



UNIVERSIDADE FEDERAL DO DELTA DO PARNAÍBA
CAMPUS MINISTRO REIS VELOSO
CURSO DE BACHARELADO EM BIOMEDICINA

HINAIRA BRUNNA GOMES CAVALCANTE

**ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO *HTR2A* -1438A/G (RS6311)
COM A PREFERÊNCIA MATUTINA-VESPERTINA EM UMA POPULAÇÃO DE
INDIVÍDUOS JOVENS.**

PARNAÍBA - PI
2023

HINAIRA BRUNNA GOMES CAVALCANTE

**ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO *HTR2A* -1438A/G (RS6311)
COM A PREFERÊNCIA MATUTINA-VESPERTINA EM UMA POPULAÇÃO DE
INDIVÍDUOS JOVENS.**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Universidade Federal do
Delta do Parnaíba - UFDPAr, como
requisito obrigatório para obtenção do
título de Bacharel em Biomedicina.

Orientadora: Profa. Dra. France Keiko
Nascimento Yoshioka
Coorientador: B. Sc Romério de Oliveira
Lima Filho.

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Delta do Parnaíba
Biblioteca Central Prof. Cândido Athayde
Serviço de Processamento Técnico

C376a Cavalcante, Hinaira Brunna Gomes
Associação do polimorfismo HTR2A – 1438A/G (RS6311) com a
preferência matutina-vespertina em uma população de indivíduos jovens
[recurso eletrônico] Hinaira Brunna Gomes Cavalcante. – 2023.

1 Arquivo em PDF.

Dissertação (Bacharelado em Biomedicina) – Universidade Federal do
Delta do Parnaíba, 2023.

Orientação: Prof.^a. Dra France Keiko Nascimento Yoshioka

1. Cronotipo. 2. Polimorfismo genético. 3. Receptor de Serotonina. I.
Título.

CDD: 610

HINAIRA BRUNNA GOMES CAVALCANTE

**ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO *HTR2A* -1438A/G (RS6311)
COM A PREFERÊNCIA MATUTINA-VESPERTINA EM UMA POPULAÇÃO DE
INDIVÍDUOS JOVENS.**

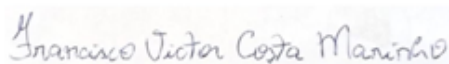
Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade Federal do Delta do Parnaíba - UFDPAr, como requisito obrigatório para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Parnaíba-PI, 22 de agosto de 2023.

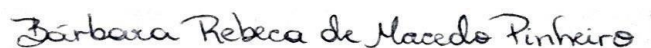
Banca Examinadora



Profa. Dra. France Keiko Nascimento Yoshioka
(Presidente)



Francisco Victor Costa Marinho
(Avaliador 1)



Bárbara Rebeca de Macedo Pinheiro
(Avaliador 2)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me permitido viver a realização desse sonho que não é só meu, é também dos meus pais Ricardo e Rosiany, os quais dediquei o meu diploma como fruto de todo apoio, investimento, carinho e amor recebido durante todos os dias de minha vida. Aos meus irmãos Érika e Rick, serei eternamente grata pela confiança depositada onde nem eu mesma saberia que poderia ter, vocês são a base de tudo que construí até aqui.

Minha eterna gratidão aos meus familiares em especial ao meu avô Elmo, avó Francina, avó Rosa e ao meu avô José (*in memoriam*). Aos meus sobrinhos Luís Guilherme e Maria Luna, e a cunhada/amiga Maria que foram meu incentivo final para concluir esse ciclo e voltar para casa. Agradeço também aos tios, tias, a minha prima Lara em nomes de todos os primos e primas pela torcida para chegada desse momento aguardado com alegria para nossa família. Ao meu amigo Glauber por ter permanecido e fortalecido a nossa amizade.

Aos colegas e amigos que Parnaíba me presenteou, aqui destaco Gabi, Adrielly, Rita, Andressa, Fernando, Rubens, Raíssa, Samara e Paulo. Aos demais que passaram pela turma, minha gratidão pelas boas recordações aqui adquiridas e desejo de que todos tenham um futuro de sucesso.

Agradeço a UFDPa instituição em que realizei esse sonho.

Meus agradecimentos a LIAGEN e ao grupo de pesquisa GEHMED que fizeram da minha curiosidade pela genética se tornarem vivências incríveis, assim como conhecer pessoas que estarão sempre em boas lembranças, em especial a minha dupla de IC Ivã, e parceiros Romério, John, Victor, Bárbara, Marina, Bianca e José pelos perrengues e conhecimento compartilhados. Minha gratidão aos queridos professores Keiko, Giovany, Renata, Loredana, Fábio, Thomaz, Thiago, Anna, Gustavo, Amanda e Aldenora pelo conhecimento repassado e pelo exemplo de excelentes profissionais que são. Serei eternamente grata pelos auxílios que me mantiveram aqui, assim como a FAPEPI fundação a qual disponibilizou a minha bolsa de Iniciação Científica.

Agradeço também a cada membro das gestões de representatividade estudantil em que tive o privilégio de fazer parte como presidente da Avanço Biomed do CABIOMED, e secretária da gestão Sem Temer! É tudo pra ontem do DCE — Marielle Franco. Agradeço aos servidores exemplares do Laboratório Escola, local em que realizei o estágio e tive os meus primeiros pacientes e muito aprendizado adquirido.

Agradeço as boas pessoas que conheci ao longo desses anos, foram muitas, mas acredito que para cada uma delas, eu pude ou desejei ser uma boa pessoa a qual me renderam muitos aprendizados que me tornaram a pessoa que sou hoje, e ainda assim mantendo meus princípios, caráter e valores que levarei pra toda vida. Sou grata a mim por ter realizado esse sonho, que apesar da pouca confiança em mim mesma, não desisti e me fortaleci na fé e nas pessoas que me amam para alcançar o objetivo final.

RESUMO

A preferência circadiana de um indivíduo, também chamada de cronotipo é uma característica fenotípica que reflete o turno do seu dia com maior nível de atividade e desempenho de tarefas. Atualmente, existem diferentes métodos e escalas que auxiliam na classificação de pessoas “matutinas” ou “vespertinas”. Sugere-se que os cronotipos humanos podem sofrer influência de fatores endógenos como, o ritmo da temperatura corporal, secreção hormonal e mecanismos genéticos, assim como fatores exógenos como, o ciclo diário claro/escuro (dia/noite) e fatores sociais. O neurotransmissor serotonina é reconhecido por seu importante papel ligado à regulação do ritmo circadiano, uma vez que alterações presentes no ciclo do sono podem ser associadas a fatores como o estresse e a mudanças no estado de humor do indivíduo. Dentre os genes envolvidos no metabolismo da serotonina, o polimorfismo *HTR2A* -1438A/G (rs6311), no gene *HTR2A*, foi o foco deste estudo devido seu destaque por estar associado à suscetibilidade a distúrbios psiquiátricos. Dada a relevância da serotonina, estudos acerca de sua influência sobre o ciclo circadiano, principalmente sobre os cronotipos, podem elucidar o quanto essas variações genotípicas podem influenciar no comportamento. Assim, o presente trabalho tem o propósito de investigar qual a relação do polimorfismo rs6311 com a preferência matutina-vespertina em uma população de indivíduos jovens. Para isso foram coletados dados de 161 voluntários, do sexo masculino, com idade de 18 a 32 anos. Para análise do polimorfismo, realizou-se a extração de DNA de sangue periférico e posterior genotipagem por PCR-RFLP. Para a coleta dos dados dos cronotipos foi utilizado o Questionário para Identificação de Indivíduos Matutinos e Vespertinos de Horne e Ostberg (1976) - MEQ, um instrumento utilizado na área da neurociência e em estudos com o ciclo circadiano. Os dados foram analisados a partir dos testes estatísticos: Qui-quadrado (χ^2) para associação do genótipo e cronotipo; e ANOVA *one-way* para análise das variâncias das médias das pontuações em relação aos cronotipos por genótipo. Os resultados mostraram que o polimorfismo estudado de forma isolada não influenciou sobre a preferência matutina ou vespertina dos indivíduos, devido o cronotipo ser um fenótipo complexo e que sua determinação cabe a análise para além de fatores genéticos, como considerar também o estado fisiológico, idade, gênero e fatores ambientais concernentes ao indivíduo. Contribuindo com os estudos seguintes de associação entre demais polimorfismos desse gene, que se mostra com grande potencial, visto que ele pode apresentar uma relação e contribuição na modelagem do fenótipo matutino- vespertino.

Palavras-chave: Cronotipo; polimorfismo genético; receptor de serotonina.

ABSTRACT

An individual's circadian preference, also called chronotype, is a phenotypic characteristic that reflects the time of day with the highest level of activity and task performance. Currently, there are different methods and scales that help classify people as "morning" or "evening". It is suggested that human chronotypes may be influenced by endogenous factors such as the rhythm of body temperature, hormone secretion and genetic mechanisms, as well as exogenous factors such as the daily light/dark cycle (day/night) and social factors. The neurotransmitter serotonin is recognized for its important role in regulating the circadian rhythm, since alterations present in the sleep cycle can be associated with factors such as stress and changes in the individual's mood. Among the genes involved in serotonin metabolism, the rs6311 (-1438G/A) polymorphism in the HTR2A gene was the focus of this study due to its importance for being associated with susceptibility to psychiatric disorders. Given the relevance of serotonin, studies about its influence on the circadian cycle, mainly on chronotypes, can elucidate how much these genotypic variations can influence behavior. Thus, the present work aims to investigate the relationship between the rs6311 polymorphism and the morning-evening preference in one of the populations of young individuals. For this, data were collected from 161 male volunteers, aged between 18 and 32 years. To analyze the polymorphism, DNA was extracted from peripheral blood and subsequent genotyping by PCR-RFLP. For the collection of chronotype data, Horne and Ostberg's Questionnaire for the Identification of Morning and Evening Individuals (1976) - MEQ, an instrument used in the area of neuroscience and in studies with the circadian cycle, was used. Data were analyzed using the following statistical tests: Chi-square for association between genotype and chronotype; and one-way ANOVA for analysis of variances of mean scores in relation to chronotypes per genotype. The results showed that the polymorphism studied in isolation did not influence the morning or afternoon preference of the individuals, due to the chronotype being a complex phenotype and that its determination is up to analysis beyond genetic factors, such as also considering the physiological state, age, gender and environmental factors concerning the individual. Contributing to the following association studies between other polymorphisms of this gene, which shows great potential, since it can present a relationship and contribution in modeling the morning-evening phenotype.

Keywords: Chronotype; genetic polymorphism; serotonin receptor.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

FIGURA 1 -	Sistema de temporização circadiana.....	09
FIGURA 2 -	Biossíntese da serotonina.....	12
FIGURA 3 -	Liberação da serotonina no SNC originado nos núcleos da rafe	13
FIGURA 4 -	Receptores da serotonina.....	14
FIGURA 5 -	Localização do gene <i>HTR2A</i> no cromossomo 13.....	17
FIGURA 6 -	Padrão de bandas esperadas para o polimorfismo <i>HTR2A</i> -1438A/G (rs6311).....	23
FIGURA 7 -	Genotipagem do polimorfismo <i>HTR2A</i> -1438A/G (rs6311).	25
FIGURA 8 -	Pontuações do MEQ divididas por genótipo.....	27
TABELA 1 -	Sequências do par de primers para amplificação das regiões de interesse do gene <i>HTR2A</i>	21
TABELA 2 -	Protocolo da PCR para amplificação do gene.....	22
TABELA 3 -	Programa de termociclagem para amplificação do gene <i>HTR2A</i>	22
TABELA 4 -	Frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo <i>HTR2A</i> -1438A/G (rs6311).....	25
TABELA 5 -	Associação dos genótipos com os cronotipos.....	26
TABALA 6 -	Médias das pontuações obtidas no MEQ.....	27

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT	5 - hidroxitriptamina
CSM	<i>Composite Scale of Morningness</i>
GPCRs	Receptores acoplados a proteína G
HTR1	Receptor de serotonina 1
HTR2	Receptor de serotonina 2
HTR3	Receptor de serotonina 3
HTR4	Receptor de serotonina 4
HTR5	Receptor de serotonina 5
HTR6	Receptor de serotonina 6
HTR7	Receptor de serotonina 7
MEQ	<i>Morningness-Eveningness Questionnaire</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase
TPH1	Triptofano hidroxilase 1
TPH2	Triptofano hidroxilase 2

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	11
2.	REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1.	RITMO CICARDIANO E CRONOTIPO.....	
2.2.	SISTEM SEROTONINÉRGICO.....	14
2.3.	RECEPTORES DA SEROTONINA – 5HTR.....	18
2.4.	GENE <i>HTR2A</i> E POLIMORFISMO <i>HTR2A</i> -1438A/G (rs6311).....	18
3.	OBJETIVOS.....	20
3.1.	OBJETIVO GERAL.....	20
3.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
4.	METODOLOGIA.....	21
4.1.	AMOSTRA E ASPECTOS ÉTICOS	21
4.2.	COLETA E PROCESSAMENTO DE DADOS.....	21
4.2.1.	Coleta do material biológico para extração do DNA.....	21
4.2.2.	Amplificação e genotipagem do polimorfismo <i>HTR2A</i> -1438A/G rs6311.....	21
4.2.3.	Caracterização dos cronotipos.....	22
4.3.	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	29
5.	RESULTADO E DISCUSSÃO.....	31
5.1.	FREQUÊNCIA GENOTÍPICA E ALÉLICA.....	31
5.2.	ASSOCIAÇÃO DO GENÓTIPO E CRONOTIPO.....	32
6.	CONCLUSÃO.....	37
	REFERÊNCIAS.....	38
	APÊNDICE - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE).....	40
	ANEXO 1 - INVENTÁRIO DE EDINBURGH.....	43
	ANEXO 2 - QUESTIONÁRIO DE MATUTINIDADE-VESPERTINIDADE – Versão de Auto-Avaliação (MEQ-SA).....	44

1. INTRODUÇÃO

Durante um período de 24 horas, os horários preferidos de um indivíduo para ser mais ativo ou para dormir podem dividir a população em sujeitos matutinos (os que preferem acordar cedo e são mais produtivos no período da manhã) e os vespertinos (que são mais produtivos à noite e preferem ficar acordados até mais tarde). Essa importante característica em relação às diferenças de fase dos ritmos circadianos tem sido denominada cronotipo ou preferência de matutinidadade- vespertinidadade. Os três cronotipos principais são distinguidos em: matutino, indifferente e vespertino. (MONTARULLI et al., 2021; DUARTE, 2018).

