



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
CAMPUS MINISTRO REIS VELLOSO

ALYNE MONTEIRO MELO

**INFLUÊNCIA DOS POLIMORFISMOS rs25531 E rs25532 DO GENE *SLC6A4* NA
MODULAÇÃO DA FREQUÊNCIA DA BANDA TETA DO EEG DURANTE A
TAREFA DE PERCEPÇÃO TEMPORAL**

Parnaíba - PI

2019

ALYNE MONTEIRO MELO

**INFLUÊNCIA DOS POLIMORFISMOS rs25531 E rs25532 DO GENE *SLC6A4* NA
MODULAÇÃO DA FREQUÊNCIA DA BANDA TETA DO EEG DURANTE A
TAREFA DE PERCEPÇÃO TEMPORAL**

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

Orientador: Prof. Dr. Giovanny Rebouças
Pinto

Parnaíba - PI

2019

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial Prof. Cândido Athayde – Campus Parnaíba
Serviço de Processamento Técnico

M528i Melo, Alyne Monteiro

Influência dos polimorfismos rs25531 e rs25532 do gene *SLC6A4* na modulação da frequência da banda teta do EEG durante a tarefa de percepção temporal [recurso eletrônico] / Alyne Monteiro Melo. – 2019.

1 arquivo em pdf.

TCC (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal do Piauí, 2019.

Orientação: Prof. Dr. Giovanni Rebouças Pinto.

1. Percepção Temporal. 2. Reprodução de Tempo. 3. Gene *SLC6A4*. 4. Ciências biomédicas. II. Título.

CDD: 610

ALYNE MONTEIRO MELO

**INFLUÊNCIA DOS POLIMORFISMOS rs25531 E rs25532 DO GENE SLC6A4 NA
MODULAÇÃO DA FREQUÊNCIA DA BANDA TETA DO EEG DURANTE A
TAREFA DE PERCEPÇÃO TEMPORAL**

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

APROVADA EM: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Giovanny Rebouças Pinto
Presidente

Dr. Hygor Ferreira Fernandes
Membro

Bel. Vanessa Galeno de Sousa
Membro

À minha família, por todo amor e incentivo
que recebi. Ao meu marido, que com zelo
e dedicação esteve sempre ao meu lado.

À minha filha, seu sorriso foi farol em
meio a tempestade.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, doador de vida e paz, que em seu amor misericordioso me manteve firme no caminho do conhecimento. Foi na ciência onde mais encontrei a mão de Deus e onde pude admirar as maravilhas de sua criação.

Aos meus pais, agradeço pelo esforço e confiança depositados em mim e na minha educação. De origem humilde e simples vieram os melhores e mais acertados ensinamentos, que fizeram de mim a pessoa que sou hoje. Em nenhum livro, em nenhuma biblioteca ou sala de aula vou encontrar os princípios que os dois me ensinaram. Vocês me formaram para a vida, e a isso sou muito grata.

À minha irmã Flávia que sempre foi exemplo para mim. Seu empenho e amor pelos estudos tornaram-na a mais dedicada e admirável profissional que conheço. Vendo suas conquistas almejo as minhas.

Já se escuta a muito tempo que para se tornar realidade um sonho deve ser sonhado junto. Foi ao lado do meu marido Breno que, ao longo de todos esses anos, os meus sonhos se tornaram realidade. Agradeço por todo apoio, por cada abraço, por cada palavra de incentivo, que não me deixou desistir em frente aos obstáculos. Ainda tenho muitos sonhos e conto com seu amor para realiza-los.

Ao Prof. Giovanni Pinto, agradeço pela oportunidade de ter sido sua aluna de iniciação científica e sua orientanda. Em sala de aula ou no laboratório, sua metodologia e amplo conhecimento me inspiram a ser uma excelente profissional. Sempre correto e acessível entendia não só minhas necessidades acadêmicas, mas também pessoais. Estendo meus agradecimentos também à Prof^a Keiko Yoshioka, que foi a primeira porta para a iniciação científica. Obrigada por acreditar em mim e me estender a mão, dando assim um voto de confiança e credibilidade.

A todos os demais professores do curso de Biomedicina e aos meus colegas de graduação, agradeço pelo conhecimento e experiências compartilhadas. O caminho do pensamento nunca deve ser trilhado sozinho e que bom que vocês estiveram comigo. É possível que nessa fase cada um siga por uma estrada diferente, mas com certeza todos, cada um à sua maneira, foram importantes para que eu chegasse até aqui.

Agradeço aos meu colegas dos laboratórios de Genética e Biologia Molecular e Neuro-Inovação e Tecnologia. Aqui perco as palavras. Não consigo transcrever em

papel todo o meu agradecimento. Hygor, Hoanna, Vanessa e Andréia, obrigada por me receberem tão bem no laboratório. Agradeço a paciência em me ensinar e retirar minhas dúvidas. Falando em paciência, agradeço ao Francisco Carlos, que não estabeleceu nem dia nem hora para me ajudar. Carlinhos, você foi aquele cérebro amigo para todas as horas. Esse trabalho não poderia ter sido concluído sem cada um de vocês e em especial ao Vitor, que com grande socorro colaborou para a obtenção dos dados utilizados e análise da temível estatística. À todos que de maneira direta e indireta contribuíram com esse trabalho, meus sinceros agradecimentos.

Por fim, agradeço a Universidade Federal do Piauí e seus funcionários, que enriqueceram minha experiência acadêmica, e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo fomento à pesquisa, na qual encontrei uma paixão.

RESUMO

A maneira como o indivíduo percebe o tempo ao seu redor, influencia nas ações do mesmo, seja no espaço físico ou de modo cognitivo. Atividades básicas da rotina individual levam em consideração a percepção temporal para que se realizem de maneira efetiva. Alguns distúrbios como depressão e ansiedade podem levar a uma subestimação de tempo, onde os indivíduos com essas patologias tendem a perceber a passagem de tempo de maneira mais lenta. Neurotransmissores como a serotonina apresentam papel importante na manifestação dessas doenças e por isso tende-se relacionar a percepção temporal com neuromoduladores e seus polimorfismos. O gene *SLC6A4* codifica a proteína transportadora de serotonina (SERT), importante na recaptação dessa molécula. Os polimorfismos rs25531 e rs25532 podem ser relacionados com as diferenças na estrutura desse receptor, o que influencia na capacidade de recaptação da serotonina, modulando seus efeitos no sistema nervoso central. Esse trabalho recrutou 158 voluntários entre 18 e 32 anos, sendo todos do sexo masculino e sem históricos de doenças neurológicas. Foram coletados os dados de eletroencefalograma desses indivíduos durante a tarefa de reprodução de tempo. As amostras de DNA foram coletadas e genotipadas utilizando a técnica de qPCR, e a partir da análise dos dois polimorfismos, observou-se que população se encontram em equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p > 0,05$). O polimorfismo rs25531 apresentou uma frequência alélica de 97% para o alelo A e de 3% para o alelo G, resultando numa frequência genotípica de 93% para A/A, 6% para A/G e 0% para G/G. Já o polimorfismo rs25532 apresentou uma frequência alélica de 96% para o alelo C e de 4% para o alelo T, resultando numa frequência genotípica de 92% para C/C, 7% para C/T e 1% para T/T. Os resultados comportamentais evidenciam um aumento no erro de execução de tarefas a medida que o intervalo de tempo aumenta, porém não se observou diferença significativa entre os grupos A/A vs. A/G + G/G ou C/C vs. C/T + T/T. Além disso não se observou diferenças na assimetria da banda teta do córtex pré-frontal desses voluntários, sugerindo que nenhum hemisfério predomina sobre o outro. Os resultados aqui obtidos sugerem que os polimorfismos rs25531 e rs25532, quando analisados isoladamente, não são capazes de interferir na percepção temporal individual, visto que esse comportamento complexo sofre influência de outros polimorfismos.

Palavras-chave: Percepção Temporal; Reprodução de Tempo; Gene *SLC6A4*; Polimorfismos rs25531 e rs25532.

ABSTRACT

The way the individual perceives the time around him influences his actions, either in physical space or cognitively. Basic activities of the individual routine take into account the temporal perception to be effectively performed. Some disorders such as depression and anxiety can lead to an underestimation of time, where individuals with these conditions tend to notice the passage of time more slowly. Neurotransmitters such as serotonin play an important role in the manifestation of these diseases and therefore tend to relate temporal perception with neuromodulators and their polymorphisms. The *SLC6A4* gene encodes the serotonin transporter protein (SERT), important in the reuptake of this molecule. The rs25531 and rs25532 polymorphisms may be related to differences in the structure of this receptor, which influences serotonin reuptake capacity, modulating its effects on the central nervous system. This study recruited 158 volunteers between 18 and 32 years of age, all male and with no history of neurological diseases. Electroencephalogram data were collected from these individuals during the time reproduction task. DNA samples were collected and genotyped using the qPCR technique, and from the analysis of the two polymorphisms, it was observed that population are in Hardy-Weinberg equilibrium ($p > 0.05$). The rs25531 polymorphism had an allele frequency of 97% for allele A and 3% for allele G, resulting in a genotypic frequency of 93% for A / A, 6% for A / G and 0% for G / G. The rs25532 polymorphism presented an allele frequency of 96% for the C allele and 4% for the T allele, resulting in a genotypic frequency of 92% for C / C, 7% for C / T and 1% for T / T. Behavioral results show an increase in task execution error as the time interval increases, but no significant difference was observed between the groups A/A vs. A/G + G/G or C/C vs. C/T + T/T. In addition, no differences were observed in the theta band asymmetry of the prefrontal cortex of these volunteers, suggesting that neither hemisphere predominates over the other. The results obtained here suggest that the rs25531 and rs25532 polymorphisms, when analyzed separately, are not capable of interfering with individual temporal perception, since this complex behavior is influenced by other polymorphisms.

