no presente estudo e a idade dos voluntários.

No que diz respeito à mensuração do IMC, a altura e o peso dos voluntários foram coletados de forma autorreferida (ANEXO 2), o que pode, eventualmente, ter levado a um viés de medição. Entretanto, estudos sobre medidas autorreferidas de altura e peso apoiam a sua utilização. Olfert *et al.* (2018) investigaram a magnitude da discrepância na altura e peso autorreferidos, bem como o subsequente IMC calculado versus medidas reais em 1.562 adultos jovens. Os resultados apontaram para uma ligeira superestimativa da altura tanto pelos homens ($2,0 \pm 4,3$ cm) quanto pelas mulheres ($0,12 \pm 3,5$ cm) e subestimativa do peso pelas mulheres ($-0,61 \pm 6,9$ kg), variações de estimativa consideradas mínimas e semelhantes aos achados de Quick *et al.* (2015) com 1.686 estudantes universitários. Os resultados de Quick *et al.* (2015) mostraram

que a altura e o peso autorreferidos, quando utilizados para classificar indivíduos em grupos de IMC (magreza, eutrofia, sobrepeso e obesidade), atingiram uma acurácia de 93%, ou seja, 93% de acertos, incentivando a utilização de medidas antropométricas autorreferidas em pesquisas nas quais mensurações físicas não são possíveis.

Quanto ao intervalo de tempo que se sucedeu entre as coletas de dados, Wong *et al.* (2022) avaliaram a irregularidade do ciclo sono/vigília em estudantes universitários ao longo de 9 semanas e não encontraram associação com a mudança do IMC ao longo do tempo. Segundo os autores, o intervalo de tempo foi curto para se observar algum efeito neste sentido, comparados aos estudos longitudinais que avaliam o risco à obesidade (WONG *et al.*, 2022).

Por fim, a idade média dos voluntários é de 22 anos e distúrbios metabólicos, em muitos casos, tendem a se tornar mais prevalentes com o aumento da idade (HILDRUM *et al.*, 2007; OGBERA, 2010). A síndrome metabólica, por exemplo, é definida como um *cluster* de fatores de risco para doenças cardiovasculares e diabetes tipo 2 (HILDRUM *et al.*, 2007), sendo a hiperglicemia, a dislipidemia, a obesidade e a hipertensão os principais fatores que caracterizam a doença. No estudo de Hildrum *et al.* (2007), com 10.202 sujeitos, observou-se que a prevalência da síndrome metabólica, definida pela *International Diabetes Federation* (2005), aumentou de 11,0% na faixa etária de 20 a 29 anos para 47,2% na faixa de 80 a 89 anos em homens e de 9,2% para 64,4% para mulheres nas faixas etárias correspondentes.

Contudo, nossos resultados revelaram associações entre variáveis circadianas, como IS (estabilidade interdiária) e IV (variabilidade intradiária), com Δ IMC. Observamos uma correlação negativa entre IS (estabilidade interdiária) e

Δ IMC somente quando analisamos todos os indivíduos independente dos genótipos, o que sugere que a relação entre a diminuição da estabilidade dos ritmos circadianos e o aumento do IMC é independente do gene *PER3*. O outro resultado obtido, dependente do genótipo, foi uma correlação positiva relacionada ao grupo *PER3^{4/4}*: observamos que quanto mais fragmentado (IV) é o ritmo atividade/repouso, maior é a variação do IMC ao longo do tempo, isto é, maior o aumento da massa corporal. Todavia, mais estudos são necessários para explorar o papel da dependência e independência do genótipo associado às variáveis circadianas.

Desde 1991, quando os índices IS (estabilidade interdiária) e IV (variabilidade intradiária) foram propostos por Witting *et al.*, tais medidas têm sido utilizadas como marcadores de desalinhamento circadiano (VETTER, 2020). A associação entre a ruptura da ritmicidade circadiana e a obesidade é um assunto corrente na literatura (GARAULET; ORDOVÁS; MADRID, 2010; COVASSIN; SINGH; SOMERS, 2016; MCHILL; WRIGHT, 2017). Isto deve-se ao fato da industrialização ter dado origem ao trabalho por turnos (GARAULET; ORDOVÁS; MADRID, 2010; MCHILL; WRIGHT, 2017), e a exposição à luz durante a noite pode ser considerada um possível fator associado à obesidade (COVASSIN *et al.*, 2016) e à síndrome metabólica (BENEDITO-SILVA *et al.*, 2020). Covassin *et al.* (2016) justificam que a melatonina está vinculada ao metabolismo da glicose e de lipídeos, e a sua supressão pela luz poderia provocar uma disfunção metabólica e conseqüente aumento de peso.

7 CONCLUSÃO

Em conclusão, os achados do presente estudo mostram que há associações entre gene *PER3*, sono, ritmos circadianos e aspectos do metabolismo. De forma geral, encontramos que o gene está ligado à expressão dos horários de sono e da fase do ritmo de atividade/repouso, e que há também uma mediação gênica de aspectos do metabolismo ligados ao IMC, em função de uma disrupção rítmica. Nossos dados podem fornecer novos *insights* sobre a modulação, pelo polimorfismo VNTR do gene *PER3*, do sono, dos ritmos circadianos e do metabolismo.

Os experimentos aqui realizados contaram com o inusitado cenário da pandemia COVID-19, o que não era nem um pouco imaginável na época da concepção do projeto. O fato de os experimentos do registro de sono e ritmos circadianos terem acontecido durante este período pandêmico tem que ser, portanto, considerado um elemento ambiental com potencial atuante nos resultados obtidos.

REFERÊNCIAS

ACTTRUST - Manual do Usuário. Brasil: Condor Instruments Ltda., 2019.

ALBRECHT, U. Invited review: regulation of mammalian circadian clock genes. **J Appl Physiol** (1985), 92, n. 3, p. 1348-1355, Mar 2002.

ALBRECHT, U. The circadian clock, metabolism and obesity. **Obes Rev**, 18 Suppl 1, p. 25-33, 02 2017.

ANCOLI-ISRAEL, S.; COLE, R.; ALESSI, C.; CHAMBERS, M. *et al.* The role of actigraphy in the study of sleep and circadian rhythms. **Sleep**, 26, n. 3, p. 342-392, May 01 2003.

ARCHER, S. N.; ROBILLIARD, D. L.; SKENE, D. J.; SMITS, M. *et al.* A length polymorphism in the circadian clock gene *Per3* is linked to delayed sleep phase syndrome and extreme diurnal preference. **Sleep**, 26, n. 4, p. 413-415, Jun 15 2003.

ARENDDT, J.; BROADWAY, J. Light and melatonin as zeitgebers in man. **Chronobiol Int**, 4, n. 2, p. 273-282, 1987.

BENEDETTI, F.; DALLASPEZIA, S.; COLOMBO, C.; PIROVANO, A. *et al.* A length polymorphism in the circadian clock gene *Per3* influences age at onset of bipolar disorder. **Neurosci Lett**, 445, n. 2, p. 184-187, Nov 14 2008.

BENEDITO-SILVA, A. A.; EVANS, S.; VIANA MENDES, J.; CASTRO, J. *et al.* Association between light exposure and metabolic syndrome in a rural Brazilian town. **PLoS One**, 15, n. 9, p. e0238772, 2020.

BENHAM, G. Stress and sleep in college students prior to and during the COVID-19 pandemic. **Stress Health**, 37, n. 3, p. 504-515, Aug 2021.

BUTTGEREIT, F.; SMOLEN, J. S.; COOGAN, A. N.; CAJOCHEN, C. Clocking in: chronobiology in rheumatoid arthritis. **Nat Rev Rheumatol**, 11, n. 6, p. 349-356, Jun 2015.

COLE, R. J.; KRIPKE, D. F.; GRUEN, W.; MULLANEY, D. J. *et al.* Automatic sleep/wake identification from wrist activity. **Sleep**, 15, n. 5, p. 461-469, Oct 1992.

COVASSIN, N.; SINGH, P.; SOMERS, V. K. Keeping Up With the Clock: Circadian Disruption and Obesity Risk. **Hypertension**, 68, n. 5, p. 1081-1090, 11 2016.

CZEISLER, C. A. Perspective: casting light on sleep deficiency. **Nature**, 497, n. 7450, p. S13, May 23 2013.

DALLMANN, R.; WEAVER, D. R. Altered body mass regulation in male *mPeriod* mutant mice on high-fat diet. **Chronobiol Int**, 27, n. 6, p. 1317-1328, Jul 2010.

DIJK, D. J.; ARCHER, S. N. PERIOD3, circadian phenotypes, and sleep homeostasis. **Sleep Med Rev**, 14, n. 3, p. 151-160, Jun 2010.

