

# Moléculas que marcam o tempo: implicações para os fenótipos circadianos

## Timekeeping molecules: implications for circadian phenotypes

Danyella Silva Pereira<sup>1</sup>, Sergio Tufik<sup>1</sup>, Mario Pedrazzoli<sup>1</sup>

### Resumo

**Objetivo:** Revisar resumidamente a literatura dos últimos 36 anos de pesquisa em cronobiologia molecular a fim de informar aos profissionais de saúde os avanços obtidos nesta área e os potenciais para aplicação na clínica médica. **Método:** Buscas na literatura foram realizadas utilizando as bases de dados PubMed e Scopus usando como palavras-chave “clock genes, circadian rhythms, diurnal preference, delayed sleep phase syndrome, advanced sleep phase syndrome, photoperiod and mood disorder”. **Discussão:** Atualmente, o mecanismo molecular da regulação da ritmicidade circadiana é compreendido em grande detalhe. Muitos estudos publicados mostram associações de polimorfismos nos genes relógio com transtornos do ritmo circadiano e com transtornos do humor. **Conclusões:** De maneira geral, o progresso obtido na área de cronobiologia molecular traz um melhor entendimento da regulação do sistema de temporização biológico. O desenvolvimento de estudos nesta área tem o potencial de ser aplicável ao tratamento dos transtornos dos ritmos circadianos e certos transtornos do humor, além de prevenir riscos à saúde causados por viagens intercontinentais (Jet Lag) e por trabalhos noturnos e por turnos.

**Descritores:** Transtornos do sono; Transtornos do humor; Ritmo circadiano; Cronobiologia; Sono

### Abstract

**Objective:** The aim of this study was to review the molecular chronobiology studies in the last 36 years in order to point out the advances in this area to health professionals. **Method:** We searched in the PubMed and Scopus data banks for articles related with human molecular chronobiology. The keywords used were “clock genes, circadian rhythms, diurnal preference, delayed sleep phase syndrome, advanced sleep phase syndrome, photoperiod and mood disorder”. **Discussion:** The knowledge about molecular mechanism of circadian rhythms increased a lot in the last years and now we are able to better understand the details of molecular processes involved in circadian and sleep regulation. Studies show that polymorphisms in clock genes are associated with sleep and mood disorders. These studies will be helpful to further elucidate the regulation of molecular mechanisms of circadian rhythms. **Conclusions:** The development of these studies in molecular chronobiology can be helpful to treat circadian and mood disorders and to prevent health risks caused by intercontinental flights (Jet Lag), nocturnal or shift work schedule.

**Descriptors:** Sleep disorders; Mood disorders; Circadian rhythm; Chronobiology; Sleep

<sup>1</sup> Departamento de Psicobiologia, Universidade Federal de São Paulo (Unifesp), São Paulo (SP), Brasil

### Correspondência

Mario Pedrazzoli  
Rua Napoleão de Barros, 925 - 3º andar – sala 1 – Vila Clementino  
04024-002 São Paulo, SP, Brasil  
Tel.: (+55 11) 2149-0155 R: 189 / (+55 11) 9509-3960  
E-mail: pedrazzo@psicobio.epm.br

Submetido: 18 Julho 2008  
Aceito: 14 Novembro 2008

## Introdução

A cronobiologia tem como uma de suas metas centrais estudar as características temporais da matéria viva, em todos os seus níveis de organização, o que inclui o estudo dos ritmos circadianos.

Os ritmos circadianos são ritmos biológicos que variam em torno de 24h e podem ser eventos bioquímicos, fisiológicos ou comportamentais importantes para sobrevivência. Estes ritmos são controlados por sincronizadores externos como a luz, a alimentação, entre outros, mas também persistem sem estas pistas ambientais, o que os caracteriza como ritmos gerados endogenamente.

Nos mamíferos, a integração entre a temporalidade externa ou doadores de tempo (*zeitgeber*) e a ordem temporal interna é dada pelos núcleos supraquiasmáticos do hipotálamo. Estes núcleos, localizados bilateralmente na base do hipotálamo, recebem informação da luminosidade diretamente do ambiente por meio do feixe nervoso retino-hipotalâmico. A partir destas informações, os núcleos supraquiasmáticos trabalham como um relógio mestre que fornece o sinal para a sincronização da ordem temporal interna com o ciclo claro/escuro dado pelo movimento de rotação da terra<sup>1-3</sup>.