Keywords: Temporal perception; Time reproduction; *SLC6A4* gene; Polymorphism rs25531 and rs25532.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Modelo representativo da Teoria da Expectativa Escalar (SET).....	15
Figura 2 – Síntese de serotonina	17
Figura 3 – Produção e liberação da serotonina na fenda sináptica	18
Figura 4 - Localização do gene <i>SLC6A4</i> no cromossomo 17	19
Figura 5- Posição dos eletrodos de acordo com o sistema internacional 10-20	21
Figura 6 – Posicionamento do voluntário durante a tarefa de Reprodução de Tempo	23
Figura 7 – Demonstração ilustrativa da tarefa de reprodução de tempo.	24
Figura 8- Representação ilustrativa do posicionamento de eletrodos do EEG	26
Figura 9 – Gráfico de amplificação de amostra homozigota (C/C) rs25532	28
Figura 10 – Gráfico de amplificação de amostra heterozigota (C/T) rs25532	29
Figura 11 – Gráfico de amplificação de amostra homozigota (T/T) rs25532	29
Figura 12 - Efeito principal para tempo no erro absoluto em rs25531	34
Figura 13 – Efeito principal para tempo no erro relativo em rs25531	35
Figura 14 – Interação entre grupamentos do rs25532 vs. tempo	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Programa de amplificação dos polimorfismos <i>SLC6A4</i> rs25531 e rs25532	28
Tabela 2 – Frequência genotípica e alélica de <i>SLC6A4</i> rs25531.....	31
Tabela 3 - Frequência genotípica e alélica de <i>SLC6A4</i> rs25532	32
Tabela 4 – Comparação da distribuição das frequências alélicas dos polimorfismos do gene <i>SLC6A4</i> em diferentes continentes.	33

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5HIAA	5 Hidroxi-Indolacético
5-HT	5-hidroxitriptamina (serotonina)
5-HTTLPR	<i>Serotonin transporter-linked polymorphic region</i> (Região polimórfica ligada ao transportador de serotonina)
ANOVA	Análise de variância
CF	Córtex Frontal
CPF	Córtex Pré-frontal
CPFDL	Córtex pré-frontal dorsolateral
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EA	Erro Absoluto
EEG	Eletroencefalograma
ER	Erro Relativo
F3 e F4	Eletrodos da touca de captação do EEG
ICA	Análise de componentes independentes
MAO	Monoamina oxidase
mRNA	RNA mensageiro
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i> (Centro Nacional de Informação Biotecnológica)
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase)
PD	Potência Absoluta Direita
PE	Potencia Absoluta Esquerda
SERT	Transportador de serotonina
SET	<i>Scalar Expectancy Theory</i> (Teoria da Expectativa Escalar)
<i>SLC6A4</i>	<i>Solute Carrier Family 6 member 4</i> (gene)
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Single Nucleotide Polymorphisms (Polimorfismo de Nucleotídeo Único)
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TOC	Transtorno Obsessivo Compulsivo
VNTR	<i>Variable Number of Tandem Repeats</i> (Repetição em Tandem de Número Variável)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1 PERCEPÇÃO TEMPORAL.....	14
2.2 TEORIA DA EXPECTATIVA ESCALAR.....	15
2.3 SEROTONINA E SISTEMA SEROTONINERGICO.....	16
2.4 GENE <i>SLC6A4</i> E SEUS POLIMORFISMOS.....	18
2.5 ELETROENCEFALOGRAMA (EEG).....	20
3. METODOLOGIA	22
3.1 SELEÇÃO DOS PARTICIPANTES E ASPECTOS ÉTICOS.....	22
3.2 OBTENÇÃO DO SINAL ELETROECEFALOGRAFICO DURANTE A TAREFA DE PERCEPÇÃO TEMPORAL	23
3.3 TAREFA DE PERCEPÇÃO TEMPORAL: REPRODUÇÃO DE TEMPO.....	24
3.4 ANÁLISE DOS DADOS.....	25
3.5 PROCESSAMENTO DOS DADOS.....	26
3.6 EXTRAÇÃO, QUANTIFICAÇÃO E ARMAZENAMENTO DE DNA.....	27
3.7 ANÁLISE DOS SNPS <i>SLC6A4</i> rs25531 E rs25532.....	27
3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	30
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
4.1 DADOS GENÉTICOS.....	31
4.2 RESULTADOS COMPORTAMENTAIS.....	33
4.3 RESULTADOS NEUROFISIOLÓGICOS.....	36
5. CONCLUSÃO.....	37
6. REFERÊNCIAS.....	38
ANEXO - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)	41

1. INTRODUÇÃO

A vida de cada indivíduo é regida por diversos eventos que ocorrem simultaneamente ao seu redor e dentro dele mesmo. A capacidade de adaptação do sujeito está diretamente ligada a sua taxa de sucesso, fazendo com que ele, a cada dia, aprimore suas habilidades. O tempo é uma grandeza que atua diretamente na capacidade do sujeito em interagir com esses estímulos, tornando-o apto para respondê-los. A percepção temporal, torna-se essencial para o desempenho de ações dentro do ambiente físico e social, orientando o comportamento (TEIXEIRA et al., 2013).

O tempo não possui órgão específico para sua captação, o que sugere que a percepção temporal é assimilada por um conjunto de sistemas e estruturas físicas, que sofrem interferências de estímulos internos e externos (RAO, 2001). Os neurotransmissores, por exemplo, são moléculas capazes de alterar a velocidade de resposta e a percepção de tempo, dependendo de sua disponibilidade (LAKE; MECK, 2013).

A serotonina (5-HT) é um neuromodulador que atua no sistema nervoso central (SNC) e está associada a regulação de comportamento, estado de sono e vigília, e até a capacidade de vasoconstrição, agregação plaquetária e motilidade intestinal (MOHAMMAD-ZADEH et al., 2008). A sua relação com outros neurotransmissores, como dopamina e noradrenalina, está associada a quadros de desequilíbrios mentais, tais como esquizofrenia, autismo, ansiedade e transtorno obsessivo-compulsivo (TOC), que por sua vez também alteram a percepção temporal (ABRAMS et al., 2004).

Os efeitos da 5-HT no SNC são modulados pela biodisponibilidade desse neurotransmissor e estão relacionados com a intensidade e duração do estímulo no receptor pós-sináptico, ou seja, a abundância de 5-HT na fenda sináptica é relevante para a determinação de suas ações (MOHAMMAD-ZADEH et al., 2008). Mutações associadas ao gene *SLC6A4* (17q11.2) podem resultar em mudanças na função do transportador de 5-HT por ele codificado. A região promotora do gene *SLC6A4* contém um polimorfismo conhecido como 5-HTTLPR (do inglês, *serotonin-transporter-linked polymorphic region*) composto por repetições em tandem de número variável (VNTR, do inglês *variable number of tandem repeats*) que geram sequências de tamanhos distintos, capazes de alterar o fenótipo de seus portadores (PEZAWAS et al., 2005; STEVENSON, 2017).

Dentro desse seguimento da região promotora do *SLC6A4*, outros polimorfismos, como o rs25531 e rs25532, também são estudados pelas suas capacidades de alterar a disponibilidade de 5-HT. O rs25531 é um polimorfismo de nucleotídeo único (SNP, do inglês *single nucleotide polymorphism*), caracterizado pela troca de adenina (A) para guanina (G) que em associação ao polimorfismo 5-HTTLPR diminui a expressão do mRNA de *SLC6A4* (RASHIDI et al., 2017). O rs25532 também é um SNP e está localizado a menos de 150 nucleotídeos de 5-HTTLPR. Essa variação é descrita pela troca de citosina (C) por timina (T), que em associação com outros polimorfismos diminuem a expressão do transportador de serotonina altamente seletivo (SERT) (WENDLAND et al., 2007; MURDOCH et al., 2013).

Esse trabalho investigou a influência dos SNPs rs25531 e rs25532 do gene *SLC6A4* com a percepção temporal, a partir da captação de sinal eletroencefalográfico durante a tarefa de reprodução de tempo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PERCEPÇÃO TEMPORAL

A percepção temporal está associada com a capacidade dos indivíduos perceberem o tempo ao seu redor, levando em consideração os estímulos presentes no ambiente e as condições neurológicas para modulação dessa percepção (EAGLEMAN, 2008). As experiências pessoais, condições ambientais, estado de saúde e até estilo de vida, alteram a maneira como cada indivíduo percebe o tempo ao seu redor. Mesmo fazendo parte do cotidiano, a definição do tempo é subjetiva e variada, sendo então empregada de maneira distinta em vários episódios da vida humana. Normalmente os eventos externos vinculados ao indivíduo são, por ele, definidos como tempo (SCIENTIFIC AMERICA, 2002).

Estudos na área da cronobiologia apontaram estruturas neurais associadas com a percepção de tempo, levando em consideração estímulos externos, como luminosidade, por exemplo, que atuam nas células do núcleo supraquiasmático do hipotálamo, consideradas então como marca-passo circadiano em mamíferos (RALPH et al., 1990). O estímulo luminoso tem influência direta nessas células, modulando sua resposta (HASTINGS; SWEENEY, 1958) mas essas, quando isoladas, podem oscilar de forma independente em um período de quase 24 horas (WELSH et al., 1995).

A percepção do tempo não apresenta órgão sensorial específico para sua captação, não sendo claro se a relação com o tempo é mediada por estruturas ou mecanismos comuns. A neurociência sugere que vários sistemas complementares regem a percepção temporal (RAO, 2001), e dentre eles, neurotransmissores que são capazes de acionar respostas em escalas de tempo distintas, em segundos e minutos, como na percepção temporal ou horas do dia, como no ciclo circadiano (MERCHANT, 2013). Também se fala em modelos de mecanismos de temporalização, sendo o mais comum aquele que se referem à dependência de estruturas neurais como o córtex pré-frontal, cerebelo e gânglios basais relacionados com uma infinidade de tempos comportamentais (JOHNSON et al., 2010; BUONOMANO, 2010).