Dessa forma, a ritmicidade circadiana nos seres humanos é representada por um fenótipo complexo derivado de múltiplos fatores, dentre eles os genéticos e estímulos ambientais como ciclo claro-escuro e latitude que assim contribuem para definir o cronotipo do indivíduo. (ADAN et al, 2012; ZALMBACH et al; DUARTE, 2018).

Os cronotipos podem ser avaliados mediante entendimento dos hábitos, rotinas e bem-estar das pessoas em diferentes horários ao longo das 24 horas do dia. Indivíduos com o cronotipo do tipo matutino têm um ciclo vigília-sono relativamente avançado em que realizam suas atividades logo que despertam e apresentam melhor desempenho no início do dia, enquanto aqueles com o cronotipo do tipo vespertino têm um ciclo vigília-sono relativamente atrasado em que e apresentam melhor desempenho no final do dia. Dessa forma, o cronotipo pode influenciar em atitudes, estilo de vida, função cognitiva, desempenho atlético e traços de personalidade. Em que as diferenças interindividuais nos cronotipos precisam ser consideradas para reduzir os efeitos negativos das interrupções circadianas na saúde (ADAN, 2010; DUARTE, 2018).

O ritmo circadiano desempenha um papel fundamental na regulação de funções biológicas, como o cronotipo, incluindo ciclo sono-vigília, temperatura corporal, secreção hormonal, ingestão de alimentos e desempenho cognitivo e físico. Consequentemente, alterações no ritmo circadiano podem levar a doenças crônicas e distúrbios do sono, como vários estudos evidenciaram que

a interrupção circadiana pode levar a doenças metabólicas, como diabetes, obesidade (TEVY, 2011), câncer (MORMONT, WATERHOUSE 2002), doenças neurodegenerativas (TRANAH et al., 2011) além de consequências cardiovasculares adversas, como aumento do risco de doenças cardiovasculares, com mortalidade relacionada e ao acidente vascular cerebral (PAUDEL et al, 2010).

A serotonina, por sua vez, é um neurotransmissor responsável pela regulação de diversos aspectos fisiológicos que afetam o ritmo circadiano, como o sono, a termorregulação, a respiração, o apetite, a homeostase da glicose e a dor. Esse neurotransmissor também modula funções cerebrais complexas, como a cognição e o comportamento emocional (STRAC et al., 2016).

A sinalização da serotonina ocorre por sua ligação a pelo menos um dos seus 14 receptores (EL-MERAHBI et al., 2015). Essa ligação permite que a serotonina inicie uma cascata de sinalização específica de acordo com a sua função (NODA, et al., 2004; BERGER et al., 2009). Alterações no sistema serotoninérgico foram relacionadas a diferentes transtornos comportamentais e doenças neurodegenerativas, como o transtorno bipolar (LASKY-SU et al. 2005), ansiedade- depressão (SEN et al., 2004), transtorno de personalidade (SAVITZ 2004), esquizofrenia (ABDOLMALEKY et al. 2004) e doença de Alzheimer (HOLMES et al., 1998).

Na via metabólica deste neurotransmissor podem ser encontrados diversos genes de relevância para estudo deste comportamento. O gene *HTR2A*, por exemplo, é responsável por codificar um dos receptores serotoninérgicos, e está implicado na fisiopatologia e tratamento de vários transtornos psiquiátricos, além de também estar relacionado com o ciclo circadiano (SPIES, 2020).

Dessa forma, o presente estudo teve o objetivo de investigar a associação do polimorfismo *HTR2A* -1438A/G (rs6311), do gene *HTR2A* com a preferência matutina-vespertina em uma população de indivíduos jovens. Pesquisas como essa ajudam a compreender melhor sobre a contribuição genética do polimorfismo *HTR2A* -1438A/G (rs6311) na preferência por turno

matutino ou vespertino da população. O entendimento deste comportamento, por sua vez, é necessário à medida que favorece o planejamento da rotina dos indivíduos a partir de suas necessidades e potencialidades. Afinal, diferentes pessoas possuem ciclos e hábitos distintos e podem melhorar seu desempenho produtivo e social a partir da consciência de seu cronotipo.

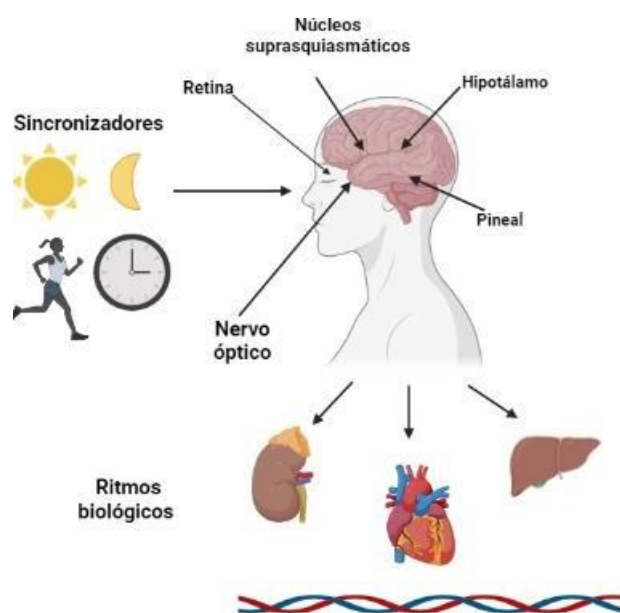
2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. RITMO CIRCADIANO E CRONOTIPO

O ritmo biológico é um processo que ocorre periodicamente, manifestando-se como um fenômeno que se repete aproximadamente a cada 24 horas. Esse ritmo, também conhecido como ritmo circadiano (*circa*: cerca de, *diano*: um dia), influencia diversas funções fisiológicas, como a temperatura corporal, frequência cardíaca, pressão arterial, níveis hormonais e número de células circulantes do sistema imunológico, com influência no ciclo vigília/sono, em fenótipos comportamentais entre outros (DUARTE, 2018).

Os ritmos circadianos são controlados por osciladores endógenos, como núcleos supraquiasmáticos e osciladores pineais e periféricos, e por fatores exógenos (como ciclo claro/escuro, vida social e ciclo sono-vigília), que pode sincronizar o relógio biológico (Figura 1). Esses fatores periódicos, chamados de “zeitgeber” (“doador de tempo” em alemão), desempenham um papel na sincronização dos ritmos circadianos diariamente (GOLOMBEKE & ROSEINSTEIN, 2010).

Figura 1: Sistema de Temporização Circadiana



Fonte: Adaptado de Duarte, 2016, criada no © 2023 BioRender.
Obtido em <https://app.biorender.com/biorender>

Segundo Horne & Ostberg (1976), os indivíduos podem ser classificados em três cronotipos, considerando-se as diferenças individuais dos ritmos biológicos. Os cronotipos são: matutino (dividido em tipos extremo e moderado), indiferente e vespertino (dividido em tipos extremo e moderado). Os indivíduos matutinos são aqueles que preferem dormir cedo (em torno das 21 ou 22 horas) e acordam cedo, em torno das 6 horas, sem dificuldades, tendo um bom desempenho físico e mental pela manhã. Os vespertinos, ao contrário, preferem dormir e acordar tarde (em torno de 1 hora da manhã e após as 10 horas, respectivamente, apresentando melhor disposição no período da tarde e início da noite. Já os indiferentes têm maior flexibilidade, escolhendo horários intermediários de acordo com as necessidades de sua rotina.

Martynhak et al. (2010) propôs uma quarta classe de cronótipo, denominada bimodal (BC). Esses indivíduos, corresponderam a 8% da amostra analisada em seu estudo, responderam algumas questões do MEQ como matutino, enquanto responderam outras como vespertino, resultando em uma pontuação total intermediária.

O cronotipo, referido como preferência matutina ou vespertina, faz parte da ritmicidade circadiana (ADAN et al., 2012) e é normalmente definido como variação individual no tempo preferido do ciclo sono-vigília (ZAVADA et al., 2005). Portanto, ele reflete a variabilidade individual, padrões de comportamento ou manifestações indicativas de processos biológicos governados pelo ritmo circadiano, e está associado a variações de natureza fisiológica, com o ritmo da temperatura corporal e secreção hormonal (TAYLOR E HASLER, 2018).

Existem diferentes métodos para medir o cronotipo, incluindo questionários autorrelatados, como o *Morningness-Eveningness Questionnaire* (MEQ) (HORNE E OSTBERG, 1976), com sua versão reduzida de cinco itens (rMEQ) (ADAN E ALMIRALL, 1991) e o *Munich Chronotype Questionnaire* (ROENNEBERG et al, 2003). Além disso, há outras ferramentas relativamente objetivas, como a medição da Escala Composta Matinal (*Composite Scale of Morningness* - CSM) (SMITH et al., 1989), início de melatonina com luz fraca

(DLMO), um diário do sono (CARNEY et al., 2012), acelerometria de pulso e actígrafos (KAUFMANN et al., 2018; LYALL et al., 2018).

O MEQ é composto de questões a respeito de situações habituais da vida diária, e o indivíduo deve registrar os seus horários preferenciais para estas situações, partindo-se do pressuposto de uma total disponibilidade de tempo para a escolha. O resultado do questionário é um valor numérico, que varia entre 16 e 86 pontos que classifica o indivíduo dentre os cinco cronotipos: "vespertino extremo" (16 a 30 pontos), "moderadamente vespertino" (31 a 41 pontos), "indiferente" (42 a 58 pontos), "moderadamente matutino" (59 a 69 pontos), e "matutino extremo" (70 a 86 pontos). Sabe-se que fatores sociodemográficos, como idade e sexo, influenciam o cronotipo ao longo da vida (MONTARULLI, 2021).

Dessa forma, estudos voltados para a base genética da ritmicidade circadiana têm sido objeto de interesse há muito tempo. Atualmente muitos estudos moleculares vêm se desenvolvendo sobre os ritmos circadianos, facilitando análises genéticas de fisiopatologias do sono e tendências à matutinitude ou à vespertinidade. Um dos primeiros estudos genéticos identificou o *gene period* (Per) como o primeiro componente essencial para a oscilação circadiana, e foi seguido pelo isolamento de vários genes relógio (PER 1/2/3, CLOCK, CRY 1/2), em muitas espécies incluindo mamíferos (DUNLAP, 1999). Mutações naturais nesses genes relógio podem modular os ritmos circadianos em hamsters e ratos (KING & TAKAHASHI, 2000; LOWREY & SHIMOMURA, 2000); e provavelmente possuem um papel importante na regulação circadiana da nossa espécie (EBISAWA & UCHIYAMA, 2001; CERMAKIAN & BOIVIN, 2003).

2.2. SISTEMA SEROTONINÉRGICO

O organismo produz substâncias químicas conhecidas como neurotransmissores que, por meio de receptores específicos embutidos em membranas pré e pós-sinápticos, modificam a atividade elétrica dos neurônios (KOBAYASHI et al., 2017).