O funcionamento adequado deste sistema de temporização e sincronização permite uma harmonização com os ciclos ambientais e proporciona uma capacidade antecipatória, a qual possibilita ao organismo organizar recursos para se preparar para eventos e atividades que sejam necessários à manutenção da vida.

A organização social humana impõe uma temporalidade na qual a maioria das atividades trabalhistas e educacionais ocorre entre 8h e 18h; portanto, os indivíduos que estão sincronizados a este horário têm tendência a um melhor desempenho. Parte da população, entretanto, está biologicamente sincronizada em horários incomuns e vive num estado dessincronizado aos horários sociais - o qual poderíamos chamar de "*Jet lag*" social, em alusão ao desarranjo temporal sofrido por viajantes aéreos que passam por vários fusos horários<sup>4</sup>.

Além do problema da adaptação ou sincronização aos horários sociais mais habituais, a sociedade urbana moderna traz alguns desafios temporais ao sistema de temporização biológico. Por exemplo, viagens transcontinentais nas quais vários fusos horários são ultrapassados em pouco tempo (o já citado, "*Jet lag*"), trabalho noturno e horários escolares nas primeiras horas da manhã para os adolescentes que naturalmente apresentam um atraso na fase de sono.

A sincronização aos horários sociais é dependente de uma tendência individual pela escolha do momento para realizar atividades, num contínuo que vai da preferência pela manhã até a preferência pela tarde e noite. Esta preferência individual, que inclui os horários de dormir e acordar, é denominada, em biologia, de cronotipo. Se um indivíduo que tem uma tendência natural a ser vespertino, ou seja, dorme e acorda tarde, necessita acordar muito cedo para obrigações sociais como trabalho ou escola, seu desempenho será prejudicado e sua adaptação a este evento temporal não será totalmente eficiente<sup>4</sup>.

Pesquisas recentes mostram que a matutinitude ou a vespertinidade, ou os cronotipos, são características resultantes do funcionamento do sistema de temporização circadiano que são herdadas geneticamente e sofrem uma adaptação às condições ambientais<sup>5-8</sup>.

Nas últimas décadas, os estudos moleculares da ritmicidade circadiana conquistaram um grande espaço na pesquisa científica. Em 36 anos de investigações genéticas da ritmicidade circadiana, desde o primeiro estudo em 1971<sup>9</sup>, foram publicadas desde as primeiras pequenas indicações genéticas da regulação da

ritmicidade circadiana molecular em moscas drosófilas até uma visão geral do mecanismo molecular dos ritmos circadianos em mamíferos incluindo os humanos<sup>5,9-12</sup>. Neste artigo, pretendemos revisar resumidamente os avanços obtidos nestes 36 anos de pesquisa e demonstrar a importância destes estudos para a saúde humana e a medicina preventiva.

## Método

Parte das informações obtidas nesta revisão deriva do conhecimento pessoal dos autores sobre o assunto e de arquivos pessoais. Buscas na literatura foram realizadas utilizando as bases de dados PubMed e Scopus, usando como palavras-chave "*clock genes, circadian rhythms, diurnal preference, delayed sleep phase syndrome, advanced sleep phase syndrome, photoperiod and mood disorder*". Foram selecionados 11 artigos de revisão, 51 artigos originais, três relatos de caso, três estudos em gêmeos, oito artigos clássicos, dois estudos comparativos, três estudos clínicos e um manual de classificação diagnóstica.

Os artigos selecionados correspondem ao período de 1970 até os dias atuais. Nenhum critério de exclusão foi utilizado.

## Revisão da literatura

### 1. Os genes relógio

A primeira evidência genética da regulação dos ritmos circadianos foi publicada na década de 70 por Konopka e Benzer<sup>9</sup>. Estes pesquisadores analisaram drosófilas mutantes e observaram que alguns animais apresentavam ritmicidade circadiana anormal da atividade locomotora. Em moscas colocadas em livre-curso, ou seja, sem a presença de pistas temporais ambientais, se podiam observar três linhagens mutantes distintas para o fenótipo do ritmo circadiano de locomoção motora: um mutante arritmico, um mutante com período circadiano endógeno curto (19h) e um mutante com período longo (28h). Tais achados indicavam que mutações no DNA podiam causar anormalidades na marcação do tempo biológico.