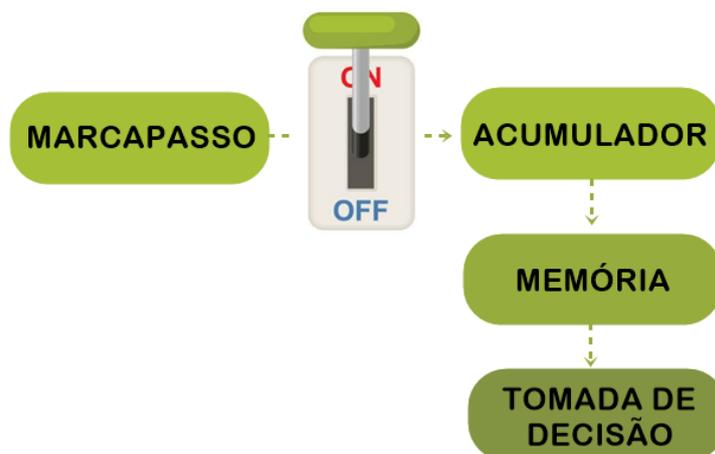
A percepção temporal pode ser regulada pelas variações nas estruturas corticais que se relacionam com o relógio interno e as tarefas executadas pelo sujeito. Nesse sentido o córtex frontal (CF) em especial a região do córtex pré-frontal (CPF)

tem papel importante no processamento de informações temporais. Nessa região a memória é ativada em resposta a um estímulo, que pode ser a previsão ou estimativa de tempo, dando capacidade ao indivíduo responder ao impulso na fração dos segundos. Diversos neurotransmissores estão envolvidos nesses estímulos, desde a percepção até a propagação deles, em vista de uma resposta, sendo então possível modular a função cortical, inclusive de maneira distinta entre os hemisférios (FONTES et al, 2016).

2.2 TEORIA DA EXPECTATIVA ESCALAR

Atualmente o sistema mais utilizado para explicar a percepção temporal é a Teoria da Expectativa Escalar (SET, do inglês *Scalar Expectancy Theory*). Os modelos de temporalização baseiam-se em relógios internos, que nesse caso seria composto por um marcapasso que emite pulsos contínuos, um acumulador que capta os pulsos e os contabiliza, e um interruptor que liga o marcapasso ao acumulador. A atenção é o gatilho para que o interruptor seja acionado, possibilitando a passagem dos pulsos (DROIT-VOLET, 2013). Na Figura 1 é possível observar um esquema didático de como funciona a SET.

Figura 1- Modelo representativo da Teoria da Expectativa Escalar (SET).



Fonte: Própria

Quando um estímulo é percebido pelo indivíduo, seja ele de áudio ou visual, o marcapasso começa a emitir pulsos de frequência constante. Através da atenção o

interruptor é acionado, sendo então possível que esses pulsos cheguem ao acumulador, que os contabiliza. Com o fim do estímulo ou a perda da atenção o interruptor deixa de operar, interrompendo a transferência dos pulsos. Quanto mais pulsos são captados, maior é a percepção de tempo. (DROIT-VOLET, 2013; FONTES et al, 2016; OLIVEIRA, 2017).

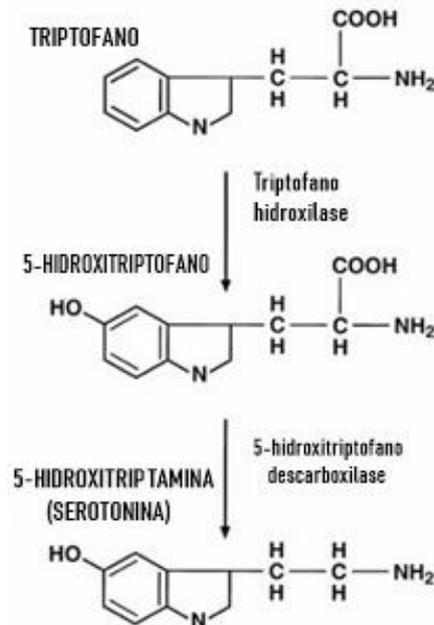
Esse modelo pode ser utilizado para estudos em intervalos de tempo de segundos e milissegundos, tempos requisitados em respostas de tarefas e tomada de decisões, respectivamente (TUCCI, et al, 2014)

2.3 SEROTONINA E SISTEMA SEROTONINERGICO

A 5-HT é um neuromodulador que atua no SNC e está associada à regulação de apetite, sono e estados de ânimo, dentre outros. Essas funções estão relacionadas com a modulação a qual são submetidos e com a localização topográfica e morfologia dos neurônios serotoninérgicos nos núcleos de rafe. A observação de neurônios com morfologias diferentes que se organizam topograficamente em grupos, sugere uma ligação potencial entre estrutura e função (ABRAMS et al., 2004). Em associação a outros neurotransmissores, como dopamina e noradrenalina, a 5-HT é relacionada a quadros de desequilíbrios mentais, tais como esquizofrenia, autismo, ansiedade e transtorno obsessivo compulsivo (TOC) (LI et al., 2018; HAIDAR et al., 2018; WENDLAND et al., 2007).

Também conhecida como 5-hidroxitriptamina, a 5-HT é um neurotransmissor produzido em duas etapas a partir do triptofano, através de ação enzimática. O aminoácido essencial é hidroxilado em 5-hidroxitriptofano (5-HTP) pela triptofano hidroxilase e em seguida descarboxilado para formar 5-HT (CLARK, et al., 1954).

Figura 2- Síntese de serotonina.



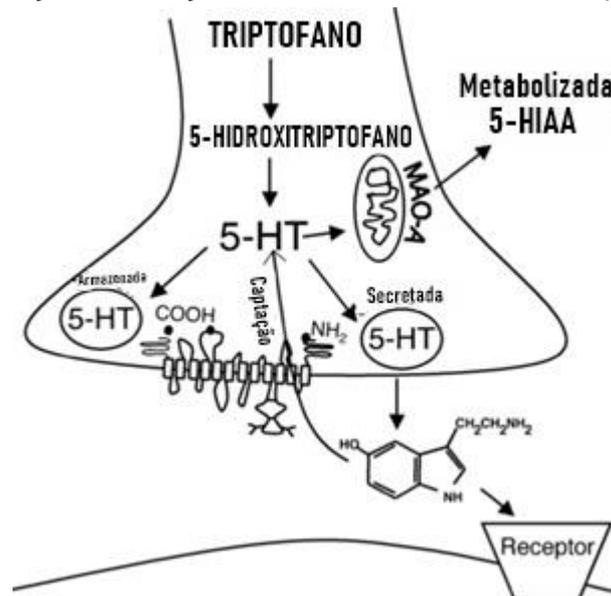
Fonte: modificado de MOHAMMAD-ZADEH et al. (2008).

A 5-HT é uma amina biogênica sintetizada em células enterocromafins do trato gastrointestinal e em neurónios serotoninérgicos presentes nos núcleos de rafe, localizados na ponte e mesencéfalo, no tronco encefálico (DAHLSTROM; FUXE, 1964). A maior parte desse neurotransmissor está armazenada em células do gastrointestinal e nas plaquetas, mas estas, apesar de sua baixa produção de 5-HT, são um importante sítio de armazenamento fora do SNC (HARDISTY; STACEY, 1955).

Cerca de 99% da 5-HT presente no corpo está localizada dentro das células, demandando uma regulação rigorosa, onde a concentração de 5-HT nos tecidos deriva da taxa de síntese e da taxa de metabolismo (TYCE, 1990). A principal enzima relacionada ao metabolismo de 5-HT é a monoamina oxidase (MAO) que apresenta ação rápida e tem como principal produto o 5-hidroxi-indolacético (5HIAA), excretado principalmente na urina (TYCE, 1990).

Após a despolarização da membrana neural, a 5-HT é liberada no espaço sináptico podendo ligar-se a receptores pós-sinápticos (receptores 5-HT) ou auto receptores pré-sinápticos que atuam como *feedback* negativo contra a liberação adicional de 5-HT na fenda sináptica (CERRITO; RAITERI, 1979). Como mencionado anteriormente a ação de MAO se dá muito rapidamente e SERT tem então o papel de reciclar a 5-HT e protegê-la do metabolismo.

Figura 3- Produção e liberação da serotonina na fenda sináptica.



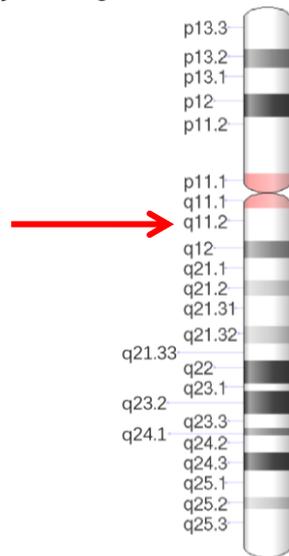
Fonte: modificado de MOHAMMAD-ZADEH et al. (2008).

Os efeitos da 5-HT no SNC são modulados pela biodisponibilidade desse neurotransmissor na fenda sináptica, isso quer dizer que a intensidade e duração do estímulo dependem da abundância e tempo em que a 5-HT permanece em contato com os receptores pós-sinápticos, sendo então esses fatores relevantes para a determinação de sua ação. Os mecanismos envolvidos no controle dessa disponibilidade são a ligação da 5-HT ao seu auto receptor (*feedback* negativo) e a atividade da SERT (remoção de 5-HT por recaptação), ambas localizadas na membrana do neurônio pré-sináptico (MOHAMMAD-ZADEH et al., 2008).