EBISAWA, T.; UCHIYAMA, M.; KAJIMURA, N.; MISHIMA, K. *et al.* Association of structural polymorphisms in the human period3 gene with delayed sleep phase syndrome. **EMBO Rep**, 2, n. 4, p. 342-346, Apr 2001.

ECKEL-MAHAN, K.; SASSONE-CORSI, P. Metabolism and the circadian clock converge. **Physiol Rev**, 93, n. 1, p. 107-135, Jan 2013.

FEKEDULEGN, D.; ANDREW, M. E.; SHI, M.; VIOLANTI, J. M. *et al.* Actigraphy-Based Assessment of Sleep Parameters. **Ann Work Expo Health**, 64, n. 4, p. 350-367, 04 30 2020.

FENG, D.; LAZAR, M. A. Clocks, metabolism, and the epigenome. **Mol Cell**, 47, n. 2, p. 158-167, Jul 27 2012.

FRANKEN, P.; DIJK, D. J. Circadian clock genes and sleep homeostasis. **Eur J Neurosci**, 29, n. 9, p. 1820-1829, May 2009.

GAMBLE, K. L.; BERRY, R.; FRANK, S. J.; YOUNG, M. E. Circadian clock control of endocrine factors. **Nat Rev Endocrinol**, 10, n. 8, p. 466-475, Aug 2014.

GARAULET, M.; MADRID, J. A. Chronobiological aspects of nutrition, metabolic syndrome and obesity. **Adv Drug Deliv Rev**, 62, n. 9-10, p. 967-978, Jul 31 2010.

GARAULET, M.; ORDOVÁS, J. M.; MADRID, J. A. The chronobiology, etiology and pathophysiology of obesity. **Int J Obes (Lond)**, 34, n. 12, p. 1667-1683, Dec 2010.

GIUNTELLA, O.; HYDE, K.; SACCARDO, S.; SADOFF, S. Lifestyle and mental health disruptions during COVID-19. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 118, n. 9, 03 02 2021.

GONÇALVES, B. S.; ADAMOWICZ, T.; LOUZADA, F. M.; MORENO, C. R. *et al.* A fresh look at the use of nonparametric analysis in actimetry. **Sleep Med Rev**, 20, p. 84-91, Apr 2015.

GONÇALVES, B. S.; CAVALCANTI, P. R.; TAVARES, G. R.; CAMPOS, T. F. *et al.* Nonparametric methods in actigraphy: An update. **Sleep Sci**, 7, n. 3, p. 158-164, Sep 2014.

GUO, Y. F.; LIAO, M. Q.; CAI, W. L.; YU, X. X. *et al.* Physical activity, screen exposure and sleep among students during the pandemic of COVID-19. **Sci Rep**, 11, n. 1, p. 8529, 04 20 2021.

GÓMEZ-ABELLÁN, P.; HERNÁNDEZ-MORANTE, J. J.; LUJÁN, J. A.; MADRID, J. A. *et al.* Clock genes are implicated in the human metabolic syndrome. **Int J Obes (Lond)**, 32, n. 1, p. 121-128, Jan 2008.

HASHIMOTO, S.; NAKAMURA, K.; HONMA, S. *et al.* Non-photoc entrainment of human rest-activity cycle independent of circadian pacemaker. **Sleep Biol. Rhythms** 2, 29–36, 2004.

HARDY, G. H. MENDELIAN PROPORTIONS IN A MIXED POPULATION. **Science**, 28, n. 706, p. 49-50, Jul 10 1908.

HERMAN, J. H. Chronobiologic Monitoring Techniques. In: KRYGER, M. H. (ed.); ROTH, T. (ed.). **Principles and practice of sleep medicine**. 6th edition. Philadelphia, PA: Elsevier, 2017. p. 1664.

HILDRUM, B.; MYKLETUN, A.; HOLE, T.; MIDTHJELL, K. *et al.* Age-specific prevalence of the metabolic syndrome defined by the International Diabetes Federation and the National Cholesterol Education Program: the Norwegian HUNT 2 study. **BMC Public Health**, 7, p. 220, Aug 29 2007.

HORNE, J. A.; OSTBERG, O. A self-assessment questionnaire to determine morningness-eveningness in human circadian rhythms. **Int J Chronobiol**, 4, n. 2, p. 97-110, 1976.

INTERNATIONAL CLASSIFICATION OF SLEEP DISORDERS (ICSD). American Academy of Sleep Medicine. 3rd edition. Darien, IL: American Academy of Sleep Medicine, 2014.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION: Global Guideline for Type 2 Diabetes, 2005.

JEAN-LOUIS, G.; KRIPKE, D. F.; COLE, R. J.; ASSMUS, J. D. *et al.* Sleep detection with an accelerometer actigraph: comparisons with polysomnography. **Physiol Behav**, 72, n. 1-2, p. 21-28, Jan 2001.

JENKINS, A.; ARCHER, S. N.; VON SCHANTZ, M. Expansion during primate radiation of a variable number tandem repeat in the coding region of the circadian clock gene period3. **J Biol Rhythms**, 20, n. 5, p. 470-472, Oct 2005.

JONES, S. H.; HARE, D. J.; EVERSHED, K. Actigraphic assessment of circadian activity and sleep patterns in bipolar disorder. **Bipolar Disord**, 7, n. 2, p. 176-186, Apr 2005.

KNUTSON, K. L.; VAN CAUTER, E. Associations between sleep loss and increased risk of obesity and diabetes. **Ann N Y Acad Sci**, 1129, p. 287-304, 2008.

KOCEVSKA, D.; BLANKEN, T. F.; VAN SOMEREN, E. J. W.; RÖSLER, L. Sleep quality during the COVID-19 pandemic: not one size fits all. **Sleep Med**, 76, p. 86-88, 12 2020.

KONOPKA, R. J.; BENZER, S. Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 68, n. 9, p. 2112-2116, Sep 1971.

KUNOROZVA, L.; STEPHENSON, K. J.; RAE, D. E.; RODEN, L. C. Chronotype and PERIOD3 variable number tandem repeat polymorphism in individual sports athletes. **Chronobiol Int**, 29, n. 8, p. 1004-1010, Oct 2012.

LEONE, M. J.; SIGMAN, M.; GOLOMBEK, D. A. Effects of lockdown on human sleep and chronotype during the COVID-19 pandemic. **Curr Biol**, 30, n. 16, p. R930-R931, 08 17 2020.

LEPROULT, R.; VAN CAUTER, E. Role of sleep and sleep loss in hormonal release and metabolism. **Endocr Dev**, 17, p. 11-21, 2010.

LIU, A. C.; LEWIS, W. G.; KAY, S. A. Mammalian circadian signaling networks and therapeutic targets. **Nat Chem Biol**, 3, n. 10, p. 630-639, Oct 2007.

MAASKANT, M.; VAN DE WOUW, E.; VAN WIJCK, R.; EVENHUIS, H. M. *et al.* Circadian sleep-wake rhythm of older adults with intellectual disabilities. **Res Dev Disabil**, 34, n. 4, p. 1144-1151, Apr 2013.

MARQUES, M. D.; GOLOMBEK, D.; MORENO, C. Adaptação Temporal. In: MARQUES, N. (org.); MENNA-BARRETO, L. (org.). **Cronobiologia: Princípios e Aplicações**. 3. ed. rev. e ampl. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2003. Cap. 3, p. 55-98.

MCHILL, A. W.; WRIGHT, K. P. Role of sleep and circadian disruption on energy expenditure and in metabolic predisposition to human obesity and metabolic disease. **Obes Rev**, 18 Suppl 1, p. 15-24, 02 2017.

MORGENTHALER, T.; ALESSI, C.; FRIEDMAN, L.; OWENS, J. *et al.* Practice parameters for the use of actigraphy in the assessment of sleep and sleep disorders: an update for 2007. **Sleep**, 30, n. 4, p. 519-529, Apr 2007.

OGBERA, A. O. Prevalence and gender distribution of the metabolic syndrome. **Diabetol Metab Syndr**, 2, p. 1, Jan 12 2010.

OLFERT, M. D.; BARR, M. L.; CHARLIER, C. M.; FAMODU, O. A. *et al.* Self-Reported vs. Measured Height, Weight, and BMI in Young Adults. **Int J Environ Res Public Health**, 15, n. 10, 10 11 2018.

PATEL, S. R.; BLACKWELL, T.; REDLINE, S.; ANCOLI-ISRAEL, S. *et al.* The association between sleep duration and obesity in older adults. **Int J Obes (Lond)**, 32, n. 12, p. 1825-1834, Dec 2008.

PEREIRA, D. S.; TUFIK, S.; LOUZADA, F. M.; BENEDITO-SILVA, A. 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, n. 1, p. 29-32, Jan 2005.