A liberação de neurotransmissores permite a formação do impulso

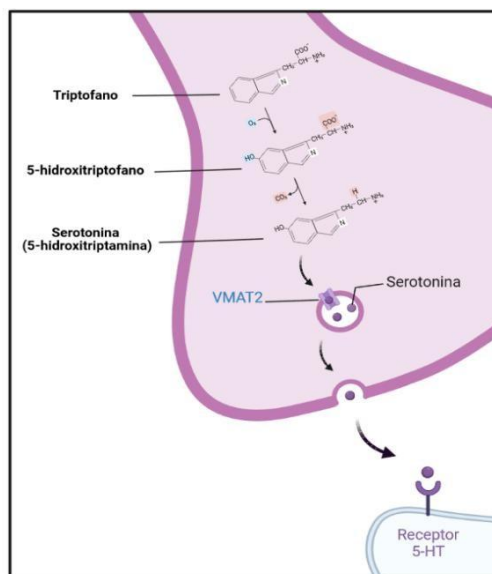
nervoso, contribuindo na manutenção dos circuitos neurais, na sua intercomunicação e comunicação com outros tecidos que, por sua vez, pode ter consequências importantes para a dinâmica cortical em maior escala e, em última análise, para o desempenho cognitivo (KOBAYASHI et al., 2017).

A serotonina foi descoberta e descrita independentemente por dois laboratórios. No ano de 1938, em Roma, quando Vittorio Erspamer isolou pela primeira vez a endolamina, denominada enteroamina, a partir de células do trato gastrointestinal (ERSPAMER & ASERO, 1952). Em meados de 1948, uma substância vasoconstritora foi isolada do sangue por Maurice Rapport, Arda Green, e Irvine Page na “*Cleveland Clinic*” (RAPPORT et al., 1948). Essa substância foi denominada serotonina (do latim “*serum*”, de onde foi encontrada e do grego “*tonic*”, por seu efeito constritor dos vasos sanguíneos). Posteriormente, em 1953, a serotonina foi descrita em extratos do cérebro (TWAROG & PAGE, 1953). Erspamer foi responsável por descrever o núcleo de endol na enteramina e posteriormente Rappor determinou a estrutura da serotonina como conhecemos sendo 5- hidroxitriptamina ou 5-HT. (RAPPORT, 1949).

A serotonina, é uma indolamina resultante da hidroxilação e carboxilação do triptofano. A serotonina faz parte de um conjunto de neuromoduladores denominados aminas biogênicas, que englobam também a dopamina e a noradrenalina (PAES, 2017; FEIJÓ; BERTOLUCCI; REIS, 2011). A serotonina tem várias funções tanto nos sistemas neurais quanto nos sistemas não neurais (OH; PARQUE; KIM, 2016).

Nos vertebrados, ela é encontrada e sintetizada no cérebro e nos tecidos periféricos de forma diferenciada por não ultrapassar a barreira hematoencefálica. A biossíntese da serotonina (Figura 2) ocorre nos corpos celulares dos neurônios localizados nos núcleos da rafe no tronco encefálico, com propagações dos axônios estendidos amplamente pelo encéfalo e medula espinal. A sua síntese é realizada pela ação das enzimas expressas pelos genes da triptofano hidroxilase 1 e 2 (TPH1 e TPH2), que se encontram nos tecidos periféricos e no cérebro, respectivamente (BERGER et al., 2009).

Figura 2: Biossíntese da serotonina

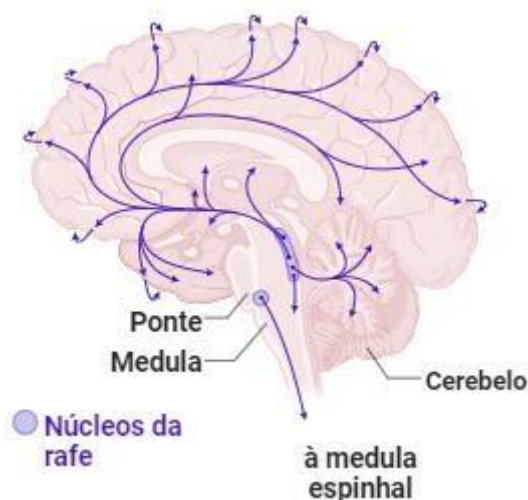


Fonte: Adaptado de “Síntese da serotonina”, de ©BioRender.(2023).
 Obtido em <https://app.biorender.com/biorender-templates>

A biossíntese inicia com a passagem do aminoácido essencial L-triptofano, pela barreira hematoencefálica, por meio de um transportador de aminoácidos não seletivo ao triptofano. A primeira fase consiste na hidroxilação do triptofano em 5- hidroxitriptofano (5-HTP) pela enzima triptofano hidroxilase (encontrada somente nos neurônios serotoninérgicos). Em seguida, ocorre a descarboxilação pela enzima L- aminoácido aromático descarboxilase, gerando como produto a 5-HT (OKATY; COMMONS; DYMECKI, 2019).

A porção de serotonina sintetizada no cérebro representa aproximadamente 5% desse composto no organismo (BERGER et al., 2009) e o restante é produzida nos órgãos periféricos, nas células enterocromafins do trato gastrointestinal, células pancreáticas do tipo β , adipócitos e osteoclastos. Aproximadamente, 2% da serotonina encontrada no sangue atua diretamente como hormônio (KIM et al., 2011), possuindo grande importância na sinalização hormonal, agregação plaquetária, contração dos músculos lisos, processos inflamatórios, vasoconstrição e dilatação (EL-MERAHBI et al., 2015; RUBLE et al., 2016).

Figura 3: Liberação da serotonina no SNC, originado nos núcleos da rafe.



Fonte: Adaptado de "Distribuição de neurotransmissores de serotonina no cérebro humano" © 2023 BioRender. Obtido em <https://app.biorender.com/biorender-templates>.

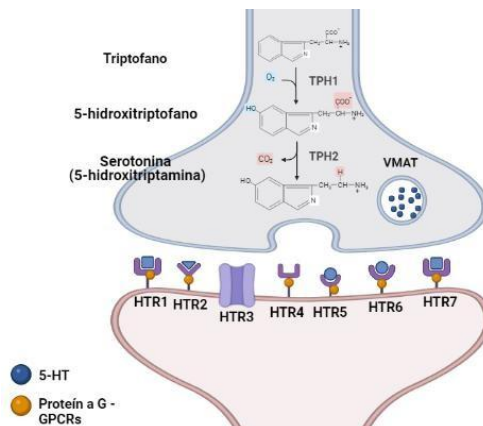
Considerando a abrangência de atuações da serotonina, estudos genéticos moleculares constituem uma ferramenta importante para elucidar o potencial de impacto da modulação serotoninérgica associada ao ciclo circadiano, uma vez que está intimamente ligado a regiões que têm grande expressão desse neurotransmissor (ERIKSSON et al., 2015; BARNES et al., 2016; EKMAN et al., 2016; FITCH et al., 2016; LAMP et al., 2016).

2.3. RECEPTORES DA SEROTONINA - 5HTR

As funções da serotonina no SNC são mediadas por mais de 14 diferentes receptores (STROBEL et al., 2003). Esses receptores se dividem em sete tipos ou famílias, e já foram identificados e denominados em vários subtipos, como a seguir: HTR1 (HTR1A, HTR1B, HTR1D, HTR1E e HTR1F), HTR2 (HTR2A, HTR2B e HTR2C), HTR3 (HTR3A, HTR3B e HTR3C), HTR4, HTR5 (HTR5A, HTR5B), HTR6 e HTR7 (NICHOLS et al, 2008; SHARMAN et al., 2013). Somente a classe HTR3 é formada por receptores do tipo canal de cálcio acoplado a ligantes. Todos os outros receptores de serotonina pertencem à superfamília dos receptores acoplados à proteína G (GPCRs). A serotonina se liga às diferentes formas dessa proteína para iniciar cascatas de sinalização específicas de acordo com a sua função (NODA, et al., 2004;

BERGER et al., 2009).

Figura 4: Receptores de serotonina



Fonte: Autoria própria, criada no © 2023 BioRender.
<https://app.biorender.com/illustrations/6489f27f7dfba191c969e31f>

A subfamília 5-HTR1 é formada por cinco receptores (5-HTR1A, 5-HTR1B, 5-HTR1D, 5-HTR1E, 5-HTR1F). Os receptores 5-HTR1A estão distribuídos como autorreceptores nos neurônios serotoninérgicos dos núcleos da rafe e nas regiões terminais como sítios pós-sinápticos (principalmente nas áreas córtico-límbicas) (BARGES et al., 2021; CELADA et al., 2004), e no plexo mioentérico e por todo o trato gastrointestinal. É considerado um dos principais responsáveis pelo comportamento ansioso. Os receptores 5-HT1B-1D possuem propriedades antieméticas já bem estabelecidas (HUANG et al., 2020), mas além disso também tem demonstrado possuírem efeito antiagregante plaquetário (BERGER; GRAY; ROTH, 2009).

Os receptores 5-HTR2 são divididos em três subtipos (A, B e C). Os receptores 5-HTR2A estão distribuídos em várias estruturas cerebrais, no córtex frontal, no núcleo *accumbens*, nos núcleos do mesencéfalo e no hipocampo (VAN OEKELLEN et al., 2003). Na periferia, esses receptores são encontrados na musculatura lisa, (onde medeiam respostas constritivas da musculatura brônquica, uterina e do trato urinário) e nas plaquetas (aumentando a permeabilidade capilar e a agregação plaquetária (COOK et al., 1994; BERGER; GRAY; ROTH, 2009). O antagonismo dos receptores 5-HTR2A tem se mostrado como boa estratégia terapêutica para a esquizofrenia,

em concordância com alguns estudos, demonstrando que o agonismo dos receptores 5-HT_{2A} no córtex pré-frontal induz alucinações (JONES; BLACKBURN, 2002; VAN OEKELLEN, et al., 2003).

Os receptores 5-HT₃ possuem cinco isoformas conhecidas, porém, somente a isoforma 5-HT_{3A} é funcional (BARNES et al., 2021). Os fármacos antagonistas destes receptores são extensamente utilizados para o tratamento de náusea e vômito induzido por quimioterapia e/ou radioterapia (TYERS; FREEMAN, 1992; GERSHON; TACK, 2007). Além disso, algumas evidências sugerem que o antagonismo dos receptores 5-HT₃ podem diminuir as consequências comportamentais das síndromes de abstinência causadas pelo tratamento de adição de drogas de abuso, álcool e nicotina, e para uma série de transtornos psiquiátricos como, a psicose, a ansiedade e a disfunção cognitiva (THOMPSON; LUMMIS, 2007; BARNES et al., 2021).

Os receptores 5-HT₄ são compostos por quatro isoformas, que estão distribuídas da seguinte maneira: 5-HT_{4A-B-C} útero, cérebro e intestino; na bexiga existe apenas a isoforma 5-HT_{4A}; nos rins, apenas a 5-HT_{4B}; a 5-HT_{4D} é expressa apenas nas células intestinais (BLONDEL et al., 1998). Os receptores 5-HT₄ têm uma importante participação na modulação da motilidade e resposta secretória do TGI (GERSHON; TACK, 2007).

A subfamília 5-HT₅ é formada pelos receptores 5-HT_{5A} e 5-HT_{5B}. Sugere-se que os receptores 5-HT_{5A} possuem uma distribuição que permite funcionalidades na regulação emocional, cognição e nocicepção, porém ainda não confirmadas, devido falta de substâncias seletivas a estes receptores. Os receptores 5-HT_{5B} também não possuem ligantes seletivos, e por conseguinte, não tem suas funções ou significâncias clínicas estabelecidas (BARNES et al., 2021).

Os receptores 5-HT₆ parecem possuir uma função em potencial no tratamento de alterações cognitivas, devido a algumas evidências encontradas em estudos pré-clínicos em animais. Alguns fármacos, principalmente antidepressivos e antipsicóticos, possuem afinidade por estes receptores, porém eles também apresentam seletividade a outros alvos, dificultando uma definição sobre as funções desta família de receptores (BARNES et al., 2021).

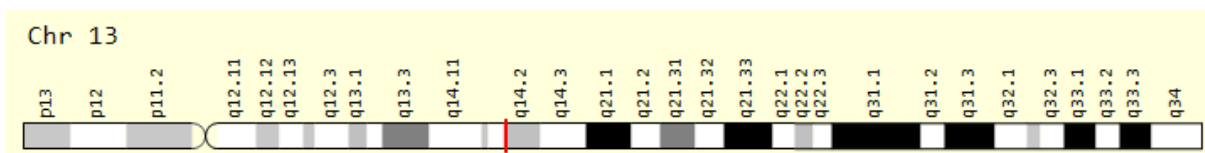
O último tipo de receptores de serotonina é a dos receptores 5-HT₇, que parecem possuir efeito pró-depressivo (BARNES et al., 2021). Alguns estudos pré-clínicos em modelos animais utilizando antipsicóticos que também bloqueiam receptores 5-HT₇ — amisulpirida, aripiprazol, lurasidona — demonstraram que, os animais tratados com estes fármacos tiveram o tempo de imobilidade reduzida nos testes de nado forçado e de suspensão pela cauda, o que não ocorreu nos ratos nocautes para os receptores 5-HT₇. Esses resultados sugerem um papel importante para os receptores 5-HT₇ na depressão (CATES et al., 2013).