2.4 GENE *SLC6A4* E SEUS POLIMORFISMOS

A proteína SERT é codificada pelo gene *SLC6A4* (17q11.2, Figura 4), composto por 14 éxons e tamanho total de aproximadamente 38 kb (RAMAMOORTHYS et al., 1993). Mutações associadas ao gene podem resultar em mudanças na função de SERT, causando alterações fenotípicas que estão associadas, por exemplo, a síndrome do intestino irritável e até TOC (KOHEN et al., 2009; WENDLAND et al., 2008).

Figura 4- Localização do gene *SLC6A4* no cromossomo 17.



*Seta aponta para a região q11.2, local onde se encontra o gene *SLC6A4* no cromossomo 17.

Fonte: modificado de NCBI

A região promotora do gene *SLC6A4* contém um polimorfismo conhecido como 5-HTTLPR (do inglês, *serotonin-transporter-linked polymorphic region*) composto por repetições em tandem de número variável (VNTR, do inglês) que podem gerar alelos curtos (S) e longos (L) com 14 e 16 repetições, respectivamente. Essa variação de comprimento é amplamente investigada, já que além dos fenótipos comportamentais, esse polimorfismo também está associado com mudanças na estrutura cerebral (PEZAWAS et al., 2005). O alelo L, por exemplo, pode estar associado com a diminuição dos níveis de 5-HT (STEVENSON, 2017), e, Pezawase et al. (2005) descreveram menos matéria cinzenta no córtex cingulado anterior perigenual e na amígdala em portadores de alelos S, comparados com portadores de alelos L (PEZAWAS et al., 2005).

Os polimorfismos rs25531 e rs25532, foco desse estudo, são SNPs, ou seja, uma variação de nucleotídeo único (SNP, do inglês). Esse tipo de polimorfismo é o mais comum encontrado no genoma e cerca de 5 a 10% desses SNPs estão associados à doenças (GREENWOOD, 2003).

O SNP rs25531 é caracterizado pela troca de adenina (A) por guanina (G). Kohen e colaboradores demonstraram em sua pesquisa que portadores do alelo raro G apresentavam três vezes mais chances de desenvolver síndrome do intestino irritável, devido a ação de 5-HT em células do gastrointestinal (KOHEN et al., 2008). Em associação com o alelo L de 5-HTTLPR, rs25531 produz duas variantes, LA e LG,

onde LG possibilita o acesso a um sítio de ligação ao fator de transcrição ativador funcional 2 (AP-2) que diminui a expressão de mRNA (RASHIDI et al., 2017).

O SNP rs25532 está localizado a menos de 150 nucleotídeos de 5-HTTLPR. Essa variação é descrita pela troca de citosina (C) por timina (T). Indivíduos que apresentam o alelo T tiveram seus níveis de expressão de SERT atenuados em mais de 20% em linhagens celulares RN46A (rafe medular de rato), PC12 (feocromocitoma adrenal) e JAR (coriocarcinoma humano) (WENDLAND et al., 2007a), ou seja, o alelo raro T de rs25532 em associação a outros polimorfismos, apresenta a capacidade de reduzir a expressão de SERT (WENDLAND et al., 2007a; MURDOCH et al., 2013). O TOC, por exemplo, pode estar associado com essa mutação, principalmente se analisado concomitantemente a 5-HTTLPR e rs25531 (WENDLAND et al., 2007b).

2.5 ELETROENCEFALOGRAMA (EEG)

O eletroencefalograma (EEG) é um teste utilizado para medir as oscilações neurais presentes no sistema nervoso central, derivadas das correntes iônicas dos neurônios em atividade (GOMES, 2015). Esse método é amplamente utilizado na clínica para o monitoramento não invasivo da atividade cerebral, podendo se estender para outras áreas, como na pesquisa, para a investigação do funcionamento cortical, presente nesse estudo.

O EEG se baseia nas variações de voltagens captadas pelos diferentes eletrodos colocados sobre o couro cabeludo, que ampliam os sinais elétricos do potencial pós-sináptico excitatório e o potencial pós-sináptico inibitório, que despolarizam e hiperpolarizam, respectivamente, as membranas dos neurônios (GOMES, 2015). Esses eletrodos são distribuídos seguindo o sistema internacional 10-20 e são posicionados sobre o couro cabeludo, recebendo o nome de acordo com a localização (Figura 5).

3. METODOLOGIA

3.1 SELEÇÃO DOS PARTICIPANTES E ASPECTOS ÉTICOS

O estudo contou com a colaboração de 158 sujeitos que após serem informados sobre a pesquisa e concordarem em participar, assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), autorizando a coleta e armazenamento de seus dados e amostras, de acordo com o projeto já aprovado pelo Comitê de ética em pesquisa em seres humanos da Universidade Federal do Piauí (CMRV), com parecer de N° 1.327.105. Após a seleção dos participantes, os trabalhos foram realizados no Laboratório de Neuro-Inovação e Tecnologia (NTILAB) e no Laboratório de Genética e Biologia Molecular localizado na UFPI – CMRV, no município de Parnaíba, PI.

Utilizou-se dos critérios de inclusão e exclusão listados abaixo para constituir o grupo amostral.

Critérios de Inclusão:

- Discentes da Universidade Federal do Piauí e/ou da comunidade do sexo masculino com idade entre 18 e 32 anos;
- Indivíduos com audiovisual normal ou corrigida;
- Indivíduos destros.

Critérios de Exclusão:

- Indivíduos que tenham comprometimento severo ao movimentar mãos ou dedos;
- Indivíduos que declararam não ter tido uma boa noite de sono anterior a coleta de dados e possuam transtornos neuropsiquiátricos;
- Indivíduos que tenham feito uso de cafeína de 12h-14h antes da coleta de dados;
- Indivíduos com histórico de acidente vascular cerebral;
- Indivíduos com histórico de determinantes biológicos que possam alterar o eletroencefalograma (EEG) como: medicamentos psicotrópicos, fadiga e alteração da temperatura corporal;
- Indivíduos que consumiram álcool (24 horas) e tabaco (10 horas) antes do experimento;

- Indivíduos com distúrbios neurológicos ou condições musculoesqueléticas que possam causar potenciais vieses;
- Indivíduos que tenham trabalhado em turnos de trabalho alterados nos últimos 3 meses;
- Indivíduos que possuam parentesco com outro colaborador da pesquisa.

3.2 OBTENÇÃO DO SINAL ELETROENCEFALOGRÁFICO DURANTE A TAREFA DE PERCEPÇÃO TEMPORAL

O sinal eletroencefalográfico foi captado em uma sala preparada com isolamento acústico e elétrico. Durante a aquisição do sinal, as luzes foram reduzidas. O voluntário permaneceu sentado confortavelmente em uma cadeira com suporte para os braços, a fim de minimizar os artefatos musculares (piscada de olho forçada, movimento sacádico, movimento dos membros, etc.) durante a captação do sinal de EEG, que durou em média 15 minutos. (Figura 6)

Figura 6- Posicionamento do voluntário durante a tarefa de Reprodução de Tempo



Fonte: RIBEIRO (2016).

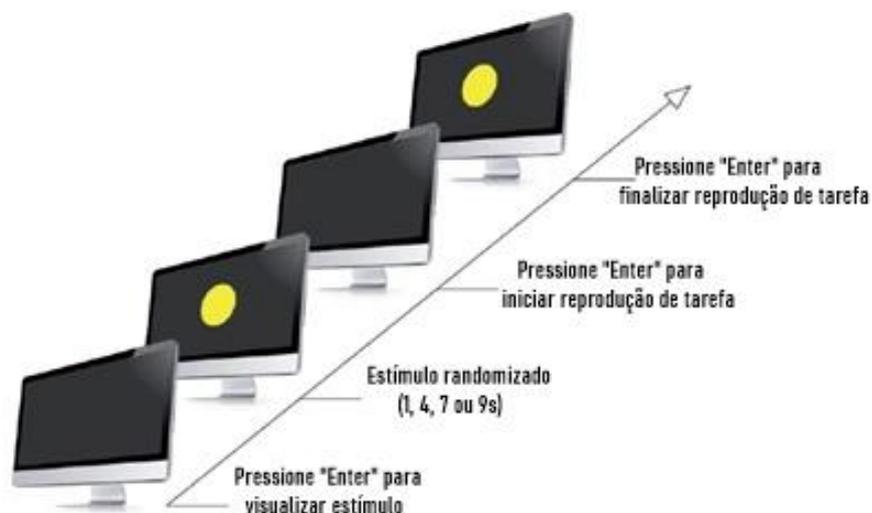
O EEG contínuo de 20 canais foi gravado por amplificadores Braintech 3000 (EMSA - Instrumentos Médicos, Brasil). Os eletrodos de prata/cloreto de prata foram posicionados por uma tampa de eletrodo equidistante por meio de uma touca de nylon com prefixação do sistema internacional 10-20, incluindo os eletrodos de referência biauricular (SPES Medica Brasil). A impedância dos eletrodos do EEG foram mantidas

abaixo de 5 K Ω . Os dados adquiridos tinham amplitude total de menos do que 100 μ V. O sinal do EEG foi amplificado com um ganho de 22.000 Hz, analogicamente filtrados entre 0,01 Hz (passa-alta) e 30 Hz (passa-baixa), com 240 Hz por meio do software *Data Acquisition* (Delphi 5.0), desenvolvido no Laboratório de Mapeamento e Plasticidade Cerebral (NITLAB).