PEREIRA, D. S.; SABINO, F. C.; UMEMURA, G. S. Period3: um gene relacionado com a sincronização de ritmos circadianos pela luz. **Revista da Biologia**, [S. l.], v. 9, n. 3, p. 26-31, 2012. Disponível em:

<<https://www.revistas.usp.br/revbiologia/article/view/114821>>. Acesso em: 28 jun. 2022

QUICK, V.; BYRD-BREDBENNER, C.; SHOFF, S.; WHITE, A. A. *et al.* Concordance of self-report and measured height and weight of college students. **J Nutr Educ Behav**, 47, n. 1, p. 94-98, 2015 Jan-Feb 2015.

RAMOS-LOPEZ, O.; SAMBLAS, M.; MILAGRO, F. I.; RIEZU-BOJ, J. I. *et al.* Circadian gene methylation profiles are associated with obesity, metabolic disturbances and carbohydrate intake. **Chronobiol Int**, 35, n. 7, p. 969-981, 07 2018.

ROENNEBERG, T.; DRAGOVIC, Z.; MERROW, M. Demasking biological oscillators: properties and principles of entrainment exemplified by the *Neurospora* circadian clock. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 102, n. 21, p. 7742-7747, May 24 2005.

ROENNEBERG, T.; KELLER, L. K.; FISCHER, D.; MATERA, J. L. *et al.* Human activity and rest in situ. **Methods Enzymol**, 552, p. 257-283, 2015.

ROENNEBERG, T.; PILZ, L. K.; ZERBINI, G.; WINNEBECK, E. C. Chronotype and Social Jetlag: A (Self-) Critical Review. **Biology (Basel)**, 8, n. 3, Jul 12 2019.

ROENNEBERG, T.; WIRZ-JUSTICE, A.; MERROW, M. Life between clocks: daily temporal patterns of human chronotypes. **J Biol Rhythms**, 18, n. 1, p. 80-90, Feb 2003.

ROTENBERG, L.; MARQUES, N.; MENNA-BARRETO, L. História e Perspectivas da Cronobiologia. In: MARQUES, N. (org.); MENNA-BARRETO, L. (org.). **Cronobiologia: Princípios e Aplicações**. 3. ed. rev. e ampl. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2003. p. 32.

RÜGER, M.; SCHEER, F. A. Effects of circadian disruption on the cardiometabolic system. **Rev Endocr Metab Disord**, 10, n. 4, p. 245-260, Dec 2009.

SABINO, F. C.; RIBEIRO, A. O.; TUFIK, S.; TORRES, L. B. *et al.* Evolutionary history of the PER3 variable number of tandem repeats (VNTR): idiosyncratic aspect of primate molecular circadian clock. **PLoS One**, 9, n. 9, p. e107198, 2014.

SADEH, A.; SHARKEY, K. M.; CARSKADON, M. A. Activity-based sleep-wake identification: an empirical test of methodological issues. **Sleep**, 17, n. 3, p. 201-207, Apr 1994.

SALFI, F.; AMICUCCI, G.; CORIGLIANO, D.; D'ATRI, A. *et al.* Changes of evening exposure to electronic devices during the COVID-19 lockdown affect the time course of sleep disturbances. **Sleep**, 44, n. 9, 09 13 2021.

SCHEER, F. A.; HILTON, M. F.; MANTZOROS, C. S.; SHEA, S. A. Adverse metabolic and cardiovascular consequences of circadian misalignment. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 106, n. 11, p. 4453-4458, Mar 17 2009.

SHI, S. Q.; ANSARI, T. S.; MCGUINNESS, O. P.; WASSERMAN, D. H. *et al.* Circadian disruption leads to insulin resistance and obesity. **Curr Biol**, 23, n. 5, p. 372-381, Mar 04 2013.

STENVERS, D. J.; SCHEER, F. A. J. L.; SCHRAUWEN, P.; LA FLEUR, S. E. *et al.* Circadian clocks and insulin resistance. **Nat Rev Endocrinol**, 15, n. 2, p. 75-89, 02 2019.

STONE, K. L.; ANCOLI-ISRAEL, S. Actigraphy. In: KRYGER, M. H. (ed.); ROTH, T. (ed.). **Principles and practice of sleep medicine**. 6th edition. Philadelphia, PA: Elsevier, 2017. p. 1671.

TAKAHASHI, J. S. Transcriptional architecture of the mammalian circadian clock. **Nat Rev Genet**, 18, n. 3, p. 164-179, 03 2017.

TARGA, A. D. S.; BENÍTEZ, I. D.; MONCUSÍ-MOIX, A.; ARGUIMBAU, M. *et al.* Decrease in sleep quality during COVID-19 outbreak. **Sleep Breath**, 25, n. 2, p. 1055-1061, 06 2021.

TASSO, A. F.; HISLI SAHIN, N.; SAN ROMAN, G. J. COVID-19 disruption on college students: Academic and socioemotional implications. **Psychol Trauma**, 13, n. 1, p. 9-15, Jan 2021.

THE WORLDWIDE EXPERIMENTATION PLATFORM, 2015a. Disponível em: <<https://www.thewep.org/documentations/mctq/item/mctq-variables>>. Acesso em: 28 jun. 2022.

THE WORLDWIDE EXPERIMENTATION PLATFORM, 2015b. Disponível em: <<https://www.thewep.org/documentations/mctq/item/english-mctq-full>>. Acesso em: 28 jun. 2022.

TSANG, A. H.; ASTIZ, M.; FRIEDRICH, M.; OSTER, H. Endocrine regulation of circadian physiology. **J Endocrinol**, 230, n. 1, p. R1-R11, 07 2016.

VAN SOMEREN, E. J.; HAGEBEUK, E. E.; LIJZENGA, C.; SCHELTENS, P. *et al.* Circadian rest-activity rhythm disturbances in Alzheimer's disease. **Biol Psychiatry**, 40, n. 4, p. 259-270, Aug 15 1996.

VETTER, C. Circadian disruption: What do we actually mean? **Eur J Neurosci**, 51, n. 1, p. 531-550, 01 2020.

VIOLA, A. U.; ARCHER, S. N.; JAMES, L. M.; GROEGER, J. A. *et al.* PER3 polymorphism predicts sleep structure and waking performance. **Curr Biol**, 17, n. 7, p. 613-618, Apr 03 2007.

VIOLA, A. U.; CHELLAPPA, S. L.; ARCHER, S. N.; PUGIN, F. *et al.* Interindividual differences in circadian rhythmicity and sleep homeostasis in older people: effect of a PER3 polymorphism. **Neurobiol Aging**, 33, n. 5, p. 1010.e1017-1027, May 2012.

WITTING, W.; KWA, I. H.; EIKELENBOOM, P.; MIRMIRAN, M. *et al.* Alterations in the circadian rest-activity rhythm in aging and Alzheimer's disease. **Biol Psychiatry**, 27, n. 6, p. 563-572, Mar 15 1990.

WONG, P. M.; BARKER, D.; ROANE, B. M.; VAN REEN, E. *et al.* Sleep regularity and body mass index: findings from a prospective study of first-year college students. **Sleep Adv**, 3, n. 1, p. zpac004, 2022.

WRIGHT, K. P.; LINTON, S. K.; WITHROW, D.; CASIRAGHI, L. *et al.* Sleep in university students prior to and during COVID-19 Stay-at-Home orders. **Curr Biol**, 30, n. 14, p. R797-R798, 07 20 2020.

ZANQUETTA, M. M.; CORRÊA-GIANNELLA, M. L.; MONTEIRO, M. B.; VILLARES, S. M. Body weight, metabolism and clock genes. **Diabetol Metab Syndr**, 2, p. 53, Aug 16 2010.

Anexo 1. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Estudo: Caracterização fenotípica de ritmos circadianos em indivíduos com diferentes genótipos para polimorfismos nos genes relógio em diferentes regiões do Brasil: ênfase na investigação do gene *PER3* e o efeito latitude

O estudo "Caracterização fenotípica de ritmos circadianos em indivíduos com diferentes genótipos para polimorfismos nos genes relógio em diferentes regiões do Brasil: ênfase na investigação do gene *PER3* e o efeito latitude" trata-se de um estudo experimental que tem como objetivo verificar se existe associação de polimorfismos nos genes relógio e dos genes *AANAT* e *HIOMT* com o cronotipo e do VNTR do gene *PER3* na regulação circadiana dependente da duração da fotofase associada ao clima latitudinal. Para este estudo, será solicitado o preenchimento de alguns formulários e questionários, bem como uma coleta de células da mucosa oral por meio de uma "escovinha" estéril para genotipagem do polimorfismo de repetição dos genes-relógio. Nenhum desconforto ou risco aos voluntários que participarão deste estudo serão ocasionados pelos procedimentos realizados. Após esta etapa, serão selecionados somente alguns voluntários, que na segunda etapa do estudo usarão um actímetro (instrumento parecido com um relógio de pulso, que tem como função medir atividade/repouso, temperatura periférica e luminosidade ambiental) por 3 semanas, duas vezes ao ano, e responderão diários de sono diariamente durante as 3 semanas de coleta de dados. Dados de Índice de Massa Corporal (IMC), como altura e peso, e de circunferência abdominal também serão coletados. Os dados de IMC serão obtidos através de uma balança antropométrica, enquanto que a medida da circunferência abdominal será realizada com uma fita métrica. Nenhum desconforto ou risco aos voluntários que participarão deste estudo serão ocasionados pelos procedimentos realizados.