2.4. GENE *HTR2A* E O POLIMORFISMO *HTR2A* -1438A/G (rs6311)

O polimorfismo investigado no gene *HTR2A*, o rs6311 (-1438G/A) merece destaque por estar localizado na região de controle transcricional desse receptor e também por estarem associados à suscetibilidade à esquizofrenia, ao transtorno obsessivo-compulsivo, e a outros fenótipos (MAFFIOLETTI et al, 2020; POUGET et al, 2014). Os polimorfismos genéticos são formas alternativas de um gene onde cada variante é chamada de alelo polimórfico. Alguns são caracterizados pela substituição de um único nucleotídeo (SNP - *Single nucleotide polymorphisms*) na sequência de DNA.

O gene *HTR2A* codifica o receptor HTR_{2A}, está localizado na região cromossômica 13q14.2, apresentando 3 éxons e 2 introns (Figura 5) (CHEN et al., 1992).

Figura 5: Localização do gene *HTR2A* no cromossomo 13



Fonte: GeneCards — The Human Gene Database, 2017.

Disponível em: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=HTR2A>. Acesso em 21 de julho 2023.

O gene *HTR2A* é expresso em diferentes tecidos como cérebro, plaquetas, sistema cardiovascular e fibroblastos (DURK et al., 2005). Sua expressão no cérebro tem implicado no mecanismo de ação de alucinógenos e em doenças mentais como esquizofrenia e depressão (NICHOLS, 2004;

MELTZER & ROTH, 2013).

Ao longo desse gene são encontrados cerca de 169 SNPs, os quais podem alterar, seja a atividade transcricional ou a estrutura conformacional do receptor (Wu, 2008). Alguns desses SNPs apresentam-se na região reguladora do *HTR2A*, incluindo -1438A/G, -1420C/T e -783A/G; SNPs -1438A/G e -1420C/T estão localizados mais próximos do promotor central. A transição A>G, variação que ocorre na posição -1438 do gene *HTR2A*, corresponde a um polimorfismo funcional que sobrepõe a região regulatória. Regulação do receptor de serotonina 5-HT_{2A} humano mostrou-se alterado em pacientes que sofrem de transtornos do humor, incluindo depressão maior (MYERS et al., 2007).

O polimorfismo *HTR2A* -1438A/G (rs6311) amplamente estudado, foi relatado como estando em desequilíbrio de ligação significativo (LD) com -1420C/T (SPURLOCK et al 1998) e em completo LD com um SNP de codificação sinônimo no exon 1, T102C (BRAY et al, 2004; KOUZMENKO e outros 1999; KUSUMI e outros 2002; SPURLOCK et al 1998). Ambos os SNPs T102C e -1438A/G foram encontrados em associação a vários transtornos psiquiátricos, incluindo transtorno depressivo, transtorno obsessivo-compulsivo, transtornos alimentares e esquizofrenia. (WALITZA et al 2002).

Impactos funcionais de SNPs no promotor do *HTR2A* (por exemplo, -1438A/G, -1420C/T e -783A/G) podem estar implicitamente associados positivamente, assim como à expressão alterada do receptor *HTR2A*, observado em várias doenças psiquiátricas. Potenciais variações funcionais na região regulatória do *HTR2A* foram examinadas em humanos, avaliando a associação entre o genótipo em -1438A/G (ou no *locus*-T102C) no receptor *HTR2A* expressão usando plaquetase amostras de cérebro pós-morte.

A partir de uma abordagem controlada, ao examinar os efeitos genotípicos na atividade do promotor do receptor *HTR2A*, usando gene repórter em ensaios genéticos, para o polimorfismo *HTR2A* -1438A/G (rs6311), Spurlock et al (1998) não detectaram nenhuma diferença na atividade do receptor para ambos os alelos do *locus* -1438; no entanto, Parsons et al (2004) verificaram que o alelo -1438A conferia atividade promotora aumentada em relação ao alelo -1438G.

Visto que o gene *HTR2A* participa da neuromodulação, entende-se a importância em analisar o papel dele e de suas variações sobre as bases neurobiológicas envolvidas na cronobiologia. Como as desregulações no ritmo circadiano e as perturbações do sistema estão ligadas ao desenvolvimento da doença, a biologia fundamental do cronotipo tem recebido atenção por seu papel na regulação e desregulação do sono e doenças relacionadas. Por isso, a importância de pesquisas que busquem a influência genética para a determinação e compreensão dos cronotipos humanos (DUARTE, 2018; ZOU et al 2022).

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Investigar a relação do polimorfismo HTR2A -1438G/A (rs6311) com a preferência matutina-vespertina em uma população de indivíduos jovens.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter as frequências populacionais (alélicas e genotípicas) e verificar o equilíbrio de Hardy-Weinberg do polimorfismo;
- Caracterizar a população investigada segundo os cronotipos matutino, vespertino ou indiferente, a partir do MEQ;
- Estimar a associação genotípica do polimorfismo analisado para variações de cronotipo.

4. METODOLOGIA

4.1. AMOSTRA E ASPECTOS ÉTICOS

Foram selecionados 161 voluntários, com idade de 18 a 32 anos, e do sexo masculino - a fim de minimizar possíveis oscilações hormonais, inerentes ao sexo feminino. Os voluntários não possuem histórico de doenças neurológicas, nem utilizaram substâncias psicotrópicas nas 24 horas antecedentes à coleta dos dados. Além disso, todos eram destros, seguindo o Inventário de Edinburgh (OLDFIELD, 1971).

Todos os voluntários assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido — TCLE autorizando a coleta e armazenamento de seus dados, aprovado pelo Comitê de ética em pesquisa em seres humanos da UFDPAr, sob o número CAAE 50651715.2.0000.5669 e número de registro 3.912.412. (APÊNDICE).

Toda a metodologia foi realizada nos Laboratórios de Genética e Biologia Molecular e no de NeuroInovação e Tecnologia, ambos localizados na Universidade Federal do Delta do Parnaíba — *Campus* Ministro Reis Velloso, no município de Parnaíba, Piauí.

4.2. COLETA E PROCESSAMENTO DE DADOS

4.2.1. Coleta de material biológico para extração de DNA

As amostras de sangue foram obtidas por punção venosa, onde aproximadamente 4 mL de sangue periférico foram coletados de cada voluntário. Utilizando o kit *Wizard® (Genomic DNA Purification Kit, Promega)*, as amostras de sangue foram submetidas à extração do DNA de leucócitos, seguindo as instruções do fabricante, conforme descrito a seguir: para um volume de 300µL de sangue, adicionou-se 900µL de uma solução de lise celular e incubou-se por 10 minutos.

Em seguida, realizou-se uma centrifugação para descartar o sobrenadante e as amostras foram submetidas a uma agitação vigorosa para evitar a formação de grumos na etapa seguinte. Nesta etapa, adicionou-se uma mistura composta por 300µL de solução de lise nuclear e 100µL de solução de precipitação de proteínas. Realizou-se uma nova centrifugação e transferiu-se o sobrenadante para um novo tubo contendo 300µL de isopropanol, seguido de outra centrifugação. Descartou-se

o sobrenadante e adicionou-se etanol a 70%.

Uma nova centrifugação foi realizada e o sobrenadante foi descartado, deixando uma massa branca (*pellet*) no fundo do tubo, que corresponde à amostra de DNA obtida. Em seguida, esse DNA foi incubado com 100µL de solução de reidratação em uma estufa a 65°C por 1 hora, para que o DNA fosse eluído e se dispersasse de forma homogênea. A pureza e concentração do DNA foram determinadas por espectrofotometria, utilizando os comprimentos de onda de 260nm e 280nm. Após a análise, o DNA foi armazenado em um freezer no Laboratório de Genética e Biologia Molecular da UFDPAr, *Campus* Ministro Reis Velloso, Parnaíba-PI.

4.2.2. Amplificação e genotipagem do polimorfismo *HTR2A* -1438A/G (rs6311)

Para a análise dos polimorfismos de fragmentos de restrição, utilizando a reação em cadeia da polimerase (PCR - RFLP), foram utilizados iniciadores (*primers Forward* e *Reverse*) sintetizados pela *Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA* e específicos para amplificar as regiões onde se encontra o polimorfismo. As sequências dos primers estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1: Sequências de primers para amplificação das regiões de interesse no gene *HTR2A*.

Primer	Sequência (5' - 3')	pb*
Forward	GTCAGTAATTCCACTCTGGAC	21
Reverse	GCTTTTGAGAGAAACTGGAG	20

Legenda: (pb): pares de base. Fonte: Autoria própria.

O DNA de 161 voluntários foi submetido à PCR realizada em um volume de total de 25 µL. Todos os reagentes utilizados foram da *Ludwig Biotechnology Ltda*.

O protocolo das reações de PCR (Tabela 2) foi realizado em uma cabine de segurança com fluxo unidirecional horizontal da marca VECO. Antes de cada reação na cabine, foi feita a sua esterilização com luz UV (ultravioleta) por 30 minutos. Para eliminar qualquer contaminação nas reações, foi utilizado um controle negativo (branco) contendo todos os reagentes da PCR, exceto o DNA genômico. Em seguida, os tubos foram submetidos ao programa de amplificação, realizado no

termociclador da *Applied Biosystems Veriti Thermal Cyclers®* (Califórnia, EUA), conforme descrito na Tabela 3.

Tabela 2: Protocolo da PCR para amplificação do gene *HTR2A*.

Reagente	Volume
Tampão 10x	2,5 µL
MgCl ₂ (1,5mM)	0,75 µL
Primer <i>Foward</i> (15 pmol)	1,0 µL
Primer <i>Reverse</i> (15 pmol)	1,0 µL
DNTPs (250 µM)	5,0 µL
Taq Polimerase (1U)	0,3 µL
DNA (50 ng)	1,0 µL
H ₂ O	13,45 µL
Total	25 µL

Fonte: Autoria própria.

Tabela 3: Programa de termociclagem para amplificação do gene *HTR2A*.

Passos	Temperatura	Tempo	Ciclos
Desnaturação inicial	96°C	5 min.	1x
Desnaturação	94°C	1 min.	35x
Anelamento	62°C	30 segs.	
Extensão	72°C	1 min.	
Extensão final	72°C	5 min.	1x

Fonte: Autoria própria.

Os produtos da amplificação, previamente determinados por eletroforese em gel de agarose a 0,8%, corado com GelRed, foram submetidos à digestão enzimática utilizando a enzima de restrição *MsPI* (*New EnglandBioLabs*, EUA), que reconhece o sítio 5'-...GGCC...-3', e cliva o alelo G, gerando os três genótipos esperados para o polimorfismo rs6311, com os seguintes fragmentos: 202 pb (AA), 151 pb (GA) e 51 pb (GG) (Figura 6).

Após esse procedimento, os tubos contendo o polimorfismo amplificado foram incubados a 37°C por um período de 16 horas em um banho-maria a seco. A genotipagem do polimorfismo foi realizada em um gel de poliacrilamida com uma concentração de 8%, inserido em uma cuba vertical de eletroforese, submetido a uma corrente de 130 V, por um período de 2 horas e 30 minutos. A Figura 6 representa o padrão de bandas esperado após a corrida eletroforética em gel de poliacrilamida.

Figura 6: Padrão de bandas esperadas para o polimorfismo *HTR2A* -1438A/G (rs6311)



Fonte: Autoria própria, criada no © 2023 BioRender.
<https://app.biorender.com/illustrations/6489f27f7dfba191c969e31f>

4.2.3. Caracterização dos cronotipos

A avaliação dos cronotipos, obtidos por meio da aplicação do questionário MEQ (Anexo 2), foi organizada e tabulada em uma tabela no *EXCEL* para posterior análise e associação com os genótipos.

O MEQ é composto por 19 perguntas objetivas que abordam diferentes situações cotidianas, nas quais os indivíduos indicam suas preferências de horário para a realização das atividades propostas. Cada pergunta possui uma pontuação específica, permitindo que o participante obtenha uma soma total de pontos que varia em intervalos de 16 a 86. Pontuações abaixo de 42 indicam cronotipos "vespertinos", pontuações acima de 58 indicam cronotipos "matutinos" e pontuações entre 42 e 58 englobam indivíduos com cronotipos indiferentes.

4.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A população estudada foi testada quanto ao seu equilíbrio pela lei de Hardy-Weinberg por meio do teste do Qui-Quadrado (χ^2) e as frequências genotípicas e alélicas foram determinadas por simples contagem.

Para a realização dos testes estatísticos, as variáveis estudadas foram divididas em: Genótipo, acerca dos alelos genéticos; cronotipo, em referência aos grupos de indivíduos matutinos, indiferente e vespertino; e Pontuação que identifica a pontuação total obtida no questionário.

Foi analisada se há associação entre as variáveis genótipos e cronotipos utilizando o teste do Qui-quadrado. Em consequente, realizou-se uma *ANOVA one way*, visando a análise da variação das médias das pontuações obtidas nos questionários que identificam os grupos de preferência matutina vespertina escolhida pelos indivíduos, para cada genótipo.