Após esta descoberta na década de 70<sup>9</sup>, nenhum estudo sobre a regulação da ritmicidade circadiana em mamíferos surgiu até 1988, ano no qual Ralph e Menaker<sup>11</sup> mostraram a primeira evidência da regulação genética do ritmo circadiano do ciclo sono-vigília em mamíferos. Estes pesquisadores observaram que um dos animais de seu laboratório apresentava uma regulação anormal da ritmicidade circadiana. Este hamster, quando colocado em livre-curso, apresentava um período endógeno curto de atividade locomotora e uma sincronização anormal ao ciclo 24h claro/escuro.

Por meio de cruzamentos sucessivos, eles puderam observar nas proles três fenótipos diferentes: animais com período endógeno médio de 24,1h (selvagens), hamsters com período médio de 22h, e outro grupo com período médio de 20h. Este padrão genético de herança observado é típico do padrão mendeliano clássico que ocorre em um único locus autossômico e revela que somente um gene está envolvido no estabelecimento do fenótipo. Esta mutação foi denominada a princípio *tau*, como referência a abreviação usada em cronobiologia para período circadiano endógeno (T)<sup>11</sup>.

Nesta época (1988), não existiam ainda ferramentas de biologia molecular suficientes para identificar qual era exatamente o gene e a mutação existente neste animal; no entanto, este trabalho é um grande marco para a pesquisa molecular da ritmicidade circadiana<sup>11</sup>. Os resultados encontrados mostraram que, exatamente como nas moscas drosófilas, mas no sistema mais complexo do organismo mamífero, uma mutação em somente um gene podia alterar

drasticamente a regulação de ritmicidade circadiana. Tais achados em um mamífero indicavam que em humanos o mecanismo poderia ser o mesmo.

Com o estudo de Ralph e Menaker<sup>11</sup>, as investigações moleculares da ritmicidade circadiana em mamíferos evoluíram rapidamente e alguns genes foram identificados como participantes do sistema de temporização circadiano.

Vitaterna et al. identificaram especificamente o primeiro gene do sistema de temporização em mamíferos<sup>13</sup>. Neste estudo, os pesquisadores, por meio de agentes mutagênicos, induziram mutações em camundongos que resultaram em alterações no comprimento do período endógeno e perda da ritmicidade circadiana dos animais. O cruzamento entre animais heterozigotos mutantes produziu três fenótipos diferentes para a geração F2, indicando que a mutação estava localizada em um único gene que poderia ser o responsável por regular o comportamento circadiano de atividade/repouso em mamíferos. Análises posteriores demonstraram que este gene – denominado gene *Clock* (do inglês, *Circadian Locomotor Output Cycle Kaput*) – estava localizado no cromossomo 5 em camundongos (região equivalente ao cromossomo 4 humano).

Após a caracterização do primeiro gene envolvido com o sistema de temporização em mamíferos, outros genes foram descobertos, mostrando a complexidade deste sistema na regulação dos ritmos circadianos, como o ciclo sono-vigília, a regulação da temperatura corporal e a regulação da secreção hormonal.

O gene *Bmal1* (também conhecido como *Mop3*) faz parte do sistema de temporização em mamíferos. Em 1998, foi demonstrado que as proteínas CLOCK e BMAL1 se unem, formando um heterodímero que é responsável por promover a transcrição dos genes *Period 1* (*Per1*), *Period 2* (*Per2*) e *Period 3* (*Per3*).<sup>14</sup> Animais com o gene *Bmal1* não funcional (animais *knock-out Bmal1*) tornam-se totalmente arrítmicos em escuro constante e com a atividade locomotora prejudicada em condições normais de luminosidade<sup>15</sup>.

Em 1992, foi demonstrado que seqüências conservadas do gene *Per* de drosófilas eram também expressas nos Núcleos Supraquiasmáticos (NSQs) de mamíferos<sup>16</sup>. A descrição completa e a caracterização do gene *Per1* em mamíferos foram feitas em 1997<sup>17</sup>. Em 1998, Takumi et al.<sup>18</sup> isolaram o segundo gene *Per* em mamíferos (*Per2*) - que possui alta homologia com o gene *Per1* - e, neste mesmo ano, foi isolado outro gene desta família, em mamíferos, o gene *Per3*<sup>19,20</sup>.