1. Eu, abaixo assinado, concordei voluntariamente em participar do estudo acima.
2. Recebi informações detalhadas sobre a natureza e objetivo do estudo e sobre as solicitações que me serão feitas.
3. Confirmando que informei sobre medicações ou drogas, que interfiram no sono, prescritas ou não, que eu tenha tomado no último mês e, esteja tomando ou pretenda tomar.
4. Concordo em ser completamente cooperativo nos procedimentos envolvidos, e em informar de imediato qualquer sintoma inesperado.

Assinatura do voluntário: _____

5. Tenho conhecimento sobre minha garantia de acesso, em qualquer etapa do estudo, aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Dr. **Mario Pedrazzoli** que pode ser encontrado no endereço Rua Arlindo Bettio, 1000, telefone(s): (11) 3091-8831.
6. Tenho conhecimento de que sou livre para desistir do estudo a qualquer momento, sem a necessidade de justificar minha decisão.
7. Tenho conhecimento de que minha participação é sigilosa, isto é, que meu nome não será divulgado em qualquer publicação, comunicação científica ou relatórios relativos aos resultados da pesquisa. Além disso, eu não tenho o direito de restringir de maneira alguma o uso dos resultados obtidos, desde que eu não seja identificado como sujeito do estudo. Também autorizo a publicação das informações em congressos e artigos científicos.
8. Estou ciente de que não receberei remuneração para participar do estudo e que não terão despesas pessoais em qualquer fase do estudo.
9. Esta pesquisa foi submetida ao comitê de ética da Escola de Artes, Ciências e Humanidades da Universidade de São Paulo. Caso tenha alguma dúvida e deseja entrar em contato com o comitê, o telefone é (11) 3091-1046. E-mail: cep-each@usp.br

Nome: _____

Data: ___/___/___

Endereço: _____

Assinatura do voluntário: _____

Assinatura da testemunha: _____

Confirmo ter explicado a natureza e objetivos desse estudo ao voluntário acima.

Nome: Mario Pedrazzoli

Data: ___/___/___

Assinatura: _____

Anexo 2. Questionário *on-line*: dados pessoais, antropometria e MCTQ.

Formulario 5

Obrigado pelo seu interesse em nos ajudar com a realização do projeto "Genética do Sono"!

Por favor, leia com atenção as questões e as descrições presentes no questionário antes de registrar a resposta.

Garantimos sua privacidade. Seus dados pessoais nunca serão divulgados.

Responsável pela pesquisa: Prof. Dr. Mario Pedrazzoli Neto

Grupo Interdisciplinar de Pesquisa em Sono (GIPSO)
Escola de Artes, Ciências e Humanidades (EACH)
Universidade de São Paulo (USP)

*Obrigatório

1. E-mail *

Filtro

2. Você tem entre 18 e 30 anos? *

Marcar apenas uma oval.

- Sim
 Não

Filtro

3. Você estuda? *

Marcar apenas uma oval.

- Sim
 Não

Filtro

4. Você estuda no período matutino? *

Marcar apenas uma oval.

- Sim
 Não *Pular para a pergunta 6*

Filtro

5. Durante a semana, quantos dias você estuda no período matutino? *

Marcar apenas uma oval.

- 0
 1
 2
 3
 4
 5

Filtro

6. Você estuda no período vespertino? *

Marcar apenas uma oval.

- Sim
 Não *Pular para a pergunta 8*

Filtro

7. Durante a semana, quantos dias você estuda no período vespertino? *

Marcar apenas uma oval.

- 0
 1
 2
 3
 4
 5

Filtro

8. Você estuda no período noturno? *

Marcar apenas uma oval.

- Sim
 Não

Filtro

9. Durante a semana, quantos dias você estuda no período noturno? *

Marcar apenas uma oval.

- 0
 1
 2
 3
 4
 5

Pular para a pergunta 10

Dados Pessoais

Precisamos de alguns dados pessoais para caracterizarmos a amostra.

Não se preocupe, garantimos sua privacidade. Seus dados pessoais nunca serão divulgados.

10. Nome completo *

11. Data de nascimento *

Preencha a data no formato dd/mm/aaaa (e.g. 01/01/2001).

12. Sexo biológico *

Marcar apenas uma oval.

- Feminino
 Masculino

13. CPF *

Preencha somente com os números

14. Telefone celular (incluir DDD) *

Não insira o "0" no DDD (e.g. 11 em vez de 011).

15. CEP de residência *

Preencha somente com os números

16. Peso *

Aproximado. Preencha seu peso em quilogramas (kg).

17. Altura *

Aproximada. Preencha em sua altura em centímetros (cm) (e.g. 160 em vez de 1,60).

Estudo

18. Em qual universidade você estuda? *

Marcar apenas uma oval.

Universidade de São Paulo (USP)

Outro: _____

19. Se responder "USP" na questão anterior, qual é seu nº USP?

20. Em qual escola/faculdade/instituto você estuda? *

Marcar apenas uma oval.

Escola de Artes, Ciências e Humanidades (EACH)

Outro: _____

21. Qual é o grau do curso/programa que você frequenta? *

Marcar apenas uma oval.

Graduação

Mestrado

Doutorado

Pós-Doutorado

Outro: _____

22. Qual é o nome do curso/programa que você frequenta? *

Marcar apenas uma oval.

- Biotecnologia
- Educação física e saúde
- Gerontologia
- Gestão ambiental
- Gestão de políticas públicas
- Lazer e turismo
- Licenciatura em ciências da natureza
- Marketing
- Obstetrícia
- Sistemas de informação
- Têxtil e moda
- Outro: _____

23. Em quais dias da semana você estuda? *

Selecione todos os dias da semana em que você possui aula regularmente no semestre atual.

Marque todas que se aplicam.

- Segunda-feira
- Terça-feira
- Quarta-feira
- Quinta-feira
- Sexta-feira
- Sábado

Trabalho

24. Você trabalha? *

Marcar apenas uma oval.

- Sim
- Não *Pular para a seção 14 (Questionário de Cronotipo)*

Trabalho

25. Em quais dias da semana você trabalha? *

Selecione todos os dias da semana em que você trabalha regularmente.

Marque todas que se aplicam.

- Segunda-feira
- Terça-feira
- Quarta-feira
- Quinta-feira
- Sexta-feira
- Sábado

26. Em quais períodos do dia você trabalha?

Selecione todos os períodos nos quais você trabalha regularmente.

Marque todas que se aplicam.

- Manhã
- Tarde
- Noite
- Madrugada

Questionário
de
Cronotipo

Para as questões seguintes CONSIDERE OS DIAS DE ESTUDO COMO DIAS DE TRABALHO.

Neste questionário pedimos para que você relate seu comportamento típico de sono nas últimas 4 semanas. É perguntado sobre dias de trabalho e dias livres de trabalho separadamente. Responda as perguntas de acordo com sua percepção de uma semana padrão que inclua seus dias de trabalho e dias livres de trabalho usuais.

MCTQ (Core) (P-BR) | © 2007, Till Roenneberg, Karla Allebrandt & Martha Merrow, LMU München

Questionário de Cronotipo

Para as questões seguintes CONSIDERE OS DIAS DE ESTUDO COMO DIAS DE TRABALHO.

27. Você tem um horário regular de trabalho (também como dona(o) de casa, etc.)? *

Considere os dias de estudo como dias de trabalho.

Marcar apenas uma oval.

- Sim
- Não

Questionário de Cronotipo

Para as questões seguintes CONSIDERE OS DIAS DE ESTUDO COMO DIAS DE TRABALHO.

28. Quantos dias por semana você tem um horário regular de trabalho (também como dona(o) de casa, etc.)? *

CONSIDERE OS DIAS DE ESTUDO COMO DIAS DE TRABALHO

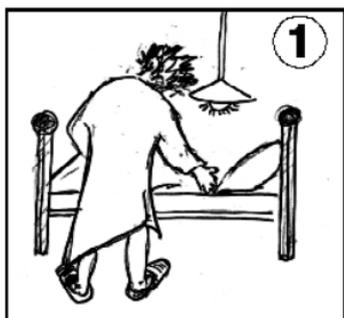
Marcar apenas uma oval.