Todas as análises foram realizadas no programa *IBM SPSS Statistics 20.0* e para todos os testes foi considerado o nível de significância com $p < 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS

A partir da obtenção dos genótipos, foi observado, que a amostra do estudo se encontra em equilíbrio de *Hardy-Weinberg* (Tabela 4) por meio do teste qui-quadrado (χ^2). Isso permitiu seguir com segurança as análises, pois com o grupo em equilíbrio, infere-se que a população estudada não sofre ação de fatores evolutivos como mutação, deriva genética, fluxo gênico e seleção natural.

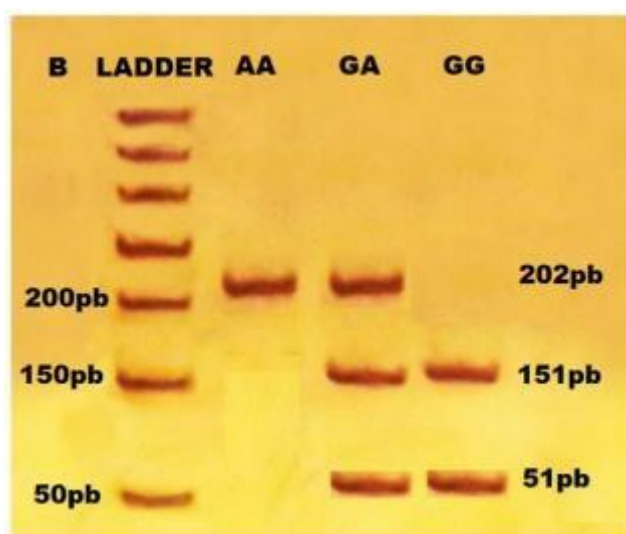
Tabela 4: Frequências genotípica e alélica do polimorfismo *HTR2A* -1438A/G (rs6311)

Genótipo	N	Frequência genotípica	Frequência alélica
AA	23	14,28%	A = 41,30%
GA	87	54,04%	G = 58,69%
GG	51	31,68%	
161		100%	$\chi^2 = 2,04 / p = 0,36$

Fonte: autoria própria

A Figura 7 apresenta o padrão de bandas encontrado para os genótipos do *HTR2A* A-1438G em gel de poliacrilamida a 8%, onde (B) é o controle negativo da PCR; (LADDER), o marcador de peso molecular de 50pb; AA (202pb), GA (202pb + 151pb + 51pb) e GG (151pb + 51pb), os genótipos obtidos após a digestão enzimática.

Figura 7. Genotipagem do polimorfismo *HTR2A* -1438A/G (rs6311)



Fonte: SOUSA (2021)

A predominância do genótipo GA (54,04%) no presente estudo, também é encontrada em outras populações, como se pode evidenciar no estudo de Enoch et al. (1999), realizado nos Estados Unidos (48,55%) e no estudo de Walitza et al (2002), conduzido na Alemanha (50,45%).

A partir da análise das frequências genóticas e alélicas obtidas, pode ser considerada também miscigenação presente na amostra, em que ocorre quando uma população é formada pela mistura de diferentes grupos étnicos, nesse caso, a população estudada composta predominantemente por piauienses, refletindo heterogeneidade genética, em que a contribuição parental europeia predomina para a constituição étnica da população do Estado do Piauí, seguida da africana e, em menor proporção, da indígena como relatado por Lopes (2014) em um estudo de ancestralidade piauiense. Assim, são necessários mais estudos sobre como as expressões genóticas e alélicas dos polimorfismos no gene *HTR2A* pode ser diferente em grupos étnicos e como isso afeta a associação entre os polimorfismos do gene *HTR2A* e o cronotipo.

5.2. ASSOCIAÇÃO GENÓTIPO E CRONOTIPO

De posse dos genótipos obtidos de cada indivíduo, foram também analisados seus respectivos questionários. A partir dessa análise foram observados que 22,98% dos indivíduos são intitulados como cronotipo vespertino, 58,38% como cronotipo indiferente e 18,64% como cronotipo matutino. Observa-se que os indivíduos indiferentes são maioria, com 58,38%, assim como o genótipo heterozigoto (GA), com 54,03% dos indivíduos. A amostra coletada encontra-se em uma distribuição normal, verificada pelo teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov ($p=0,43$), e com homogeneidade entre as variâncias calculada pelo teste de Levene ($p=0,95$).

O genótipo AA tem maior prevalência no cronotipo indiferente, seguido do matutino e vespertino, respectivamente. O genótipo GA tem maior prevalência no cronotipo indiferente, em seguida do vespertino e matutino respectivamente. O genótipo GG está presente em sua maioria no cronotipo indiferente, seguido do cronotipo vespertino e matutino, respectivamente.

Para verificar a associação entre as variáveis genótipo e cronotipo, foi realizado o teste do Qui-quadrado (χ^2) com a correção pelo teste Exato de Fisher. Após análise, e de posse dos resultados [$\chi^2=0,36$, com $p=0,98$, e $f=0,51$; $p=0,98$],

considerando o valor de significância $p < 0,05$, verifica-se que os grupos amostrais não apresentam associação entre as duas variáveis (Tabela 5).

Tabela 5: Associação dos genótipos com os cronotipos.

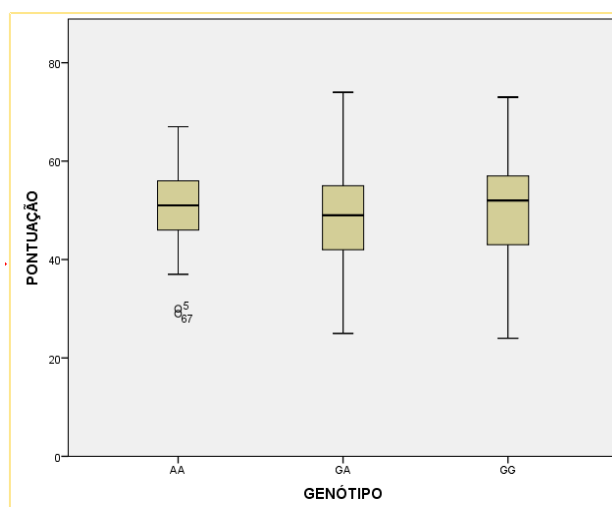
Genótipo	Vespertino	Indiferente	Matutino	Total
AA	5 (3,11%)	13 (8,07%)	5 (3,11%)	23 (14,29%)
GA	21 (13,04%)	51 (31,67%)	15 (9,32%)	87 (54,03%)
GG	11 (6,83%)	30 (18,64%)	10 (6,21%)	51 (31,68%)
TOTAL	37 (22,98%)	94 (58,38%)	30 (18,64%)	161 (100%)

$\chi^2 = 0,36$; $Ap = f=0,51$; $p=0,98$

Valor de significância para os testes: $p < 0,05$. Fonte: autoria própria

Para contribuir com o teste estatístico de associação, foi realizado o teste de análise das variâncias das médias, ANOVA *one way*, com as pontuações obtidas no questionário de Horne e Ostberg (MEQ) e os diferentes genótipos para o polimorfismo *HTR2A* -1438A/G (rs6311) (Figura 8). Com base nessa análise é possível inferir se as médias de pontuações terão variância significativa entre os genótipos.

Figura 8: Pontuações do MEQ divididas por genótipo.



Fonte: IBM SPSS Statistics 20.0

A Tabela 6 expressa valores próximos para as médias das pontuações. A ANOVA *oneway* mostrou que não existe efeito do genótipo do polimorfismo *HTR2A* -1438A/G (rs6311) sobre o cronotipo [$F=(2,158) = 0,656$; $p > 0,521$].

Tabela 6: Pontuações obtidas no questionário de Horne e Ostberg.

Genótipo	N	Média da pontuação	Desvio padrão	Valor mínimo	Valor máximo
AA	23	50,22	10,12	29	67
GA	87	48,67	9,47	25	74
GG	51	50,49	9,73	24	73
Total	161	49,47	9,62	24	74
p=0,52					

Fonte: Autoria própria.

Por meio da análise das variâncias das médias das pontuações obtidas para cada cronotipo, foi observado que os valores obtidos dentro de cada grupo genotípico são próximos entre si, o que indica que não há diferenças significativas entre os cronotipos apresentados por influência do genótipo. Neste caso, um dos pontos considerado como uma limitação do estudo foi o tamanho da amostra para análise estatística da associação genótipo e cronotipo, com $n=161$. Em trabalhos de genética populacional, são almejadas amostras maiores que possam representar melhor a população. Com maior amostra, a distribuição dos indivíduos nos cronotipos poderia ter números mais expressivos para avaliar as discrepâncias entre os grupos.

No estudo realizado por Yeom e colaboradores, desenvolvido em 2020 na Coreia do Sul, com 510 voluntários, foi investigado a associação entre o polimorfismo *HTR2A* -1438C/T (rs6311) e a preferência diurna em uma população coreana saudável. Este estudo foi o mais parecido com o objetivo desta pesquisa, diante disso é válido a comparação entre os estudos, visto que abrangem o mesmo polimorfismo em associação a cronobiologia. E como resultado também não foram observadas diferenças significativas nas pontuações médias totais do CSM. No entanto, sugere que o polimorfismo *HTR2A* -1438C/T (rs6311) pode exibir uma propensão à preferência diurna em uma população coreana saudável, em que a ausência do alelo -1438C pode ser responsável pela suscetibilidade vespertina na população coreana. Pois, verificou-se que o genótipo TT está associado a pontuações médias totais e de subescala mais baixos de CSM do que os genótipos CC e CT. Essa propensão alélica não foi apresentada entre os alelos -1438A e -1438G, visto que as médias possuem valores aproximados para ambos homozigotos AA (50,22) e GG (50,49) e sem diferença significativa para o heterozigoto GA (48,67).

Além disso, ambos os estudos selecionaram indivíduos saudáveis, com ausência de distúrbios psiquiátricos, em que reflete na distribuição dos cronotipos com maioria intermediários. Dessa forma, é possível sugerir que se fosse considerado para esses estudos voluntários com distúrbios psiquiátricos, poderia refletir nas frequências genotípicas e alélicas e na distribuição dos cronotipos, com tendência a um dos extremos, visto que o polimorfismo *HTR2A* -1438A/G (rs6311) pode estar mais associado em indivíduos afetados por transtorno depressivo, TOC, transtornos alimentares e esquizofrenia. (WALITZA et al 2002), assim como o cronotipo que pode estar associado a problemas de saúde humana, principalmente aos transtornos psiquiátricos, em que o cronotipo noturno é um fator de risco para transtornos depressivos e transtornos por uso de substâncias, enquanto o cronotipo matutino é um fator protetor (ZOU et al, 2022).

Outra análise a partir do grupo amostral com indivíduos é que contém voluntários do sexo masculino, com idades de 18 a 32 anos ($22,05 \pm 3,051$) e maioria dos indivíduos com cronotipo indiferente. A faixa etária dos participantes reflete uma amostra homogênea, com predominância de indivíduos jovens, cujos hábitos são tendenciosos ao cronotipo vespertino, como é observado com a predominância do cronotipo vespertino em relação ao matutino. Como afirmado por Alam (2008) que cronotipos podem exibir distribuições específicas em populações com diferentesidades e gênero, em que foi associando os ritmos de comportamento circadiano com o cronotipo matutino vespertino. A fim de esclarecer os mecanismos envolvidos, Adan e Natale, realizaram um estudo em 2002, a partir de uma amostra de estudantes universitários, italianos e espanhóis, com 18 a 30 anos de idade, os homens e as mulheres apresentaram pontuações totais do MEQ diferentes e com diferenças nas distribuições da tipologia circadiana. Em que os homens tiveram pontuações mais baixas, com proporção maior de vespertinos. Na relação gênero e cronotipo observada por Mongrain et al.(2006), as diferenças de gênero em adultos jovens, universitários de 17 a 35 anos, cujos resultados revelaram pontuações do MEQ mais altos no sexo feminino, refletindo mais matutividade em mulheres do que em homens.

Além disso, por se tratar de um estudo que analisa um único SNP, não foi possível ter resultados significativos nos testes estatísticos utilizados. Isso pode ter ocorrido devido o cronotipo ser considerado um fenótipo complexo que pode variar

de acordo com diferentes fatores genéticos e ambientais envolvidos. Em geral, os padrões sugerem que múltiplos genes desempenham papéis importantes que influenciam na preferência circadiana. Devido isso, a detecção de múltiplos pequenos efeitos genéticos requer um grande panorama de polimorfismos a serem estudados em conjunto (ZALMBACH et al, 2022).