3.3 TAREFA DE PERCEPÇÃO TEMPORAL: REPRODUÇÃO DE TEMPO

Um monitor de 42' polegadas foi colocado sobre uma mesa em frente aos participantes a uma distância de 50 centímetros e foi ligado somente na execução da tarefa de reprodução do tempo. A tarefa de reprodução do tempo possui duas fases. Na primeira, o software apresentará um comando "Produção de tempo de X segundos: aperte enter para iniciar e enter para terminar". O tempo a ser produzido (X) são apresentados de forma randômica e consistem em intervalos de 1, 4, 7 ou 9 segundos, que foram analisados por meio do programa Matlab que registra os intervalos de tempo alvo apresentados. Ao ser indicado o tempo que deve ser produzido, o participante aperta o enter e surge um estímulo que consiste em um círculo amarelo em um fundo preto. Quando o participante, sem cronometrar numericamente (isto é, sem contar), entende que deve ter chegado ao tempo pedido, ele aperta o enter novamente para cessar o estímulo (Figura 7).

Figura 7- Demonstração ilustrativa da tarefa de reprodução de tempo.



Fonte: modificado de OLIVEIRA (2017).

A tarefa foi realizada em 1 bloco com 40 repetições. Os indivíduos foram orientados a não contabilizar a duração enquanto o estímulo for apresentado, a fim de que seja avaliado o processamento neural não numérico do tempo. O programa gera uma tabela em .txt que apresenta o tempo produzido pelo participante em comparação ao tempo que foi pedido.

3.4 ANÁLISE DOS DADOS

Foi analisado a assimetria do EEG para as oscilações da banda teta (4~8 Hz). A variável assimetria foi definida como: $PE - PD / PE + PD = P\mu$, cujo $P\mu$ é uma medida adimensional que representa a razão relativa da assimetria. P = Potência absoluta, E e D= hemisfério esquerdo e direito, respectivamente. A assimetria negativa revela que o hemisfério direito é predominante e é diretamente proporcional para $P\mu$. Dessa forma, foi feita a análise da assimetria do córtex pré-frontal dorsolateral (CPF DL) durante a execução da tarefa de reprodução do tempo, devido ao envolvimento com funções cognitivas como atenção, memória, planejamento e capacidade perceptiva de estímulos, ambas embutidas na temporização (SILVA, 2015).

A variável comportamental que relaciona os dados com o início do estímulo visual até o término da estimativa do tempo foi transformada em medidas que representam o valor do erro absoluto (EA) e a proporção estimada para duração-alvo. O valor do EA é definido como a diferença entre a estimativa subjetiva do tempo e a duração alvo (BROWN,1985). Desse modo, o EA é uma medida da diferença entre o ritmo do relógio objetivo e o julgado, tornando-se útil para avaliação do nível global de precisão de decisões de temporização (BROWN,1985; MIONI et al., 2014). Em complemento, a razão da estimativa da duração do alvo foi realizada dividindo o tempo de desempenho de cada participante pela duração do intervalo de tempo alvo apresentado para cada trilha. Esta análise corresponde ao erro relativo (ER) e promove o entendimento que um coeficiente abaixo de 1,0 indica um julgamento da estimativa do tempo menor do que o tempo real, enquanto que o coeficiente acima de 1,0 representa o julgamento do tempo maior do que a duração real, ou seja, um subestimação ou superestimação do tempo, respectivamente (BROWN,1985).

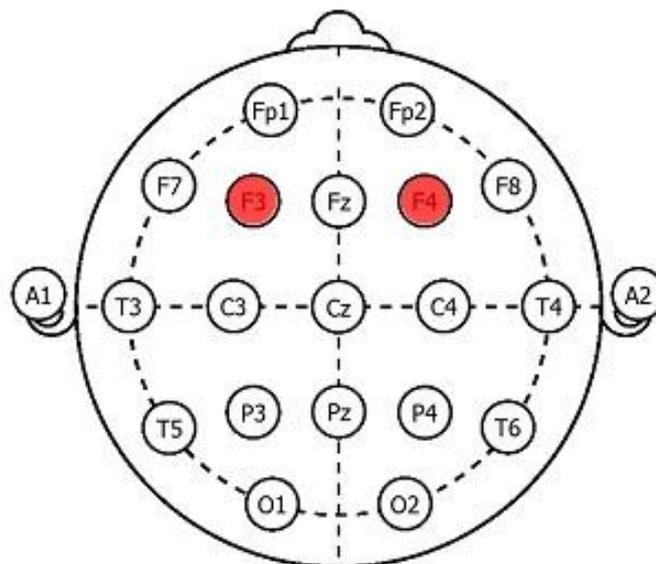
Em adição, associamos as medidas eletrofisiológicas de assimetria e desempenho comportamental da tarefa aos genótipos dos polimorfismos rs25531 e

rs25532 de *SLC6A4*. Em detalhe, os seguintes grupos de genótipos foram formados para a análise no estudo com base na modulação da expressão do transportador de serotonina: (1) rs25531: (AA vs. AG + GG); (2) rs25532: (CC vs. CT + TT).

3.5 PROCESSAMENTO DOS DADOS

Uma inspeção visual e análise de componentes independentes (ICA) foram aplicadas para identificar e remover todos os artefatos remanescentes produzidos pela tarefa. Os dados de eletrodos individuais que exibiram perda de contato com o escalpo ou alta impedância ($>5K\Omega$) não foram considerados. Um estimador clássico foi aplicado para a densidade de potência espectral (DPE), estimada a partir da Transformada de Fourier (TF), que foi realizada pelo MATLAB (Matwords, Inc.). Parâmetros do EEG foram reduzidos a diferentes períodos, de acordo com o intervalo de tempo. As análises das modificações corticais foram realizadas para os tempos de 1, 4, 7 e 9 segundos. Para cada tempo foi extraída a época do EEG relacionada com 2 segundos antes do início do estímulo visual (preparação para a tarefa) e até o momento 0 que corresponde a execução da tarefa de reprodução do tempo. Estes procedimentos foram realizados para assimetria de F3-F4, devido à relação com o CPFDL (SIEBNER, 2001; NEUPER, 2001).

Figura 8- Representação ilustrativa do posicionamento de eletrodos do EEG



*Eletrodos F3 e F4 evidenciados em vermelho.

Fonte: modificado de ROCHA (2016)

3.6 EXTRAÇÃO, QUANTIFICAÇÃO E ARMAZENAMENTO DE DNA.

As amostras de sangue periférico foram submetidas à extração do DNA com o *kit Wizard® Genomic DNA Purification* (Promega), de acordo com as especificações estabelecidas pelo fabricante. Em resumo, para um volume de sangue de 300 µL, foram adicionados 900 µL de solução de lise celular e incubado por 10 minutos, seguido de centrifugação; Descartado o sobrenadante, as amostras foram homogeneizadas em vórtex para evitar a formação de grumos na etapa seguinte. Logo após foi feita a adição de uma mistura de 300 µL de solução de lise nuclear e 100 µL de solução de precipitação de proteínas; Após outra etapa de centrifugação, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo contendo 300 µL de isopropanol, e submetido novamente à centrifugação, seguida pelo descarte do sobrenadante e pela adição de etanol 70%; Uma nova etapa de centrifugação foi realizada e o sobrenadante descartado; A amostra de DNA, visível como uma massa branca (*pellet*) no fundo do tubo foi incubada com 100 µL de uma solução de reidratação em banho-maria por 1 hora a 65°C para que o DNA fosse eluído.

A concentração e pureza do DNA foram determinadas por espectrofotometria, por meio do comprimento de onda de 260 e 280nm. Em seguida as amostras foram estocadas em freezer -20°C no laboratório de genética e biologia molecular da Universidade Federal do Piauí – Campus Ministro Reis Velloso por tempo indeterminado.

3.7 ANÁLISE DOS SNPs *SLC6A4* rs25531 E rs25532

A análise do SNP *SLC6A4* rs25531 foi realizada por meio da amplificação do DNA genômico utilizando os *primers* gene-específicos (*forward* 5'-CCC TCG CGG CAT CCC-3' e *reverse* 5'- ATG CTG GAA GGG CTG CA-3') e sondas fluorescentes específicas de alelos (VIC-CTG CAC CCC CAG CAT-NFQ e FAM-CTG CAC CCC CGG CAT-NFQ) pelo ensaio de genotipagem Custom TaqMan® SNP Genotyping Assays (Thermo Fisher).

A análise do SNP *SLC6A4* rs25532 foi realizada por meio da amplificação do DNA genômico utilizando os *primers* gene-específicos (*forward* 5'-CTG CAC CCC CCA GCA T-3' e *reverse* 5'- GGT AGG GTG CAA GGA GAA TGC-3') e sondas fluorescentes específicas de alelos (VIC-CCG GCA TCC CCC CT-NFQ e FAM-CCC

GGT ATC CCC CCT-NFQ) pelo ensaio de genotipagem Custom TaqMan® SNP Genotyping Assays (Thermo Fisher).

Para uma reação total de 5 µL, foram utilizados 2,5 µL de 2XTaqMan Genotyping Master Mix, 0,25 µL de 20XTaqMan Genotyping Assay Mix e 2,25 µL de DNA (20 ng). A Tabela 1 apresenta as condições dos ciclos de amplificação utilizando o Sistema Applied Biosystems Real-Time PCR (modelo 7500 fast).