- 1 Pular para a pergunta 38
- 2 Pular para a pergunta 38
- 3 Pular para a pergunta 38
- 4 Pular para a pergunta 38
- 5 Pular para a pergunta 38
- 6 Pular para a pergunta 38
- 7 Pular para a pergunta 29

Questionário de Cronotipo | Dias de Trabalho (=7)

CONSIDERE OS DIAS DE ESTUDO COMO DIAS DE TRABALHO

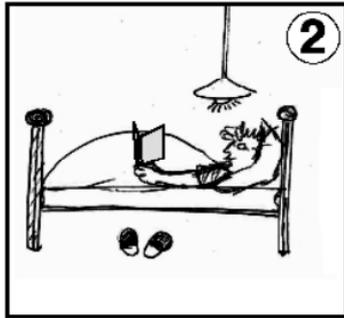
Nos dias de trabalho (incluindo a noite anterior ao primeiro dia de trabalho):



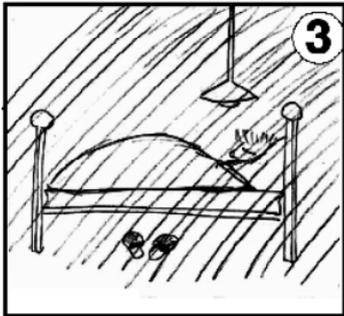
29. (Figura 1) Vou para a cama às _____ horas *

Utilize a escala das 24 horas (e.g. 18:00 em vez de 06:00 PM).

Exemplo: 08h30



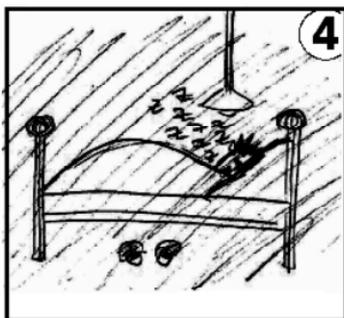
(Figura 2) Algumas pessoas permanecem algum tempo acordadas depois de se deitar!



30. (Figura 3) Às _____ horas, estou pronto para dormir *

Utilize a escala das 24 horas (e.g. 18:00 em vez de 06:00 PM). Verifique se o horário é POSTERIOR aos horários assinalados anteriormente.

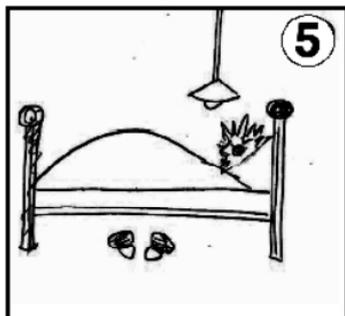
Exemplo: 08h30



31. (Figura 4) Necessito de _____ minutos para adormecer *

A resposta desta questão deve ser uma DURAÇÃO, não um horário (e.g. 00:20:00 → 20 minutos).

Exemplo: 4:03:32 (4 horas, 3 minutos, 32 segundos)



32. (Figura 5) Acordo às _____ horas *

Utilize a escala das 24 horas (e.g. 18:00 em vez de 06:00 PM). Verifique se o horário é POSTERIOR aos horários assinalados anteriormente.

Exemplo: 08h30

33. Marcar apenas uma oval.

Opção 1



34. (Figura 6) Passados _____ minutos, levanto-me *

A resposta desta questão deve ser uma DURAÇÃO, não um horário (e.g. 00:20:00 -> 20 minutos).

Exemplo: 4:03:32 (4 horas, 3 minutos, 32 segundos)

35. Você usa um despertador nos dias de trabalho? *

Marcar apenas uma oval.

- Sim
 Não

36. Se responder "SIM" na questão anterior, você acorda regularmente ANTES do alarme tocar? *

Marcar apenas uma oval.

- Sim
 Não

37. Em média, quanto tempo por dia você passa exposto à luz do dia (ao ar livre) nos dias de trabalho? *

Considere tempo de exposição à luz como, por exemplo, caminhada da sua residência ao ponto de ônibus, dentre outros. A resposta desta questão deve ser uma DURAÇÃO, não um horário (e.g. 00:20:00 -> 20 minutos).

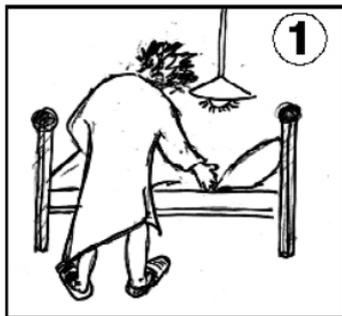
Exemplo: 4:03:32 (4 horas, 3 minutos, 32 segundos)

Pular para a pergunta 54

Questionário de Cronotipo | Dias de Trabalho (<7)

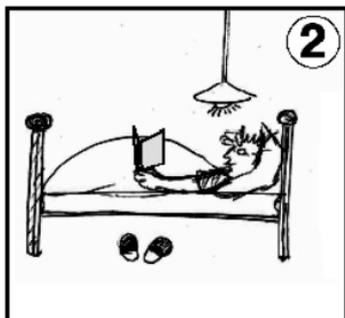
CONSIDERE OS DIAS DE ESTUDO COMO DIAS DE TRABALHO

Nos dias de trabalho (incluindo a noite anterior ao primeiro dia de trabalho):

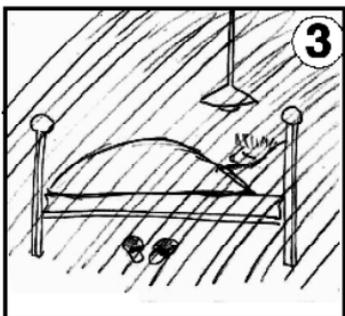


38. (Figura 1) Vou para a cama às _____ horas *
Utilize a escala das 24 horas (e.g. 18:00 em vez de 06:00 PM).

Exemplo: 08h30

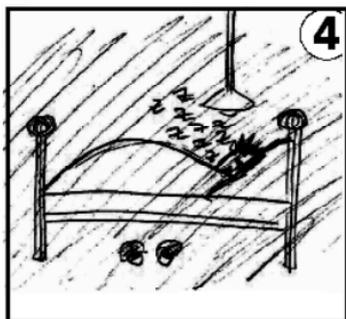


- (Figura 2) Algumas pessoas permanecem algum tempo acordadas depois de se deitar!



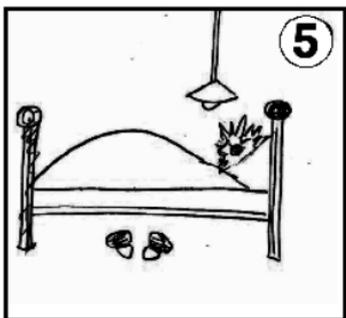
39. (Figura 3) Às _____ horas, estou pronto para dormir *
Utilize a escala das 24 horas (e.g. 18:00 em vez de 06:00 PM). Verifique se o horário é POSTERIOR aos horários assinalados anteriormente.

Exemplo: 08h30



40. (Figura 4) Necessito de _____ minutos para adormecer *
 A resposta desta questão deve ser uma DURAÇÃO, não um horário (e.g. 00:20:00 -> 20 minutos).

Exemplo: 4:03:32 (4 horas, 3 minutos, 32 segundos)



41. (Figura 5) Acordo às _____ horas *
 Utilize a escala das 24 horas (e.g. 18:00 em vez de 06:00 PM). Verifique se o horário é POSTERIOR aos horários assinalados anteriormente.

Exemplo: 08h30



42. (Figura 6) Passados _____ minutos, levanto-me *

A resposta desta questão deve ser uma DURAÇÃO, não um horário (e.g. 00:20:00 -> 20 minutos).

Exemplo: 4:03:32 (4 horas, 3 minutos, 32 segundos)

43. Você usa um despertador nos dias de trabalho? *

Marcar apenas uma oval.

- Sim
 Não

44. Se responder "SIM" na questão anterior, você acorda regularmente ANTES do alarme tocar? *

Marcar apenas uma oval.

- Sim
 Não

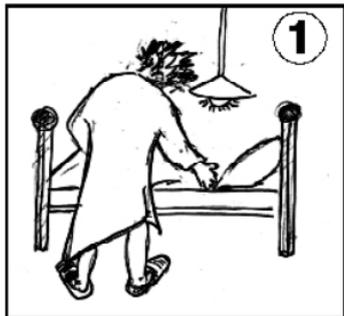
45. Em média, quanto tempo por dia você passa exposto à luz do dia (ao ar livre) nos dias de trabalho? *

Considere tempo de exposição à luz como, por exemplo, caminhada da sua residência ao ponto de ônibus, dentre outros. A resposta desta questão deve ser uma DURAÇÃO, não um horário (e.g. 00:20:00 -> 20 minutos).