Assim, com esse estudo, foi notável a importância do genótipo do polimorfismo HTR2A -1438A/G (rs6311) em comparação aos diferentes perfis de cronotipo do indivíduo. É válido ressaltar que são necessários mais estudos para o entendimento de como os mecanismos genéticos vinculados aos metabolismos fisiológicos, as características de personalidade e a adaptação ao ambiente interferem na capacidade de desenvolver atividades em certos horários. Além disso, é necessário observar a frequência e distribuição de polimorfismos de interesse médico que estão envolvidos em transtornos psiquiátricos, ou outros distúrbios complexos, como distúrbios alimentares e TOC. Evidenciando que estudos genéticos com polimorfismos nos genes circadianos são potenciais marcadores genéticos de preferência matutina vespertina, assim como os genes associados indiretamente ao ritmo circadiano são de grande interesse em outros efeitos genéticos nos ritmos circadianos (ZOU et al., 2022; ZALMBACH et al., 2022).

6. CONCLUSÃO

O presente estudo teve como objetivo investigar a associação entre o polimorfismo *HTR2A* -1438A/G (rs6311) e a preferência matutina-vespertina em uma população masculina jovem. Conforme evidenciado na literatura citada, é importante ressaltar que a característica cronotípica é de natureza complexa, sendo influenciada por diversos fatores, sejam eles de origem biológica, genética e/ou ambiental, além de estar sujeito a interferências sociais.

Nesse sentido, foi possível concluir que não foi identificada uma relação genética específica do polimorfismo estudado que contribua com a definição do cronotipo. Contudo, é sabido que estudos que realizem a associação de mais de um SNP em genes receptores da serotonina podem responder com mais robustez evidências acerca da contribuição genética frente às funções cronobiológicas, e trazer melhores esclarecimentos sobre essa relação.

REFERÊNCIAS

- ABDOLMALEKY, Hamid Mostafavi et al. Meta-analysis of association between the T102C polymorphism of the 5HT2a receptor gene and schizophrenia. **Schizophrenia research**, v. 67, n. 1, p. 53-62, 2004.
- ADAN, Ana et al. Circadian typology: a comprehensive review. **Chronobiology international**, v. 29, n. 9, p. 1153-1175, 2012.
- ADAN, Ana; NATALE, Vincenzo. Gender differences in morningness–eveningness preference. **Chronobiologyinternational**, v. 19, n. 4, p. 709-720, 2002.
- ALAM, Marilene Farias et al. Caracterização e distribuição de cronotipos no sul do Brasil: diferenças de gênero e estação de nascimento. **Jornal Brasileiro de Psiquiatria**, v. 57, p. 83-90, 2008.
- BARNES, J. J. et al. Training working memory in childhood enhances couplin between frontoparietal control network and task-related regions. **Journal of Neuroscience**, v. 36, n. 34, p. 9001–9011, 2016.
- BERGER, Miles; GRAY, John A.; ROTH, Bryan L. The expanded biology of serotonin. **Annual review of medicine**, v. 60, p. 355-366, 2009.
- BOCCHIO, M. et al. Serotonin, amygdala and fear: assembling the puzzle. **Front Neural Circuits**. v5 , p. 10: 24. 2016.
- CARNEY, Colleen E. et al. The consensus sleep diary: standardizing prospective sleep self-monitoring. **Sleep**, v. 35, n. 2, p. 287-302, 2012.
- CHEN, Kevin et al. The human 5-HT2 receptor is encoded by a multiple intron—exongene. **Molecular brain research**, v. 14, n. 1-2, p. 20-26, 1992.
- CERMAKIAN, Nicolas; BOIVIN, Diane B. A molecular perspective of human circadian rhythm disorders. **Brain Research Reviews**, v. 42, n. 3, p. 204-220, 2003.
- COOK, E.H.; FLETCHER, K.E.; WAINWRIGHT, M.; MARKS, N.; YAN, S.Y.; LEVENTHAL, B.L. Primary structure of the human platelet serotonin 5-HT2 receptor: identity with frontal cortex serotonin 5-HT2A receptor. **Journal of Neurochemistry**, v. 63, p. 465-469, ago. 1994.
- DE MARTINO, Milva Maria Figueiredo; CEOLIM, Maria Filomena. Avaliação do cronótipo de um grupo de enfermeiros de hospitais de ensino. **Revista de Ciências Médicas**, v. 10, n. 1, 2001.
- DUARTE, Leandro Lourenção. Cronotipos humanos. 2018.
- DUNLAP, Jay C. Molecular bases for circadianclocks. **Cell**, v. 96, n. 2, p. 271-290, 1999.
- FITCH, A. et al. Off to a good start: The early development of the neural substrates

underlying visual working memory. **Frontiers in Systems Neuroscience**, v. 10, n. AUG, 2016.

EBISAWA, Takashi et al. Association of structural polymorphisms in the human period3 gene with delayed sleep phase syndrome. **EMBO reports**, v. 2, n. 4, p. 342-346, 2001.

EKMAN, M. et al. Different roles of direct and indirect frontoparietal pathways for individual working memory capacity. **Journal of Neuroscience**, v. 36, n. 10, p. 2894–2903, 2016.

EL-MERAHBI, Rabih et al. The roles of peripheral serotonin in metabolic homeostasis. **FEBS letters**, v. 589, n. 15, p. 1728-1734, 2015.

ENOCH, M. A. et al. Association between seasonal affective disorder and the 5-HT2A promoter polymorphism– 1438G/A. **Molecular psychiatry**, v. 4, n. 1, p. 89-92, 1999.

ERIKSSON, J. et al. Neurocognitive Architecture of Working Memory. **Neuron**, v. 88, n. 1, p. 33–46, 2015

ERSPAMER, V.; ASERO, B. Identification of enteramine, the specific hormone of the enterochromaffin cell system, as 5-hydroxytryptamine. **Nature**, v. 169, n. 4306, p. 800-801, 1952.

FEIJÓ, Fernanda de Matos; BERTOLUCI, Marcello Casaccia; REIS, Cíntia. Serotonina e controle hipotalâmico da fome: uma revisão. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 57, p. 74-77, 2011.

FIDALGO, Sara; IVANOV, Dobril K.; WOOD, Shona H. Serotonin: from top to bottom. **Biogerontology**, v. 14, p. 21-45, 2013.

FITCH, Allison et al. Off to a good start: The early development of the neural substrates underlying visual working memory. **Frontiers in Systems Neuroscience**, v. 10, p. 68, 2016.

GERSHON, M. D.; TACK, J. The Serotonin Signaling System: From Basic Understanding To Drug Development for Functional GI Disorders. **Gastroenterology**, v. 132, n. 1, p. 397–414, 2007.

GOLOMBEK, Diego A.; ROSENSTEIN, Ruth E. Physiology of circadian entrainment. **Physiological reviews**, v. 90, n. 3, p. 1063-1102, 2010.

GONZÁLEZ-TAPIA, María Isabel; OBSUTH, Ingrid. “Bad genes” & criminal responsibility. **International journal of law and psychiatry**, v. 39, p. 60-71, 2015.

HOLMES, Clive et al. 5-HT2A and 5-HT2C receptor polymorphisms and psychopathology in late onset Alzheimer's disease. **Human Molecular Genetics**, v. 7, n. 9, p. 1507-1509, 1998.

HORNE, Jim A.; OSTBERG, Olov. A self-assessment questionnaire to determine morningness-eveningness in human circadian rhythms. **International journal of chronobiology**, v. 4, n. 2, p. 97-110, 1976.

JENKINS, T.A.; NGUYEN, J.C.; POLGLAZE, K.E.; BERTRAND, P.P. Influence of tryptophan and serotonin on mood and cognition with a possible role of the gut **Brain Axis. Nutrients**. v.8, n.1, 2016

KALMBACH, David A. et al. Genetic basis of chronotype in humans: insights from three landmark GWAS. **Sleep**, v. 40, n. 2, p. zsw048, 2017.

KANDEL E. R.; SCHWARTZ J. H.; JESSELL T. M. **Principles of Neural Science**. 4th ed. McGraw-Hill, New York, 2000.

KAUFMANN, Christopher N. et al. Daytime midpoint as a digital biomarker for chronotype in bipolar disorder. **Journal of affective disorders**, v. 241, p. 586-591, 2018.

KENDIG DM1, GRIDER JR1. Serotonin and colonic motility. **Neurogastroenterol Motil**. v.27, n.7, p.899-905, 2015

KIM, J.; DELCASSO, S.; LEE, I. Neural correlates of object-in-place learning in hippocampus and prefrontal cortex. **The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience**. 31(47): 16991–17006, 2011.

KING, David P.; TAKAHASHI, Joseph S. Molecular genetics of circadian rhythms in mammals. **Annual review of neuroscience**, v. 23, n. 1, p. 713-742, 2000.

KOBAYASHI, Toshihiro et al. Reproducing infra-slow oscillations with dopaminergic modulation. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 2411, 2017.

LAMP, Gemma et al. Mapping of the underlying neural mechanisms of maintenance and manipulation in visuo-spatial working memory using an n-back mental rotation task: A functional magnetic resonance imaging study. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 10, p. 87, 2016.

LASKY-SU, Jessica A. et al. Meta-analysis of the association between two polymorphisms in the serotonin transporter gene and affective disorders. **American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics**, v. 133, n. 1, p. 110-115, 2005.

LOPES, Thayson R. **Análise do perfil genético da população do estado do Piauí por marcadores informativos de ancestralidade**. Dissertação de mestrado em Biotecnologia, Universidade Federal do Piauí, Parnaíba, p. 101, 2013.

LOPES, Thayson R et al. Population data of the 46 insertion–deletion (INDEL) loci in population in Piauí State, Northeastern Brazil. **Forensic Science International: Genetics**, v. 9, p. e13-e15, 2014.

LOWREY, Phillip L. et al. Positional syntenic cloning and functional characterization of the mammalian circadian mutation tau. **Science**, v. 288, n. 5465, p. 483-491, 2000.

LYALL, Laura M. et al. Association of disrupted circadian rhythmicity with mood disorders, subjective wellbeing, and cognitive function: a cross-sectional study of 91 105 participants from the UK Biobank. **The Lancet Psychiatry**, v. 5, n. 6, p. 507-514, 2018.

MAFFIOLETTI, Elisabetta et al. Association study between HTR2A rs6313 polymorphism and early response to risperidone and olanzapine in patients with schizophrenia. **Drug Development Research**, v. 81, no. 6, pg. 754-761, 2020.

MENESES, A. Serotonin, neural markers, and memory. **Front Pharmacol**. v.21, 2015

MEYER-BERNSTEIN, Elizabeth L.; MORIN, Lawrence P. Differential serotonergic innervation of the suprachiasmatic nucleus and the intergeniculate leaflet and its role in circadian rhythm modulation. **Journal of Neuroscience**, v. 16, n. 6, p. 2097-2111, 1996.

MONGRAIN, Valérie; PAQUET, Jean; DUMONT, Marie. Contribution of the photoperiod at birth to the association between season of birth and diurnal preference. **Neuroscienceletters**, v. 406, n. 1-2, p. 113-116, 2006.

MONTARULI, Angela et al. Biological rhythm and chronotype: new perspectives in health. **Biomolecules**, v. 11, n. 4, p. 487, 2021.

MORMONT, Marie-Christine; WATERHOUSE, Jim. Contribution of the rest–activity circadian rhythm to quality of life in cancer patients. **Chronobiology international**, v. 19, n. 1, p. 313-323, 2002.

NICHOLS, David E.; NICHOLS, Charles D. Serotonin receptors. **Chemical reviews**, v. 108, n. 5, p. 1614-1641, 2008.

NUNES, Leandro Silva. Variações nos genes HTR2A e HTR2B e suas contribuições para traços fenotípicos táxon-específicos. 2018.

OH, C.M.; PARQUE, S.; KIM, H. Serotonin as a New Therapeutic Target for Diabetes Mellitus and Obesity. **Diabetes Metab J**. v.40, n.2, p.89-98, 2016.

OKATY, Benjamin W.; COMMONS, Kathryn G.; DYMECKI, Susan M. Embracing diversity in the 5-HT neuronal system. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 20, n. 7, p. 397-424, 2019.

PAES, L. A. **Associação entre polimorfismos do gene do receptor de serotonina HTR2C e sintomas psicopatológicos em crianças e adolescentes**. [s.l.] Universidade Estadual de Campinas, 2017.

PARSONS, Michael J. et al. The-1438A/G polymorphism in the 5-hydroxytryptamine type 2A receptor gene affects promoter activity. **Biological psychiatry**, v. 56, n. 6, p. 406-410, 2004.

PAUL, Ketema N. Serotonin and sleep: breaking the cycle (Commentary on Nakamaru-Ogiso et al.). **European Journal of Neuroscience**, v. 35, n. 11, p. 1761-1761, 2012.

POUGET, Jennie G. et al. Pharmacogenetics and out come with antipsychotic drugs. **Dialogues in clinical neuroscience**, 2022.

RAPPORT MM. Serum vasoconstrictor (serotonin) the presence of creatinine in the complex; a proposed structure of the vasoconstrictor principle. **J Biol Chem**. 180(3):961-9.1949

ROENNEBERG, Till; WIRZ-JUSTICE, Anna; MERROW, Martha. Life between clocks: daily temporal patterns of human chronotypes. **Journal of biological rhythms**, v. 18, n. 1, p. 80-90, 2003.