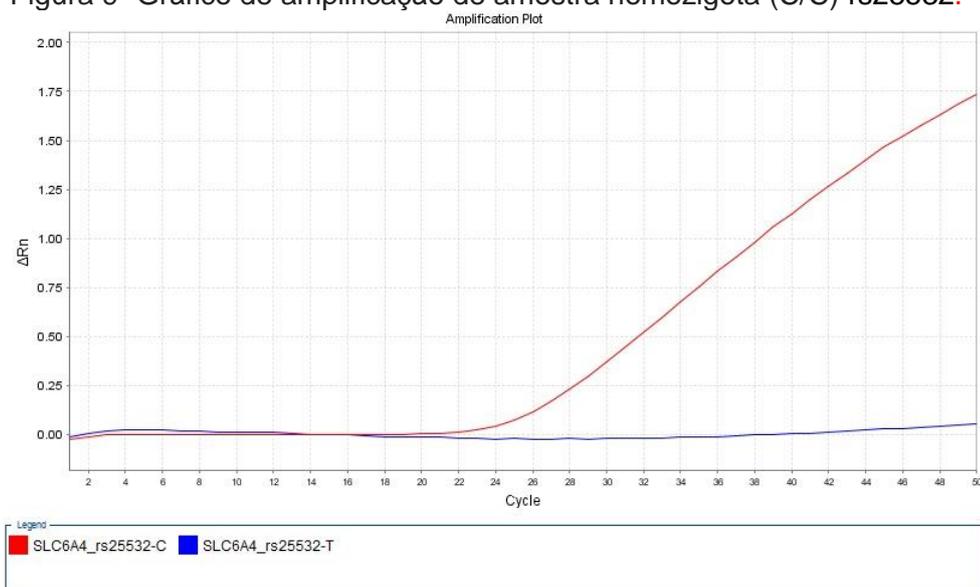
Tabela 1- Programa de amplificação dos polimorfismos *SLC6A4* rs25531 e rs25532

Passos	Temperatura	Tempo	Ciclos
Desnaturação inicial	95°C	10 min.	1 x
Desnaturação	95°C	15 seg.	50 x
Anelamento e Extensão	60°C	90 seg.	
Extensão final	60°C	1 min.	1 x

Fonte: Própria.

Após a amplificação por PCR em tempo real, o sistema de detecção utiliza um *software* que identifica a fluorescência de cada poço. O sinal de fluorescência plotada indica quais alelos estão presentes em cada amostra, que podem ser observados na forma gráfica, como exposto nas Figuras 9, 10 e 11.

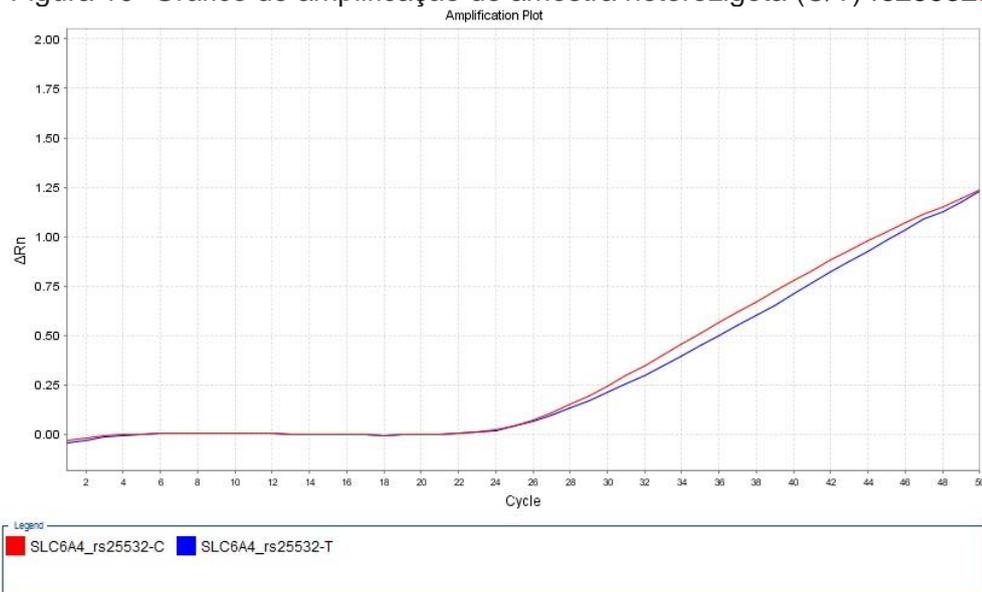
Figura 9- Gráfico de amplificação de amostra homocigota (C/C) rs25532.



Fonte: Própria

O alelo C (cor vermelha) apresenta uma curva de amplificação, indicando sinais de amplificação, enquanto o alelo T (cor azul) permanece praticamente inalterado, sugerindo que não ocorreu amplificação. Ou seja, a amostra apresenta amplificação, apenas do alelo C, sendo então caracterizada como homozigota C/C.

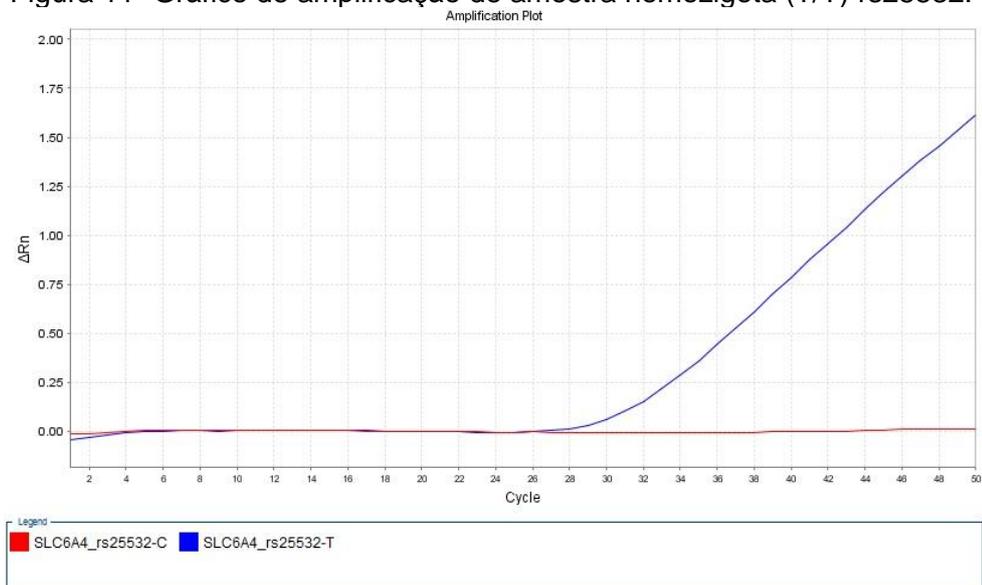
Figura 10- Gráfico de amplificação de amostra heterozigota (C/T) rs25532.



Fonte: Própria

A curva de amplificação do alelo C e T sinalizam à amplificação dos dois alelos na mesma amostra, o que caracteriza um indivíduo heterozigoto C/T.

Figura 11- Gráfico de amplificação de amostra homozigota (T/T) rs25532.



Fonte: Própria

O alelo T apresenta uma curva de crescimento, indicando sinais de amplificação, enquanto o alelo C permanece praticamente inalterado, sugerindo que não ocorreu amplificação. Ou seja, a amostra apresenta amplificação, apenas do alelo T, sendo então caracterizada como homozigota T/T.

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As frequências genóticas foram testadas para o equilíbrio de Hardy-Weinberg usando χ^2 -teste. Posteriormente, realizamos as análises de variância de medidas repetidas (ANOVAs) de dois fatores a fim de avaliar a diferença dos genótipos dos polimorfismos rs25531 e rs52532 em dados de assimetria da banda teta do EEG em F3-F4.

Para a análise do EA e do ER realizamos uma análise de variância de medidas repetidas (ANOVAs) de dois fatores, com fator grupo: (grupamentos dos genótipos do rs25532 e para o rs52532) e fator tempo: (1, 4, 7, 9 segundos). Para a análise da interação foram feitos testes univariados e testes *t* independentes, com correção de Bonferroni quando necessário, com $p \leq 0,025$. O tamanho do efeito foi estimado como Eta parcial ao quadrado (η^2p). A potência estatística e o intervalo de confiança de 95% (IC 95%) foram calculados para as variáveis dependentes. A magnitude do efeito foi interpretada utilizando as recomendações sugeridas por Hopkins et al. (2009): 0,0 = trivial; 0,2= pequeno; 0,6= moderado; 1,2= grande; 2,0= muito grande; 4,0= quase perfeita. A probabilidade de 5% para o erro tipo I foi adotada em todas as análises ($p \leq 0,05$). Desse modo, para detectar se houve uma diferença real na população, o poder estatístico foi interpretado com 0,8 a 0,9= potência alta (FAYERS E MACHIN, 1995). Todas as análises foram conduzidas utilizando o SPSS para Windows versão 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 DADOS GENÉTICOS

Foram genotipadas 158 amostras e as Tabelas 2 e 3 mostram as frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos rs25531 e rs25532 no grupo estudado, obtidas a partir de simples contagem. A população estudada encontra-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg e isso nos permitiu seguir com segurança as nossas análises, pois em equilíbrio, temos a garantia de que a população estudada não está sofrendo ação externa de fatores como, por exemplo, migração, efeito fundador, dentre outros.

Tabela 2- Frequência genotípica e alélica de *SLC6A4* rs25531.

Genótipos	N° (%)
A/A	147 (93)
A/G	11 (7)
G/G	0 (0)
Total	158 (100)
X²=0,2055	p=0,6503
Alelos	Frequência (%)
A	97
G	3

x² = Qui quadrado; p = Significância estatística (p<0,05).
 Fonte: Própria

Tabela 3- Frequência genotípica e alélica de *SLC6A4* rs25532.

Genótipos	N° (%)
C/C	146 (92)
C/T	11 (7)
T/T	1 (1)
Total	158 (100)
X²= 2,1830	p= 0,1395
Alelos	Frequência (%)
C	96
T	4

x² = Qui quadrado; p = Significância estatística (p<0,05).

Fonte: Própria

Os resultados aqui encontrados se assemelham a outros trabalhos (WENDLAND et al, 2007a; KOHEN et al, 2008) e na Tabela 4 é possível comparar as frequências alélicas disponíveis no NCBI.

Tabela 4- Comparação da distribuição das frequências alélicas dos polimorfismos do gene *SLC6A4* em diferentes continentes.