Exemplo: 4:03:32 (4 horas, 3 minutos, 32 segundos)

Questionário de Cronotipo | Dias Livres

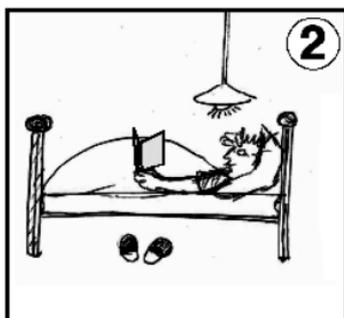
Fora dos dias de trabalho (incluindo a noite anterior ao primeiro dia de descanso ou lazer):



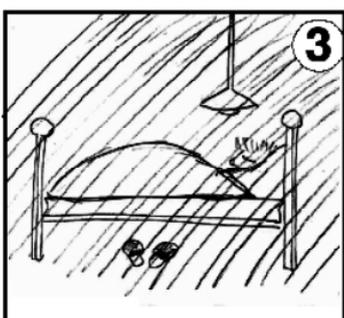
46. (Figura 1) Vou para a cama às _____ horas *

Utilize a escala das 24 horas (e.g. 18:00 em vez de 06:00 PM). Verifique se o horário é POSTERIOR aos horários assinalados anteriormente.

Exemplo: 08h30



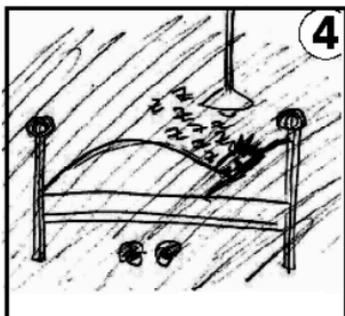
(Figura 2) Algumas pessoas permanecem algum tempo acordadas depois de se deitar!



47. (Figura 3) Às _____ horas, estou pronto para dormir *

Utilize a escala das 24 horas (e.g. 18:00 em vez de 06:00 PM). Verifique se o horário é POSTERIOR aos horários assinalados anteriormente.

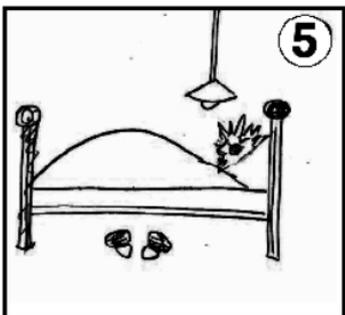
Exemplo: 08h30



48. (Figura 4) Necessito de _____ minutos para adormecer *

A resposta desta questão deve ser uma DURAÇÃO, não um horário (e.g. 00:20:00 -> 20 minutos).

Exemplo: 4:03:32 (4 horas, 3 minutos, 32 segundos)



49. (Figura 5) Acordo às _____ horas *

Utilize a escala das 24 horas (e.g. 18:00 em vez de 06:00 PM). Verifique se o horário é POSTERIOR aos horários assinalados anteriormente.

Exemplo: 08h30



50. (Figura 6) Passados _____ minutos, levanto-me *

A resposta desta questão deve ser uma DURAÇÃO, não um horário (e.g. 00:20:00 -> 20 minutos).

Exemplo: 4:03:32 (4 horas, 3 minutos, 32 segundos)

51. Os horários que mencionou acima são dependentes do despertador mesmo fora dos dias de trabalho? *

Marcar apenas uma oval.

- Sim
 Não

52. Há uma razão pela qual você não possa escolher livremente os seus horários de sono fora dos dias de trabalho?

Responda esta questão somente se aplicável.

Marcar apenas uma oval.

- Criança ou animal doméstico
 Hobbies
 Outro: _____

53. Em média, quanto tempo por dia você passa exposto à luz do dia (ao ar livre) fora dos dias de trabalho? *

Considere tempo de exposição à luz como, por exemplo, caminhada da sua residência ao ponto de ônibus, dentre outros. A resposta desta questão deve ser uma DURAÇÃO, não um horário (e.g. 00:20:00 -> 20 minutos).

Exemplo: 4:03:32 (4 horas, 3 minutos, 32 segundos)

Comentários

Muito obrigado por participar de nossa pesquisa!

Por favor, não se esqueça de enviar o formulário

54. Você aceita que entremos em contato para a próxima etapa do estudo? *

Marcar apenas uma oval.

Sim

Não

55. Caso queira fazer algum apontamento, utilize o campo abaixo

Este conteúdo não foi criado nem aprovado pelo Google.

Google Formulários

Anexo 3. Protocolo laboratorial para purificação de DNA a partir da amostra de saliva.

prepIT[®]•L2P

Laboratory protocol for manual purification of DNA from 0.5 mL using a deep 96-well plate

Ethanol precipitation protocol and prepIT[®]•L2P reagent for the purification of genomic DNA from the Oragene[®] and ORAcollect[®] families of collection kits.

Visit our website at www.dnagenotek.com for any additional languages and protocols.

The following step-by-step protocol describes how to purify 500 µL aliquots of multiple samples simultaneously using a deep 96-well plate.

Reagents included

- prepIT[®]•L2P (catalog #: PT-L2P)

Equipment and reagents

- Plates and covers - deep 96-well (round) plates (e.g., Axygen Cat. No. P-DW-20-C) with 96-well reusable mat or adhesive cover sheet (e.g., Axygen Cat. No. AM-2ML-RD-IMP)
- Centrifuge with bucket to accommodate 96-well plates. Capable of a minimum of 3,500 x g. (e.g., Sorvall centrifuge model RT 6000D with PN 11093 96-well plate adapter)
- -20°C freezer
- Blue Dextran (1 mg/mL) (Sigma-Aldrich Cat. No. D5751)
- Isopropanol at room temperature
- 70% ethanol at room temperature
- DNA storage buffer: TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0)
- 8- or 12-channel pipettor (optional)

Procedure

Purification steps	Notes
1. Mix the sample in the DNA Genotek kit by inversion and gentle shaking for a few seconds.	<ul style="list-style-type: none"> • This is to ensure that viscous samples are properly mixed.
2. Incubate the sample at 50°C in a water incubator for a minimum of 1 hour or in an air incubator for a minimum of 2 hours. Note: The use of an air incubator may be preferable since the sample tubes may float in a water bath. If a water bath must be used, ensure the sample-containing portion of the tube remains immersed in water.	<ul style="list-style-type: none"> • This heat-treatment step is essential to ensure that DNA is adequately released and that nucleases are permanently inactivated. • This incubation step may be performed at any time after sample is collected and before it is purified. • The entire sample must be incubated in the original collection tube before aliquoting to ensure sample homogeneity. • The sample may be incubated at 50°C overnight if it is more convenient. • A longer time is required in an air incubator because temperature equilibration is slower than in a water incubator.
3. Add 20 µL of PT-L2P to each well of the plate.	
4. Transfer 5 µL of Blue Dextran (1 mg/mL) to each well of the plate.	<ul style="list-style-type: none"> • Blue Dextran helps to make the DNA pellet more visible during the DNA precipitation step.

Purification steps	Notes
5. Transfer 500 μ L of sample to each well.	
6. Cover plate with adhesive cover sheet or reusable mat. Press into place to seal. Mix manually by inversion 5 times.	<ul style="list-style-type: none"> • Ensure a firm seal for each well. • The sample will become turbid as impurities and inhibitors are precipitated.
7. Incubate at -20°C for 10 minutes.	
8. Centrifuge plate at room temperature for 10 minutes at $4,200 \times g$.	<ul style="list-style-type: none"> • It is recommended that all centrifugation steps in the protocol be performed at $4,200 \times g$. However, if centrifuge is incapable of $4,200 \times g$ a minimum of $3,500 \times g$ is acceptable.
9. During centrifugation, label a second 96-well plate.	
10. When centrifuge has stopped, transfer 450 μ L of the supernatant from the first plate to the second plate. Take care not to disrupt the pellet.	<ul style="list-style-type: none"> • The pellet contains turbid impurities. Discard plate containing pellets once supernatant is transferred.
11. To the new plate containing supernatant add 350 μ L of Isopropanol (room temperature) to each well.	
12. Cover plate with adhesive cover sheet or reusable mat. Press into place to seal. Mix manually by slowly inverting 10 times. Incubate at room temperature for 10 minutes.	<ul style="list-style-type: none"> • During mixing with isopropanol, the DNA will be precipitated. This may appear as a clot of DNA fibers or as a fine precipitate, depending upon the amount of DNA in the sample. • Even if no clot is seen, DNA will be recovered by carefully following the next steps.
13. Centrifuge plate at room temperature for 10 minutes at $4,200 \times g$.	
14. Carefully remove as much supernatant as possible from each well without disturbing the pellet. Discard the supernatant.	<ul style="list-style-type: none"> • This step should be done with a single-tip pipette to avoid disturbing the pellet. Some pellets may be stuck to the side of the well, take care not to remove them with the pipette. • This pellet contains DNA. Loss of the pellet will result in loss of DNA.
15. Add 400 μ L of 70% ethanol (room temperature) to each well.	<ul style="list-style-type: none"> • Take care not to disturb the DNA pellet. • The DNA pellet may be small. • The 70% ethanol wash helps to remove residual inhibitors.
16. Cover plate with adhesive cover sheet or reusable mat. Press into place to seal. Mix by vigorous vortexing.	