ROGERS, R.D. The roles of dopamine and serotonin in decision making: evidence from pharmacological experiments in humans. **Neuropsychopharmacology**. v.36. n.1, p.11432, 2011.

ROHLFS, Izabel Cristina Provenza de Miranda et al. Relação da síndrome do excesso de treinamento com estresse, fadiga e serotonina. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 11, p. 367-372, 2005.

RUBLE, Cara L. et al. Genomic structure and expression of the human serotonin 2A receptor gene (HTR2A) locus: identification of novel HTR2A and antisense (HTR2A-AS1) exons. **BMC genetics**, v. 17, p. 1-15, 2016.

SAVITZ, Jonathan B.; RAMESAR, Rajkumar S. Genetic variants implicated in personality: a review of the more promising candidates. **American journal of medical genetics Part B: Neuropsychiatric genetics**, v. 131, n. 1, p. 20-32, 2004.

SCHAAN, Ana Paula et al. mtDNA structure: the women who formed the Brazilian Northeast. **BMC Evolutionary Biology**, v. 17, p. 1-12, 2017.

SEN, Srijan; BURMEISTER, Margit; GHOSH, Debashis. Meta-analysis of the association between a serotonin transporter promoter polymorphism (5-HTTLPR) and anxiety-related personality traits. **American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics**, v. 127, n. 1, p. 85-89, 2004.

SŁAWIŃSKA, U.; MIAZGA. K.; JORDAN, L.M. The role of serotonin in the control of locomotor movements and strategies for restoring locomotion after spinal cord injury. **Acta Neurobiol Exp (Wars)**. v.74, n.2, p.172-87, 2014.

SMITH, Carlla S.; REILLY, Christopher; MIDKIFF, Karen. Evaluation of three circadian rhythm questionnaires with suggestions for an improved measure of morningness. **Journal of Applied psychology**, v. 74, n. 5, p. 728, 1989.

SOUSA, Vanessa G. **Polimorfismos nos genes *HTR1A* e *HTR2A* influenciam o recrutamento de memória do trabalho visoespacial no cortex frontoparietal.** Dissertação de mestrado em Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Delta do Parnaíba, Campus Ministro Reis Velloso, Parnaíba, P. 91.2021.

SPIES, Marie et al. Common HTR2A variants and 5-HTTLPR are not associated with human in vivo serotonin 2A receptor levels. **Human Brain Mapping**, v. 41, n. 16, p. 4518-4528, 2020.

STROBEL, A. et al. Allelic variation in 5-HT 1A receptor expression is associated with anxiety-and depression-related personality traits. **Journal of neural transmission**, v. 110, p. 1445-1453, 2003.

TAYLOR, Briana J.; HASLER, Brant P. Chronotype and mental health: recent advances. **Current psychiatry reports**, v. 20, p. 1-10, 2018.

TEVY, Maria Florencia et al. Aging signaling pathways and circadian clock-dependent metabolic derangements. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 24, n. 5, p. 229-237, 2013.

TRANAH, Gregory J. et al. Circadian activity rhythms and risk of incident dementia and mild cognitive impairment in older women. **Annals of neurology**, v. 70, n. 5, p. 722-732, 2011.

TWAROG, Betty M.; PAGE, Irvine H. Serotonin content of some mammalian tissues and urine and a method for its determination. **American Journal of Physiology-Legacy Content**, v. 175, n. 1, p. 157-161, 1953.

VALZELLI, L.; GARATTINI, S. Behavioral changes and 5-hydroxytryptamine turnover in animals. In: **Advances in pharmacology**. Academic Press, 1968. p. 249-260.

VAN OEKELEN, Dirk; LUYTEN, Walter HML; LEYSEN, Josée E. 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors and their atypical regulation properties. **Life sciences**, v. 72, n. 22, p. 2429-2449, 2003.

WALITZA, S. et al. Transmission disequilibrium studies in children and adolescents with obsessive-compulsive disorders pertaining to polymorphisms of genes of the serotonergic pathway. **Journal of neural transmission**, v. 111, p. 817-825, 2004.

WELSH JH (1968) Distribution of serotonin in the nervous system of various animal species. **Adv Pharmacol.** 6(Pt A):171-88.

WU, Karen et al. Gender interacts with opioid receptor polymorphism A118G and serotonin receptor polymorphism– 1438 A/G on speed-dating success. **Human Nature**, v. 27, p. 244-260, 2016.

YABUT, Julian M. et al. Emerging roles for serotonin in regulating metabolism: new implications for an ancient molecule. **Endocrine reviews**, v. 40, n. 4, p. 1092-1107, 2019.

YEOM, Ji Won et al. Association of the serotonin 2A receptor rs6311 polymorphism with diurnal preference in Koreans. **Psychiatry Investigation**, v. 17, n. 11, p. 1137, 2020.

ZAVADA, Andrei et al. Comparison of the Munich Chronotype Questionnaire with the Horne-Östberg's morningness-eveningness score. **Chronobiology international**, v. 22, n. 2, p. 267-278, 2005.

ZOU, Haowen et al. Chronotype, circadian rhythm, and psychiatric disorders: Recent evidence and potential mechanisms. **Frontiers in Neuroscience**, v. 16, p. 811771, 2022.

APÊNDICE

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Prezado,

Convidamos você a participar voluntariamente de nossa pesquisa, respondendo os questionários de avaliação psicológica, fazendo atividade de avaliação da percepção do tempo associada ao mapeamento cerebral por eletroencefalografia e disponibilizando uma amostra de material de origem biológica (sangue periférico) para a pesquisa **“Influência genética e do ritmo circadiano sobre a percepção do tempo e comportamento do córtex cerebral”**, realizada na Universidade Federal do Piauí (UFPI). Em caso de recusa você não será penalizado(a) de forma alguma. Leia atentamente as considerações do trabalho e assine o final caso se sinta à vontade em participar:

Objetivo: Eu entendo que a pesquisa tem como finalidade avaliar se o desempenho na percepção temporal, atividade eletrofisiológica cerebral, polimorfismos genéticos e ritmo circadiano. Uma amostra de sangue minha será obtida por meio de punção venosa, de forma asséptica e executada por profissionais treinados, para que possa ser extraído DNA para a valiação de polimorfismos associados ao sistema dopaminérgico, serotoninérgico, gabaérgico e de genes associado ao ciclo circadiano (Clock Genes). Também executarei atividades de percepção temporal em frente ao computador, enquanto minha atividade elétrica cortical será avaliada por intermédio de uma técnica não invasiva e indolor chamada eletroencefalograma. Também responderei questionários relacionados a escalas de variáveis psicológicas (ansiedade, depressão, memória, nível de atenção e hiperatividade).

Participação no estudo: Para participar deste estudo afirmo que tenho idade entre 18 e 32 anos, não fiz uso de produtos com cafeína há mais de 12 horas e não estou utilizando medicamentos controlados. Não terei custo ao participar deste projeto, como também não receberei pagamento ou qualquer gratificação financeira. Caso me sinta lesado, poderei pleitear, junto aos órgãos competentes, indenização, que será concedida por determinação legal, caso seja comprovado a ocorrência de eventuais danos decorrentes da minha participação neste projeto. Minhas informações pessoais serão mantidas em sigilo, sendo minha identidade preservada.

Detalhamento da técnica: Entendo que a punção venosa é uma técnica que utiliza seringa para obter uma pequena amostra de sangue. Ela é realizada de forma asséptica, para evitar infecção. Apesar de causar incômodo durante a coleta, ela é uma técnica segura quando executada por profissionais. A eletroencefalografia é um exame seguro, indolor e não invasivo, onde eletrodos são devidamente colocados sobre a superfície da

cabeça como intuito de registrar a atividade elétrica cerebral. A tarefa de percepção temporal também é um método seguro e não invasivo, será realizada enquanto a minha atividade elétrica cerebral é avaliada, onde apertarei teclas ou usarei o *mouse* do computador para executar as tarefas, que serão devidamente explicadas pelos pesquisadores e que não demandam esforço.

Confidencialidade: Eu entendo que todas as informações coletadas no estudo são confidenciais e que meu nome não será divulgado em momento algum. Entendo ainda que toda e qualquer informação será utilizada somente para fins acadêmicos. Os resultados do estudo serão publicados em revistas científicas e meu nome em nenhum momento será citado. Os materiais concedidos ficarão sob a guarda da Universidade Federal do Piauí, *Campus* Ministro Reis Velloso (UFPI — CMRV), sob cuidados dos responsáveis pela pesquisa, e poderei solicitar a eliminação do material em qualquer segmento da pesquisa.

Riscos: Entendo que a coleta sanguínea pode causar dor, o que será evitado por meio da experiência dos profissionais. A coleta também pode causar incômodo local após o procedimento e raramente pode causar inflamação e infecção, o que será evitado utilizando técnicas de assepsia da região antes da obtenção do sangue. Também entendo que o período de coleta dos dados é estimado em 55 minutos, o que poderá causar incômodo devido ao tempo na posição sentado. Para evitar esses efeitos posso interromper a coleta de dados em qualquer momento que eu apresente dor devido à postura continuada. Poderei me incomodar com as perguntas referentes às variáveis psicológicas, porém estou ciente que os profissionais que as executam estão treinados e manterão a confidencialidade. Caso ocorra qualquer alteração, poderei ser encaminhado pelo pesquisador para acompanhamento médico. Além disso, o pesquisador responsável ao perceber qualquer risco ou dano significativo do participante comunicará imediatamente ao Sistema CEP/CONEP. Porém, em todo momento serão consideradas minhas dimensões física, psíquica, moral, intelectual, social, cultural ou espiritual.

Benefícios: Entendo que, apesar de não me beneficiar diretamente, a presente pesquisa trará conhecimento sobre uma área pouco conhecida, que são as diferenças interindividuais da percepção temporal. De tal modo, poderei contribuir para o entendimento de como funciona esse mecanismo, o que poderá ajudar pessoas que possuem essa percepção alterada em muitas doenças, contribuindo para seu entendimento, o que poderá levar a trazer novas abordagens terapêuticas no futuro.

Liberdade para interromper a participação: Sou livre para desautorizar o uso da minha amostra biológica, dos dados eletroencefalográficos e das informações obtidas em escalas psicológicas a qualquer momento, sem qualquer prejuízo ou penalização às partes envolvidas.

Este termo de Consentimento Livre e Esclarecido é feito em duas vias, sendo uma para o participante e a outra para o pesquisador. Em caso de dúvidas quanto aos seus direitos como voluntário de pesquisa, entre em contato com o CEP-UFPI, em Parnaíba-PI, que é o órgão responsável por garantir os cuidados éticos das pesquisas realizadas como seu material:

Comitê de Ética em Pesquisa - UFPI - Parnaíba
Campus Universitário Ministro Reis Velloso
Av. São Sebastião, 2819, Parnaíba, Piauí, CEP 64.202-020
Telefone: (86) 3323-5125

Os responsáveis pela pesquisa podem ser contatados pelos telefones (86) 9839-2898 ou (86) 8837- 4232 ou pelos emails: pintogr@gmail.com ou silmarteixeira@ufpi.edu.br.

Diante dessas informações, declaro meu consentimento livre para ceder o material de origem biológica e de outras informações para a pesquisa **“Influência genética e do ritmo circadiano sobre a percepção do tempo e comportamento do córtex cerebral”**.

Parnaíba-PI, _____ de _____ de 20____

Voluntário(nome completo): _____

Voluntário

Pesquisador responsável

ANEXO 1

INVENTÁRIO DE EDINBURGH

Nome: _____ Formulário: _____

Idade: _____ Sexo: _____

Data: _____ Resultado: _____ (_____).

Checado por: _____

PERGUNTAS	E	D
PRIMEIRA PARTE		
Que mão você usa:		
1 - Para lançar?		
2 - Para escrever?		
3 - Para desenhar?		
4 - Para jogar tênis ou pingue-pongue?		
5 - Para usar a tesoura?		
6 - Para usar o barbeador ou passar batom?		
7 - Para se pentear?		
8 - Para escovar os dentes?		
9 - Para usar uma faca sem ser para comer (cortar um barbante, apontar um lápis)?		
10 - Para comer com uma colher?		
11 - Para martelar?		
12 - Para usar a chave de fenda?		
SEGUNDA PARTE		
13 - Com que mão você segura uma faca para comer, ao mesmo tempo que o garfo?		
14 - Se você tiver duas malas, com que mão segura a mais pesada?		
15 - Ao varrer, qual a mão que fica por cima, no cabo da vassoura?		
16 - E no cabo do ancinho (ciscador)?		
17 - Que mão você usa para desenroscar a tampa de um frasco?		
18 - Com que mão você segura o fósforo para acendê-lo?		
19 - Com que mão você distribui as cartas do baralho?		
20 - Com que mão você segura a linha para enfiar no buraco da agulha?		
TERCEIRA PARTE		
21 - Com qual pé você prefere chutar?		
22 - Que olho você usa quando precisa usar apenas um dos olhos?		
TOTAL		

Adaptado de Oldfield (1971).