País/ Continente	Frequências (%)	
	rs25531	
	A	G
Brasil*	97	3
América**	95	5
África**	78	22
Europa**	91	9

País/ Continente	Frequência (%)	
	rs25532	
	C	T
Brasil*	96	4
América***	96	4
África***	99	1
Europa***	90	10

*Presente estudo; ** *1000 Genomes Project*; *** *gnomAD*.
 Fonte: Própria

4.2 RESULTADOS COMPORTAMENTAIS

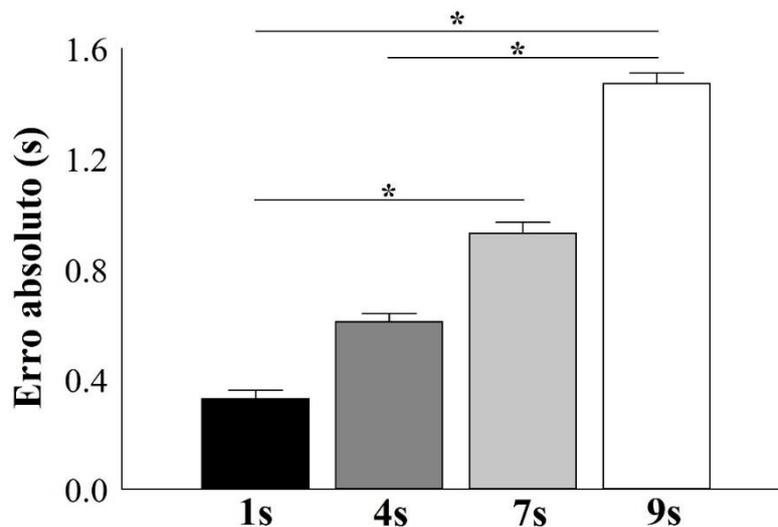
Os mecanismos envolvidos na percepção temporal ainda não são suficientemente claros para explicar as diferentes formas de observação do tempo, muitas vezes discordantes entre os indivíduos. A SET é o modelo mais aceito para explicar as diferenças observadas na passagem de tempo, baseando suas explicações na atenção (FONTES et al, 2016). Esse sistema de percepção do tempo seria composto por um interruptor, acionado pela atenção; um marca-passo, que emite pulsos contínuos e funciona como um processador de tempo; e um acumulador que recebe os pulsos e envia a informação para a memória de referência, para uma posterior tomada de decisão (DROIT-VOLET, 2013).

Quando um indivíduo inicia a tarefa, o interruptor, acionado pela atenção, dispara o marca-passo que emite pulsos detectados pelo acumulador. Quanto mais atenção é dada a tarefa, mais pulsos são emitidos e contabilizados, sendo então maior

a estimativa do tempo (OLIVEIRA, 2017). Durante momentos de distração, esses pulsos não são emitidos, sendo pouco contabilizados, dando ao indivíduo uma menor estimativa de tempo.

Os resultados evidenciam um aumento no erro de execução de tarefas a medida que o intervalo de tempo aumenta. Intervalos maiores exigem mais tempo de atenção, com isso, indivíduos com dificuldade de concentração tendem ao erro. Uma ANOVA mista de dois fatores para o EA demonstrou efeito principal para tempo entre o grupamento rs25531: (AA vs. AG + GG) vs. intervalos de tempo, com $[F(3) = 41,43; p = 0,0001; \eta^2 p = 0,03, \text{ poder} = 100\%]$. A análise pelo *post hoc* de Tukey evidenciou diferenças entre os intervalos de 1s e 9s, 1s e 7s, além de 4s e 9s ($p = 0,001$) (Figura 12). Esse resultado confirma o que apontam outros estudos, onde é observado um maior erro em relação ao maior intervalo de tempo (BANGERT et al., 2011; MERCHANT, HARRINGTON E MECK, 2013; OLIVEIRA, 2017), porém não foi expressivo a diferença entre os grupamentos.

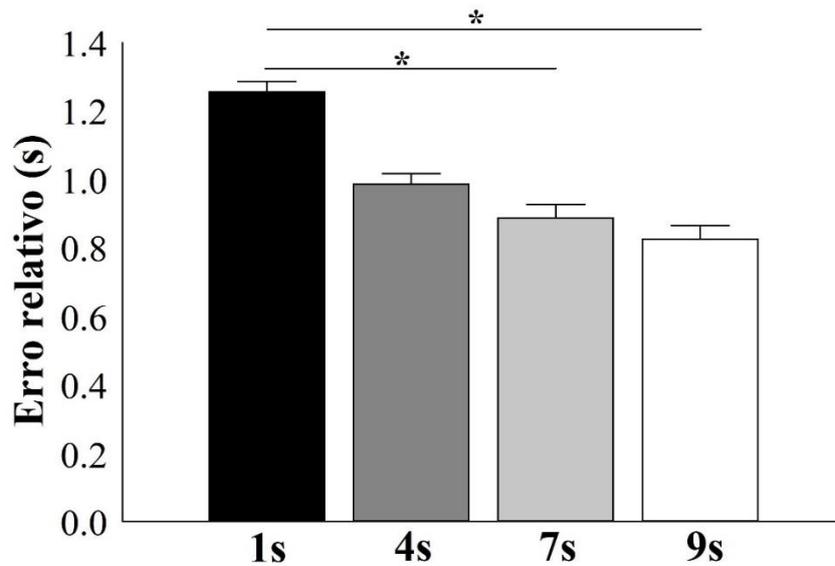
Figura 12- Efeito principal para tempo no erro absoluto em rs25531.



Fonte: Própria

Em relação ao ER, foi observado efeito principal para tempo, com $[F(3) = 44,17; p = 0,015; \eta^2 p = 0,26, \text{ poder} = 68,4\%]$. A análise pelo *post hoc* de Tukey evidenciou diferenças entre os intervalos de 1s e 9s, e 1s e 7s ($p = 0,001$) (Figura 13).

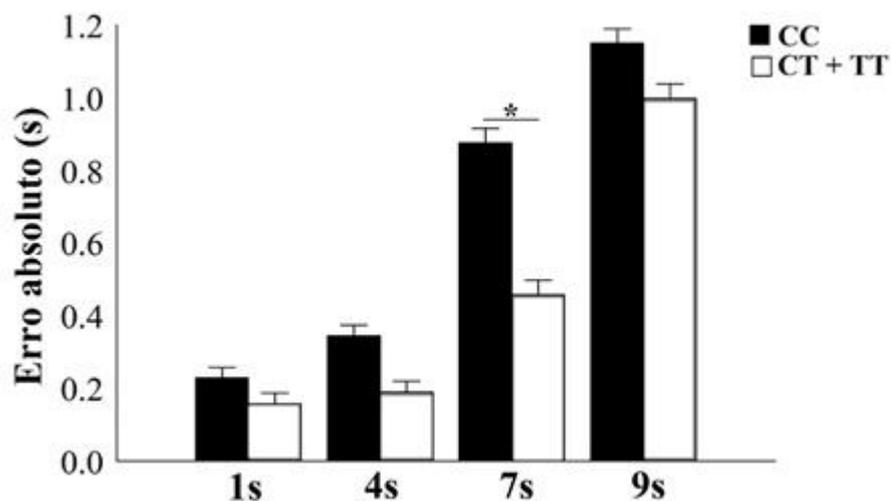
Figura 13- Efeito principal para tempo no erro relativo em rs25531.



Fonte: Própria

Além disso, uma ANOVA mista de dois fatores para o EA demonstrou interação entre o grupamento rs25532: (CC vs. CT + TT) vs. intervalos de tempo, com $[F(3)=35,49; p=0,011; \eta^2p=0,12, \text{ poder}=79\%]$. Ao analisar a interação entre as condições por meio de teste t independente foi observada diferença estatisticamente significativa para o intervalo de 7s, com $t(1578)=4,19; p=0,00001; d= 0,42; \text{IC}95\% 0,57 - 1,58$ (Figura 14), levando a um maior número de erro para esses indivíduos. Em relação ao ER não foi observado resultados significativos ($p>0,05$).

Figura 14- Interação entre grupamentos do rs25532 vs. tempo.



Fonte: Própria

Ainda não é possível explicar os resultados encontrados nessa análise. Esperava-se que o grupo de indivíduos que apresentam o alelo raro T demonstrem mais erros quando comparados aos indivíduos que não apresentam a mutação, porém não é isso que se observa no gráfico. Wendland e colaboradores (2007) em seu trabalho chegaram aos mesmos resultados inconclusivos, e aqui segue-se que outro polimorfismo ainda não identificado tem efeito sobre rs25532.

4.3 RESULTADOS NEUROFISIOLÓGICOS

Os resultados das ANOVAs mistas de dois fatores para as diferenças de assimetria da banda teta para os agrupamentos dos polimorfismos rs25531 e rs25532 não demonstram interação e nem diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$), ou seja, os polimorfismos relacionados à expressão do transportador de 5-HT, para a tarefa de percepção temporal, não promovem modulação cortical significativa. Nenhum hemisfério do CPFDL se apresenta mais predominante em relação ao outro, atuando de maneira harmônica durante a atividade.

Não podemos afirmar que os polimorfismos não modulam diferenças corticais, para isso testes complementares para outros polimorfismos deveriam ser feitos. Algumas hipóteses podem ser utilizadas para explicar os resultados. A escolha do teste, da banda e da tarefa podem influenciar os resultados, disfarçando as reais funções corticais. Para isso seria necessário que se aplicassem a análise de outras bandas nessa região, ou analisar a banda teta em outra tarefa de percepção temporal.

Quando se trata de um comportamento complexo, como é o caso da percepção de tempo, análises haplotípicas e investigação de outras bandas e tarefas podem apresentar resultados mais claros sobre as bases moleculares que influenciam a percepção temporal.