Purification steps	Notes
17. Centrifuge plate at room temperature for 10 minutes at 4,200 x g.	
18. Carefully remove ALL of the supernatant from each well without disturbing the pellet. Discard the supernatant.	<ul style="list-style-type: none"> To avoid disturbing the pellet the use of a single-channel pipette is recommended for this step. It is important to remove all ethanol from the sample. Carryover of ethanol may impact the performance of the assay.
19. The plate should be pulsed centrifuged for 20 seconds to collect any left over ethanol.	
20. Using a pipette carefully remove ALL residual ethanol and air-dry the plate for 5 minutes.	<ul style="list-style-type: none"> To avoid disturbing the pellet the use of a single-channel pipette is recommended for this step.
21. Add 50-100 μ L of TE buffer to each well and cover plate with adhesive cover sheet or reusable mat.	
22. Vortex vigorously to ensure any pellet on the side of the well is dislodged and re-hydrated. Place the plate on a shaker or rocker to help fully re-hydrate the DNA pellet overnight.	<ul style="list-style-type: none"> To increase the rate of DNA hydration and maximize recovery the sample may be incubated for 1 hour at 50°C with occasional vortexing.
23. Options for storage of the fully rehydrated DNA: <ol style="list-style-type: none"> Recommended in TE, in aliquots at -20°C for long-term storage, or In TE at 4°C for up to 2 months. 	<ul style="list-style-type: none"> Freezing of purified DNA in TE will cause DNA to precipitate. When thawing a sample of frozen purified DNA follow the heating instructions from the note in step 22 to ensure complete re-hydration.

Quantification of DNA

By fluorescence method

Assays that use fluorescent dyes are more specific than absorbance at 260 nm for quantifying the amount of double-stranded DNA (dsDNA) in a DNA sample. We recommend using fluorescent dyes such as PicoGreen® or SYBR® Green I to quantify dsDNA since there is less interference by contaminating RNA. An inexpensive protocol using SYBR Green I is described in PD-PR-075, *DNA quantification using SYBR Green I Dye and a micro-plate reader*¹. Alternatively, commercially available kits such as Invitrogen's Quant-iT™ PicoGreen dsDNA Assay Kit (Cat. No. Q-33130) can be used. For either protocol, we recommend that the purified DNA be diluted 1:50 with TE solution and that 5 μ L be used in the quantification assay.

By absorbance method

If you choose to quantify DNA by absorbance, we recommend that you first treat the purified sample with RNase to digest contaminating RNA and then remove the RNA fragments by ethanol precipitation of the DNA. A detailed protocol is described in PD-PR-040, *RNA removal by double-RNase digestion*². Please note that DNA from an oral sample typically contains appreciably more RNA than found in blood samples. Ensure that alcohol-precipitated DNA is fully dissolved before reading the absorbance.

Conversion factor: An absorbance of 1.0 at 260 nm corresponds to a concentration of 50 ng/ μ L (50 μ g/mL) for pure dsDNA.

Ensure that absorbance values are within the linear range of the spectrophotometer. Re-dilute and re-measure samples that fall outside of the linear range. See your instrument documentation for more information.

Method:

1. Dilute a 10 μ L aliquot of purified RNase-treated DNA with 90 μ L of TE (1/10 dilution). Mix by gently pipetting up and down. Wait for bubbles to clear.
2. Use TE in the reference (blank) cell.
3. Measure absorbance at 320 nm, 280 nm and 260 nm.
4. Calculate corrected A_{280} and A_{260} values by subtracting the absorbance at 320 nm (A_{320}) from the A_{280} and A_{260} values.
5. DNA concentration in ng/ μ L = corrected $A_{260} \times 10$ (dilution factor) \times 50 (conversion factor).
6. A_{260}/A_{280} ratio: Divide corrected A_{260} by corrected A_{280} .

Example

1. Assume the measured $A_{320}= 0.025$, $A_{280}= 0.175$ and $A_{260}= 0.295$
2. The DNA concentration of the undiluted sample will be:
 $(A_{260} - A_{320}) \times 10$ [dilution factor] \times 50 [conversion factor]
 $= (0.295 - 0.025) \times 10 \times 50$
 $= 0.270 \times 10 \times 50$
 $= 135 \text{ ng}/\mu\text{L}$ or 135 $\mu\text{g}/\text{mL}$
3. The corrected A_{260}/A_{280} ratio will be:
 $(A_{260} - A_{320}) \div (A_{280} - A_{320})$
 $= (0.295 - 0.025) \div (0.175 - 0.025)$
 $= 0.270 \div 0.150$
 $= 1.80$

References

- ¹ DNA quantification using the Fluorescence/DNase (F/D) assay. Replaced by DNA quantification using SYBR Green I dye and a micro-plate reader. DNA Genotek, PD-PR-075.
- ² RNA removal by double-RNase digestion. DNA Genotek, PD-PR-040.

Technical support is available Monday to Friday (9h00 to 17h00 EST):

- Toll-free (North America): 1.866.813.6354, option 6
- All other countries: 613.723.5757, option 6
- Email: support@dnagenotek.com

OraGene®DNA and ORAcollect®DNA are not available for sale in the United States.

OraGene®DISCOVER is for research use only, not for use in diagnostic procedures.
 Some DNA Genotek products may not be available in all geographic regions.

*OraGene, prepliT and ORAcollect are registered trademarks of DNA Genotek Inc. All other brands and names contained herein are the property of their respective owners.
 All DNA Genotek protocols, white papers and application notes, are available in the support section of our website at www.dnagenotek.com.

Anexo 4. Protocolo laboratorial para a genotipagem do polimorfismo VNTR do gene *PER3*.

PROTÓCOLOS LABORATORIAIS PARA GENOTIPAGEM DO POLIMORFISMO VNTR DO GENE *PER3*

REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

Protocolo: adaptado de GoTaq® Green Master Mix (PROMEGA) por Pedrazzoli, M. e Viana Mendes, J.

Ano: 2019.

- 1) Para um volume final de 12,5 µL, a reação deve contar os seguintes reagentes:

Reagentes	Volume para 1 reação	Volume para <i>y</i> reações
GoTaq® Green Master Mix, 2X	6,25µL	6,25 x <i>y</i>
<i>upstream primer</i> , 10mM	1µL	1 x <i>y</i>
<i>downstream primer</i> , 10mM	1µL	1 x <i>y</i>
DNA molde purificado	1µL	----
Água ultrapura (tipo I)	3,25µL	3,25 x <i>y</i>
TOTAL	12,5µL	----

- 2) Retire o *mix* e as alíquotas dos *primers* do *freezer* e espere alguns minutos para o descongelamento total.
- 3) Homogenize o *mix*, as alíquotas dos *primers* e o DNA molde purificado no vórtex, por 15 segundos.
- 4) Em um isopor com gelo, coloque o *mix*, as alíquotas dos *primers* e o DNA molde purificado para que os reagentes sejam mantidos refrigerados.

- 5) Caso o objetivo seja amplificar o DNA de y amostras, faça a solução de reação em um microtubo de 1,5mL, multiplicando o volume de todos os reagentes (**com exceção do DNA molde purificado**) por y (conforme a tabela acima).
- 6) Homogenize a solução de reação no vórtex, por 15 segundos.
- 7) Separe a solução em alíquotas; utilize microtubos de 0,2mL previamente rotulados. Em seguida, adicione 1 μ L do DNA molde purificado em cada microtubo.
- 8) Coloque todos os microtubos de 0,2mL na mini-centrífuga por 5 segundos, para garantir que toda a solução esteja localizada no fundo de tais microtubos.
- 9) Leve os microtubos de 0,2mL contendo a PCR para o termociclador e configure esse último de acordo com o perfil térmico adequado à sequência nucleotídica alvo e à sequência de *primers* utilizada:

SEGMENTO	ETAPA	TEMPERATURA	TEMPO	CICLOS
#1	Desnaturação inicial	95°C	3 minutos	1
#2 (3 steps)	Desnaturação	94°C	45 segundos	38
	Anelamento	57°C	45 segundos	
	Extensão	72°C	1 minuto	
#3	Extensão final	72°C	5 minutos	1
#4	<i>Hold</i>	4°C	<i>Forever</i>	—

- 10) Armazene os produtos da PCR em geladeira, a 4°C.

ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

Protocolo: por Pedrazzoli, M. e Viana Mendes, J.

Ano: 2019.

Gel de agarose 2%:

- 2g de agarose;
- 100mL de 1X TBE (Tris-Borato-EDTA);
- 5 μ L de brometo de etídio (EtBr);
- 2 μ L de produto da PCR;
- 2 μ L de 5X Green GoTaq® Flexi Buffer.