ANEXO 2
QUESTIONARIO DE MATUTINIDADE-VESPERTINIDADE
Versão de Auto-Avaliação (MEQ-SA)¹

Nome: _____ Data: _____

Para cada questão, por favor selecione a resposta que melhor descreve você checando o ícone correspondente. Faça seus julgamentos baseado em como você tem se sentindo nas semanas recentes.

1. *Aproximadamente* que horário você acordaria se estivesse inteiramente livre para planejar seu dia?

- [5] 05:00–06:30 h
- [4] 06:30–07:45 h
- [3] 07:45–09:45 h
- [2] 09:45–11:00 h
- [1] 11:00–12:00 h

2. *Aproximadamente* em que horário você iria deitar caso estivesse inteiramente livre para planejar sua noite?

- [5] 20:00–21:00 h
- [4] 21:00–22:15 h
- [3] 22:15–00:30 h
- [2] 00:30–01:45 h
- [1] 01:45–03:00 h

3. Caso você usualmente tenha que acordar em um horário específico pela manhã, quanto você depende de um alarme?

- [4] Nem um pouco
- [3] Razoavelmente
- [2] Moderadamente
- [1] Bastante

¹Algumas questões e escolhas dos itens foram rephraseadas do instrumento original (Horne e Östberg, 1976) para conformar com o inglês americano. Discretas escolhas de itens foram substituídos por escalas gráficas contínuas. Preparadas por Terman M, Rifkin JB, Jacobs J, White TM. New York State Psychiatric Institute, 1051 Riverside Drive, Unit 50, New York, NY, 10032. Apoiado pelo NIH Grant MH42931. *Veja também:* versão automática (AutoMEQ) em www.cet.org. Ver. 8/09.

Horne JA and Östberg O. A self-assessment questionnaire to determine morningness-eveningness in humancircadian rhythms. *International Journal of Chronobiology*, 1976: 4, 97-100.

4. Quão fácil você acha que é para acordar pela manhã (quando você não é despertado inesperadamente)?

- [1] Muito difícil
- [2] Razoavelmente difícil
- [3] Razoavelmente fácil
- [4] Muito fácil

5. Quão alerta você se sente durante a primeira meia hora depois que você acorda pela manhã?

- [1] Nem um pouco alerta
- [2] Razoavelmente alerta
- [3] Moderadamente alerta
- [4] Muito alerta

6. Quanta fome você sente durante a primeira meia hora depois que você acorda?

- [1] Nem um pouco faminto
- [2] Razoavelmente faminto
- [3] Moderadamente faminto
- [4] Muito faminto

7. Durante a primeira meia hora depois que você acorda pela manhã, como você se sente?

- [1] Muito cansado
- [2] Razoavelmente cansado
- [3] Moderadamente desperto
- [4] Muito desperto

8. Caso você não tenha compromissos no dia seguinte, em que horário você iria deitar comparado com seu horário de dormir usual?

- [4] Raramente ou nunca mais tarde
- [3] Menos que uma 1 hora mais tarde
- [2] 1-2 horas mais tarde
- [1] Mais de 2 horas mais tarde

9. Você decidiu fazer atividade física. Um amigo sugere que faça isso por uma hora duas vezes por semana, e o melhor horário para ele é entre 7-8hs. Tendo em mente nada a não ser seu próprio “relógio” interno, como você acha que seria seu desempenho?

- [4] Estaria em boa forma
- [3] Estaria razoavelmente em forma
- [2] Acharia difícil
- [1] Acharia muito difícil

10. Em *aproximadamente* que horário da noite você se sente cansado, e, como resultado, necessitando de sono?

- [5] 20:00–21:00 h
- [4] 21:00–22:15 h
- [3] 22:15–00:45 h
- [2] 00:45–02:00 h
- [1] 02:00–03:00 h

11. Você quer estar no seu melhor desempenho para um teste que você sabe que será mentalmente exaustivo e durará duas horas. Você está inteiramente livre para planejar seu dia. Considerando apenas seu “relógio” interno, qual desses quatro horários de teste você escolheria?

- [6] 08–10 h
- [4] 11–13 h
- [2] 15–17 h
- [0] 19–21 h

12. Caso você tivesse que se deitar as 23:00hs, quão cansado você estaria?

- [0] Nem um pouco cansado
- [2] Um pouco cansado
- [3] Moderadamente cansado
- [5] Muito cansado

13. Por alguma razão, você se deitou na cama várias horas depois que o usual, mas não há necessidade para acordar em um horário específico na manhã seguinte. Qual dos seguintes você mais provavelmente faria?

- [4] Acordarei no horário usual, mas não voltaria a dormir
- [3] Acordarei no horário usual e depois iria cochilar
- [2] Acordarei no horário usual, mas iria voltar a dormir
- [1] Não acordaria até mais tarde que o usual

14. Em uma noite, você tem de ficar acordado entre as 04:00-06:00hs, para realizar um plantão noturno. Você não tem compromissos com horários no dia seguinte. Qual das alternativas melhor se adequaria para você?

- [1] Não iria para cama até o plantão ter terminado
- [2] Teria um cochilo antes e dormiria depois
- [3] Teria um bom sono antes e um cochilo depois
- [4] Dormiria somente antes do plantão

15. Você tem duas horas de atividade física pesada. Você está inteiramente livre para planejar seu dia. Considerando apenas seu “relógio” interno, qual dos seguintes horários você iria escolher?

- [4] 08–10 h
- [3] 11–13 h
- [2] 15–17 h
- [1] 19–21 h

16. Você decidiu fazer atividade física. Uma amiga sugere que faça isso por uma hora duas vezes por semana, e o melhor horário para ela é entre 22:00- 23:00hs. Tendo em mente apenas seu próprio “relógio” interno, como você acha que seria seu desempenho?

- [1] Estaria em boa forma
- [2] Estaria razoavelmente em forma
- [3] Acharia difícil
- [4] Acharia muito difícil

17. Suponha que você pode escolher seus próprios horários de trabalho. Assuma que você trabalha um dia de cinco horas (incluindo intervalos), seu trabalho é interessante e você é pago baseado no seu desempenho. Em *aproximadamente* que horário você escolheria começar?

- [5] 5 horas começando entre 05–08 h
- [4] 5 horas começando entre 08–09 h
- [3] 5 horas começando entre 09–14 h
- [2] 5 horas começando entre 14–17 h
- [1] 5 horas começando entre 17–04 h

18. Em *aproximadamente* que horário do dia você se sente no seu melhor?

- [5] 05–08 h
- [4] 08–10 h
- [3] 10–17 h
- [2] 17–22 h
- [1] 22–05 h

19. Um escuta sobre “tipos matutinos” e “tipos vespertinos”, qual desses tipos você se considera sendo?

- [6] Definitivamente um tipo matutino
- [4] Mais um tipo matutino que um tipo vespertino
- [2] Mais um tipo vespertino que um tipo matutino
- [1] Definitivamente um tipo vespertino

_____ Pontuação total para todas as 19 questões

Nota:

Tradutor da versão em inglês
para português: Sarah Chellappa, MD.

Centre for
Chronobiology Psychiatric
University Clinics Basel –
Switzerland

INTERPRETANDO E UTILIZANDO SUA PONTUAÇÃO DE MATUTINIDADE-VESPERTINIDADE

Este questionário tem 19 questões, cada qual com um número de pontos. Primeiro, some

os pontos que você circulou e coloque sua pontuação total de matutividade-vespertinidade aqui:

Pontuações podem variar entre 16-86. Pontuações de 41 e abaixo indicam “tipos vespertinos”. Pontuações de 59 e acima indicam “tipos matutinos”. Pontuações entre 42-58 indicam “tipos intermediários”.

16-30	31-41	42-58	59-69	70-86
Definitivamente vespertino	Vespertino moderado	Intermediário	Matutino moderado	Definitivamente matutino

Ocasionalmente, uma pessoa tem problema com este questionário. Por exemplo, algumas das questões são difíceis de responder se você tem estado em um trabalho em turno, se você não trabalha ou se seu horário de dormir é muito tarde. Suas respostas podem ser influenciadas por uma doença ou medicações que esteja tomando. *Se você não está confiante sobre suas respostas, você também não deve estar confiante sobre o conselho que se segue.*

Uma forma de checar isso é perguntar se sua pontuação de matutividade-vespertinidade aproximadamente se equivale ao início do sono e os horários de despertar listados abaixo:

Pontuação	16-30	31-41	42-58	59-69	70-86
Início do sono	02:00-03:00hs.	00:45-02:00hs.	22:45 PM-00:45hs.	21:30-22:45hs.	21:00-21:30hs.
Despertar	10:00-11:30hs.	08:30-10:00hs.	06:30-08:30hs.	05:00-06:30hs.	04:00-05:00hs.

Se o seu início de sono habitual é anterior a 21:00hs ou posterior a 03:00hs, ou se seu horário de despertar é anterior a 04:00hs ou posterior a 11:30hs, você deve buscar o auxílio de um clínico em terapia de luz para proceder efetivamente com o tratamento.

Nós usamos a pontuação de matutividade-vespertinidade para melhorar o efeito antidepressivo da terapia de luz. Apesar de a maioria das pessoas apresentaram boa resposta antidepressiva à terapia de luz quando tem sessões regulares pela manhã utilizando 10,000 lux de dispositivo de luz branca (*veja www.cet.org para recomendações*) por 30 minutos, geralmente isso poderá não oferecer a melhor resposta possível. Se seu relógio interno está deslocado em relação ao horário externo (como medido indiretamente pela sua pontuação de matutividade-vespertinidade), o timing da terapia de luz necessita ser ajustado.

A tabela abaixo mostra o tempo de início recomendado para terapia de luz para uma ampla faixa de pontuações de matutividade-vespertinidade. Se sua pontuação cair para além dessa faixa (ou muito abaixo ou muito acima), você deve buscar o auxílio de um clínico de terapia de luz para proceder efetivamente com o tratamento.

Pontuação de matutinitade- vespertinidade	Tempo de início para 30 minutos de terapia de luz
23-26	08:15hs.
27-30	08:00hs.
31-34	07:45hs.
35-38	07:30hs.
39-41	07:15hs.
42-45	07:00hs.
46-49	06:45hs.
50-53	06:30hs.
54-57	06:15hs.
58-61	06:00hs.
62-65	05:45hs.
66-68	05:30hs.
69-72	05:15hs.
73-76	05:00hs.

Se você usualmente dorme acima de 7 horas por noite, você terá de acordar relativamente mais cedo que o normal para obter o efeito — mas você deve se sentir bem para fazer isso. Algumas pessoas compensam isso indo para cama mais cedo, enquanto outras se sentem bem dormindo menos. Se você usualmente dorme menos de 7 horas por noite, você poderá manter seu atual horário de despertar. Se você automaticamente se ve acordando mais de 30 minutos antes da sua sessão começar, você deve tentar mover a sessão para mais tarde. Evite ter sessões mais cedo que o recomendado, mas se você dormir para além do horário do seu despertador, é melhor ter a sessão mais tarde que pula-lo.

Nossa recomendação para tipos vespertinos — digamos, 08:00hs para uma pontuação de matutinitade-vespertinidade de 30 — pode fazer com que seja difícil trabalhar no horário estabelecido, contudo tomar a sessão de luz antes pode não ajudar. Uma vez que você tenha notado melhora no horário recomendado, contudo, você pode começar a sessão de terapia de luz 15 minutos mais cedo por dia, permitindo que seu relógio interno sincronize com meu ciclo de sono-vigília desejado e seu horário de trabalho.

O conselho personalizado que damos a você aqui é baseado em um enorme ensaio clínico de pacientes com transtorno afetivo sazonal (TAS) no Columbia University Medical Center em Nova Iorque. Pacientes que receberam luz muito tarde apresentaram apenas metade da melhora daqueles que receberam luz aproximadamente nos horários indicados acima. Estas diretrizes são não apenas para TAS, mas também podem ser úteis no tratamento de depressão não-sazonal, para reduzir insônia no horário de dormir e reduzir a necessidade de dormir mais pela manhã.

Nosso conselho serve apenas como uma diretriz geral para novos usuários de terapia de luz. Existem muitos fatores individuais que requerem horários diferentes ou dose (intensidade, duração) de luz. *Qualquer pessoa com depressão clínica deve proceder com terapia de luz somente com supervisão e monitoramento clínico.*

Referência: Terman M, Terman JS. Light therapy for seasonal and nonseasonal depression: efficacy, protocol, safety, and side effects. *CNS Spectrums*, 2005;10:647-663. (Download em www.cet.org)

Time de tradução: Sarah Chellappa M.D., Centre for Chronobiology, Psychiatric University Clinic, University of Basel, Switzerland.

Copyright © 2009, Center for Environmental Therapeutics, www.cet.org, New York, NY 10011 USA. Todos os direitos reservados. Permissão garantida para uso pessoal ou uso na prática clínica. Distribuição por entidades comerciais é proibida. Versão de janeiro de 2008.