5. CONCLUSÃO

Observamos através dos relatos da literatura a importância do transportador de 5-HT na disponibilidade desse neurotransmissor na fenda sináptica, o que, em conjunto com outros neurotransmissores, afetam a cognição e conseqüentemente a percepção temporal do indivíduo. Os fenótipos apresentados por um sujeito não são derivados da influência de um único gene e tão pouco da ação exclusiva de um único neuromodulador. Apesar da forte influência da 5-HT no comportamento e das variações polimórficas associadas ao gene *SLC6A4* que codifica seu transportador, a observação de fenótipos significativos devem ser investigados em conjunto com outros polimorfismos.

O estudo aqui proposto teve como objetivo avaliar justamente essa associação entre os polimorfismos rs25531 e rs25532 do gene *SLC6A4* com a sua influência na percepção de tempo de cada indivíduo, através da tarefa de reprodução de tempo. Os resultados mostraram que os erros aumentam de acordo com o aumento de intervalo de tempo e que a diferença de erros entres os genótipos não foi significativa a ponto de associar alguma modulação dos polimorfismos com a percepção temporal do indivíduo.

Esse resultado pode estar relacionado ao fato de que a análise foi feita individualmente para cada polimorfismo, e nos confirma que isolados não são capazes de alterar o comportamento de maneira significativa. Esses dados nos abrem para a possibilidade de futuras análises haplotípicas, já que o fenótipo comportamental é complexo e modulado por diversos genes e seus polimorfismos.

6. REFERÊNCIAS

- ABRAMS, J.K; JOHNSON, P.L; HOLLIS, J.H; LOWRY, C.A. Anatomic and Functional Topography of the Dorsal Raphe Nucleus. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, 2004.
- BUONOMANO, D.V; LAJE, R. Population clocks: motor timing with neural dynamics. **Trends Cogn. Sci.**, 2010.
- BROWN, S.W. Time perception and attention: The effects of prospective versus retrospective paradigms and task demands on perceived duration. **Perception & Psychophysics**, 1985.
- CERRITO, F; RAITERI, M. Serotonin release is modulated by presynaptic autoreceptors. **Eur. J. Pharmacol.**, 1979.
- CLARK, C; WEISSBACH, H; UDENFRIEND, S. 5-hydroxytryptamine decarboxylase: preparation and properties. **Journal of Biological Chemistry**, 1954.
- DAHLSTROM, A; FUXE, K. Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system. I. Demonstration of monoamines in the cell bodies of brain stem neurons. **Acta. Physiol. Scand.**, 1964.
- DROIT-VOLET, S. Time perception, emotions and mood disorders. **J. Physiol. Paris**, 2013.
- EAGLEMAN, D.M. Human time perception and its illusions. **Curr. Opin. Neurobiology.**, 2008.
- FELL, J; AXMACHER, N. The role of phase synchronization in memory processes, **Nat. Rev. Neurosci.**, 2011.
- FONTES, R, et al. Time Perception Mechanisms at Central Nervous System. **Neurol. Int.**, 2016.
- GOMES, M. M, Eletroencefalogram physiological basis. **Rev. Bras. Neurol.**, 2015.
- GREENWOOD, P.M.; PARASURAMAN, R. Normal Genetic Variation, Cognition, and Aging. **Behav. Cogn. Neurosci. Rev.**, 2003.
- H Aidar, A.A; ABDUL-RASHEED, O.F; ABDULGHANI, E.F. Serotonin and serotonin transporter levels in autistic children. **Saudi. Med. J.**, 2018.
- HARDISTY, R; STACEY, R. 5-hydroxytryptamine in normal human platelets. **J. Physiol.**, 1955.
- HASTINGS, J.W; SWEENEY, B.M. A persistent diurnal rhythm of luminescence in *Gonyaulax polyedra*. **Biol. Bull.**, 1958.

JOHNSON, H.A; GOEL, A; BUONOMANO, D.V. Neural dynamics of in vitro cortical networks reflects experienced temporal patterns. **Nat. Neurosci**, 2010.

KOHEN, R; JARRETT, M.E; CAIN, K.C; JUN, S.E; NAVAJA, G.P; SYMONDS, S; HEITKEMPER, M.M. The serotonin transporter polymorphism rs25531 is associated with irritable bowel syndrome. **Dig. Dis. Sci.**, 2008.

LAKE, J.I.; MECK, W.H. Differential effects of amphetamine and haloperidol on temporal reproduction: Dopaminergic regulation of attention and clock speed. **Neuropsychologia**, 2013.

LI, Z; HE, Y; HAN, H; ZHOU, Y; MA, X; WANG, D; ZHOU, J; REN, H; YUAN, L; TANG, J; ZONG, X; HU, M; CHEN, X. COMT, 5-HTR2A, and SLC6A4 mRNA Expressions in First-Episode Antipsychotic-Naïve Schizophrenia and Association With Treatment Outcomes. **Front. Psychiatry.**, 2018.

MERCHANT, H; HARRINGTON, D.L; MECK, W.H. Neural basis of the perception and estimation of time. **Annu. Rev. Neurosci.**, 2013.

MIONI, G; STABLUM, F; MC CLINTOCK, S.M; GRONDIN, S. Different methods for reproducing time, different results. **Atten. Percept. Psychophys.**, 2014.

MOHAMMAD-ZADEH, L. F.; MOSES, L.; GWALTNEY-BRANT, S. M. Serotonin: a review. **J. Vet. Pharmacol. Ther.**, 2008

MURDOCH, J.D; SPEED, W.C; PAKSTIS, A.J; HEFFELFINGER, C.E; KIDD, KK. Worldwide population variation and haplotype analysis at the serotonin transporter gene SLC6A4 and implications for association studies. **Biol. Psychiatry.**, 2013.

NEUPER, C; PFURTSCHELLER, G. Event-related dynamics of cortical rhythms: frequency-specific features and functional correlates. **Int. J. Psychophysiol.**, 2001.

OLIVEIRA, A. **Efeito do polimorfismo MAOA-VNTR Sobre o erro e a assimetria da banda alfa no córtex pré-frontal durante tarefa de estimativa de tempo.** Dissertação (Dissertação em Ciências Biomédicas) - Universidade Federal do Piauí. Piauí, 2017

PEZAWAS, L; MEYER-LINDENBERG, A; DRABANT, E.M; VERCHINSKI, B.A; DE MUNOZ, KE; DE KOLACHANA, B.S; EGAN, M.F; MATTAY, V.S; HARIRI, A.R, WEINBERGER, D.R. 5-HTTLPR polymorphism impacts human cingulate-amygdala interactions: a genetic susceptibility mechanism for depression. **Nat. Neurosci.**, 2005.

RALPH, M.R; FOSTER, R.G; DAVIS, F.C; MENAKER, M. Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. **Science**, 1990.

RAMAMOORTHY, S.; BAUMANT, A. L.; MOORET, K. R.; HONG HANA, YANG-FENG, T.; CHANG, A. S.; GANAPATHY, V.; BLAKELYT, R. D.; Antidepressant- and Cocaine-Sensitive Human Serotonin Transporter: Molecular Cloning, Expression, and Chromosomal Localization. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 1993.

RAO, S.M; MAYER, A.R; HARRINGTON, D.L. The evolution of brain activation during temporal processing. **Nat. Neurosci.**, 2001.

RASHIDI, F.A; AHMADIPOUR, E; SHIRAVAND, S; AHMADIANI, A; ASADI, J. Association of the functional serotonin transporter haplotype with familial form of obsessive compulsive disorder in Iranian patients. **Int. J. Psychiatry Clin. Pract.**, 2017.

ROCHA, F.T, et al. EEG Acquisition and Processing for Cognitive Brain Mapping During Chess Problem Solving. **IEEE Latin America Transactions**, 2016.

SCIENTIFC AMERICA. **As Múltiplas Faces do Tempo**, 2002.

SEPÚLVEDA, R; et al, Classification of encephalographic signals using artificial neural networks. **Computación y Sistemas**, 2015.

SILVA, A.F; TRUONG, D.Q; SANTOS, M.F; TOBACK, R.L; DATTA, A; BIKSON, M. State-of-art neuroanatomical target analysis of high-definition and conventional tDCS montages used for migraine and pain control. **Front. Neuroanat.**, 2015.

SIEBNER, R; TAKANO, B; PEINEMANN, A; SCHWAIGER, M; CONRAD, B; DRZEZGA, A. Continuous transcranial magnetic stimulation during positron emission tomography: a suitable tool for imaging regional excitability of the human cortex. **Neuroimage.**, 2001.

STEVENSON, J. Insights and barriers to clinical use of serotonin transporter pharmacogenetics in antidepressant therapy. **Pharmacogenomics**, 2017.

TEIXEIRA, S.; et al. Time Perception distortion in neuropsychiatric and neurological disorders. **CNS Neurol. Disord. Drug. Targets.**, 2013.

TYCE, G. Origin and metabolism of serotonin. **J. Cardio. Pharmacology**, 1990.

TUCCI, V.; BUHUSI, C.V.; GALLISTEL, R.; MECK, W.H. Towards an integrated understanding of the biology of timing. **Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.**, 2014.

WELSH, D.K; LOGOTHETIS, D.E; MEISTER, M; et al. Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing rhythms. **Neuron**, 1995.

WENDLAND J.R; MOYA .PR; KRUSE M.R; REN-PATTERSON, R.F; JENSEN, C.L; TIMPANO, K.R; MURPHY, D.L. A novel, putative gain-of-function haplotype at SLC6A4 associates with obsessive-compulsive disorder. **Hum. Mol. Genet.**, 2007.

WENDLAND, J.R; KRUSE, M.R; CROMER, K.C; MURPHY, D.L. A large case-control study of common functional SLC6A4 and BDNF variants in obsessive-compulsive disorder. **Neuropsychopharmacology**, 2007.

ANEXO

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 avaliação de polimorfismos associados ao sistema dopaminérgico, serotoninérgico, gabaérgico e de genes associado os ciclo cicardiano (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 com o 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, do 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 com o 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 e-mails: pintogr@gmail.com ou silmar Teixeira@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