Preparo:

- 1) Em um béquer de vidro (volume: 250mL), misture 2g de agarose com 100mL de 1X TBE. Homogeneize, com um bastão de vidro, o máximo possível.
- 2) Leve o béquer de vidro contendo a mistura a um micro-ondas. Aqueça por 30s e, em seguida, homogenize a solução com um bastão de vidro. Aqueça por mais 5s e homogenize novamente. O ideal é que toda a agarose tenha se dissolvido no tampão, resultando em uma solução incolor. Se necessário, reaqueça até a solução alcançar esse ponto.
- 3) Espere alguns minutos para que a solução presente no béquer esfrie até, aproximadamente, 50°C e adicione 5 μ L de EtBr. Homogenize a solução.
- 4) Despeje, cuidadosamente, a solução no suporte ("cama" do gel) de eletroforese. Verifique se há presença de bolhas. Em caso positivo, remova-as com uma ponteira autoclavada.
- 5) Coloque o pente com o número de poços desejado. Espere a solução se solidificar ao ponto de uma gelatina e, em seguida, retire o pente cuidadosamente.

- 6) Encaixe a “cama” do gel na cuba eletroforética. Preencha tal cuba, até o volume indicado, com 1X TBE.

Corrida eletroforética:

- 1) Cole um filme de parafina plástica na bancada devidamente higienizada e pipete, lado a lado, 2 μ L de 5X Green GoTaq® Flexi Buffer. O número de vezes que o processo deve ser repetido dependerá de quantos poços serão utilizados no gel. Exemplo: visualização de 10 amostras diferentes. Então, deve-se pipetar 2 μ L de 5X Green GoTaq® Flexi Buffer 10 vezes no filme de parafina.
- 2) Em cada 2 μ L de 5X Green GoTaq® Flexi Buffer, adicione 2 μ L de produto da PCR. Homogenize com a pipeta e transfira a mistura para o poço no gel de agarose 2%. Repita o processo até atingir o número de amostras desejado.
- 3) Tampe a cuba e programe a fonte eletroforética:
 - 90V;
 - 1,5A;
 - 50 minutos.

Visualização dos amplicons e fotodocumentação:

- 1) Retire, cuidadosamente, o gel de agarose 2% da cuba eletroforética e coloque-o na bandeja do fotodocumentador.
- 2) Programe o fotodocumentador:
 - Luz: UV (595nm);
 - Tempo de exposição: 9 segundos;
 - Ajuste o brilho do equipamento, de forma que a melhor visualização do gel seja alcançada.
- 3) Salve em um *pen drive* duas versões da imagem visualizada: a imagem negativa e a imagem positiva.

Anexo 5. Devolutiva referente ao período no qual o voluntário utilizou o actígrafo de punho.



São Paulo, 12 de maio de 2021.

Voluntário (a): XXXXXXXXXX XXXX XXXXXXXX (kit de saliva: 01187)

Genótipo (polimorfismo VNTR do gene PER3): **HOMOZIGOTO 5/5**

RELATÓRIO DE ACTIMETRIA

Os resultados descritos a seguir se referem ao período em que o actímetro foi utilizado. O registro foi feito durante 15 dias, entre 17/04/2021 e 02/05/2021.

- O horário médio do início do sono foi 01:10, variando entre 00:03 e 02:23.
- O horário médio de acordar foi 08:16, variando entre 06:58 e 10:24.
- A média do tempo total de sono foi de 06h34min, variando entre 05h32min e 07h45min.
- A média do tempo acordado depois que dormiu foi de 27min, variando entre 06min e 51min.
- A média do número de despertares após o início de sono foi de 8, variando entre 2 e 15.

GRAFIA DO SONO

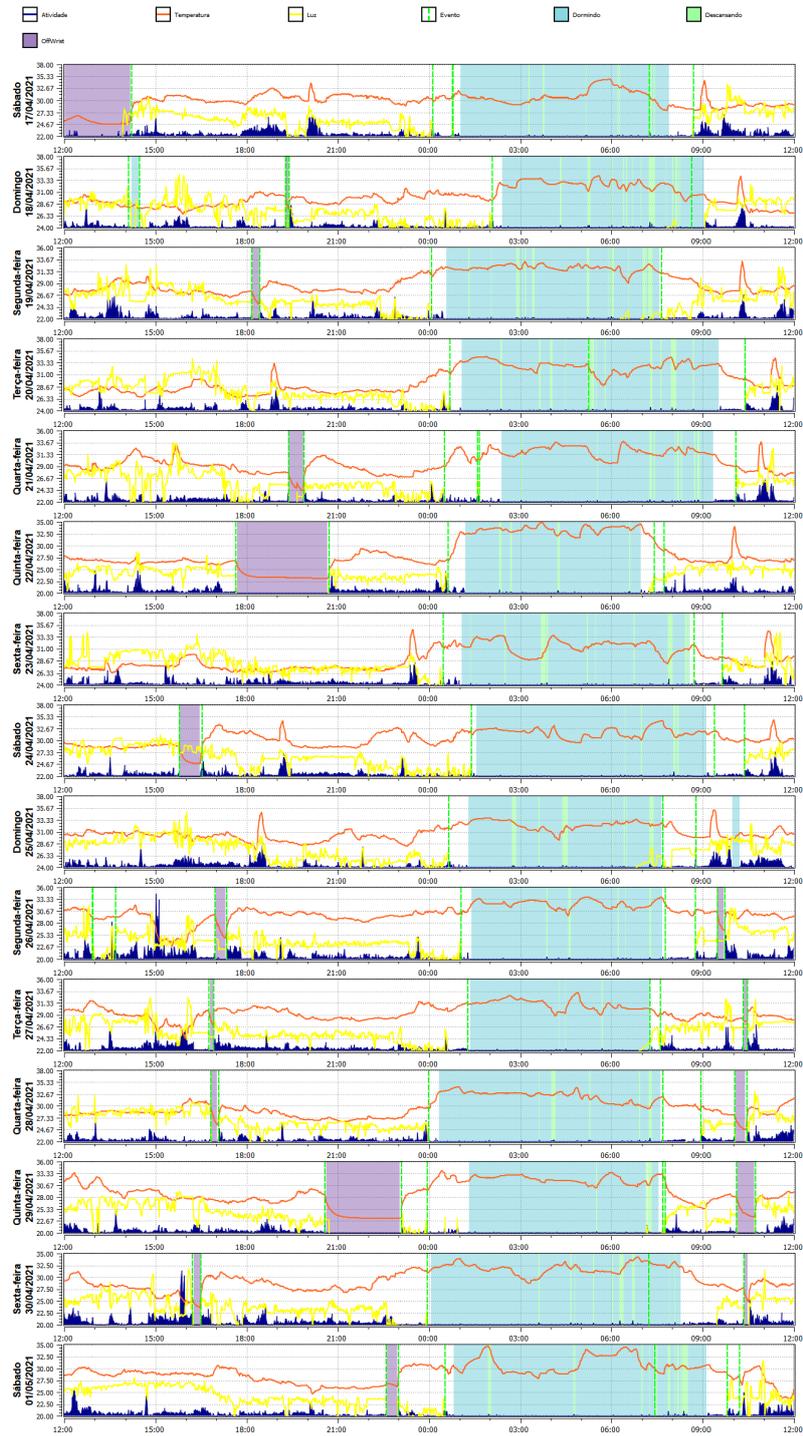
A figura abaixo se refere à grafia do sono.

- a. Cada retângulo se refere a um período de 24h, começando às 12h de um dia e terminando às 12h do dia seguinte.
- b. As barras verticais em **azul escuro** se referem à sua atividade diária, ou seja, quando você estava acordado (a).
- c. A **linha amarela** demonstra o quanto você se expôs à luz ambiente, seja iluminação solar ou elétrica.
- d. A **linha vermelha** se refere à temperatura periférica do seu corpo, mensurada a partir do seu punho.
- e. O **intervalo azul claro** se refere ao período em que você estava dormindo.
- f. Os **pequenos intervalos em verde claro** se referem aos curtos despertares que você teve ao longo de um episódio de sono.
- g. O **intervalo roxo** se refere ao período em que você não estava utilizando o actímetro.
- h. A **linha vertical verde e tracejada** indica quando você apertou o botão de eventos (botão azul).

Grupo Interdisciplinar de Pesquisa em Sono (GIPSO)

Escola de Artes, Ciências e Humanidades (EACH) da Universidade de São Paulo (USP)

each.usp.br/gipso | gipso-each@usp.br





RESPONSÁVEIS PELO PROJETO:

Prof. Dr. Mario Pedrazzoli Neto (<http://lattes.cnpq.br/1423676413208650>)

Prof. Dra. Ana Amélia Benedito-Silva (<http://lattes.cnpq.br/0827495526048435>)

Mestranda Juliana Viana Mendes (<http://lattes.cnpq.br/8649349595594525>)