Diferente das drosófilas, o relógio molecular dos mamíferos possui três proteínas PER com papel provavelmente não redundante<sup>21,22</sup>. Os genes *Per1* e *Per2* apresentam diferentes respostas a pulsos de luz nos núcleos supraquiasmáticos do hipotálamo<sup>20</sup>, enquanto o *Per3* tem um padrão oscilatório de expressão independente da luz<sup>19</sup>. Animais *knock-out* para os genes *Per1*, *Per2* e *Per3* apresentam período endógeno mais curto em livre-curso. Esse efeito é menos evidente para os animais *knock-out* para o gene *Per3*, que apresentam somente 30 minutos de encurtamento do período endógeno<sup>23</sup>.

Os genes *Cryptochromes* (*Cry1* e *Cry2*) são membros da família de receptores de luz azul em plantas<sup>24-26</sup>. Em mamíferos, estes genes foram primeiramente classificados como possíveis candidatos para fotorreceptores circadianos<sup>27</sup>; no entanto, análises posteriores demonstraram que estes genes têm um papel independente da luz no sistema circadiano de mamíferos<sup>28</sup>. Estudos em animais *knock-out* mostram que estes genes são essenciais para a regulação molecular do sistema de temporização e estão envolvidos com a regulação do período endógeno e com a sincronização ao ciclo claro-escuro.

Camundongos *knock-out* para o gene *Cry1* apresentam um período curto em livre-curso, enquanto os *knock-outs* para o gene *Cry2* exibem um período endógeno longo. Animais duplo-*knock-out* tornam-se arrítmicos em escuro constante<sup>29</sup>.

O gene *Timeless* (*Tim*) é o componente mais controverso do sistema de temporização dos mamíferos. Em drosófilas, o seu papel já está bem estabelecido na alça de retroalimentação negativa do relógio molecular<sup>30</sup>, mas em mamíferos sua função ainda não é clara.

O gene *Tim* foi identificado em mamíferos no ano de 1998<sup>31-33</sup>, expresso nos núcleos supraquiasmáticos de camundongos; entretanto, não se conseguiu demonstrar um padrão de oscilação que pudesse caracterizá-lo como gene relógio<sup>34</sup>. Embora não exista um padrão de oscilação forte do gene *Tim*, a interação que existe entre a proteína TIM e as proteínas PER sugere que este gene seja um importante componente molecular do relógio circadiano. Gotter et al. propõem que o gene *Tim* é essencial para o desenvolvimento embrionário, mas não para a função circadiana em mamíferos<sup>35</sup>. No entanto, Barnes et al., analisando animais *knock-down* condicional para a expressão da proteína TIM nos núcleos supraquiasmáticos de ratos, conseguiram demonstrar a importância deste gene como um dos componentes centrais do “relógio” molecular dos mamíferos<sup>36</sup>.

Finalmente, em 2000<sup>10</sup>, a mutação *tau*, caracterizada como uma mutação que encurta o período circadiano endógeno e identificada pela primeira vez em 1988<sup>11</sup> em hamsters, foi encontrada no genoma do camundongo e localizada no gene da caseína quinase I épsilon (CKIε), uma importante enzima envolvida na fosforilação das proteínas relógio<sup>10</sup>.

Todos estes genes descritos possuem muitas características em comum, o que os caracteriza como genes relógio. Em primeiro lugar, eles possuem um perfil robusto de oscilação no NSQ que dura aproximadamente 24h, exceto pelo gene *Clock*. Mutações em qualquer um destes genes podem causar uma regulação circadiana anormal com fenótipos que vão desde períodos endógenos mais curtos ou mais longos até a perda da ritmicidade e um prejuízo na sincronização pela luz. Como todos estes genes atuam nas engrenagens do relógio molecular, o mau funcionamento de algum deles pode levar a um prejuízo nos ajustes necessários para a maquinaria do relógio, avançando ou atrasando o tempo biológico.

Em segundo lugar, todos os genes relógio codificam proteínas que possuem o domínio PAS (Per-Arnt-Sim)<sup>37</sup>, um domínio protéico que permite a dimerização proteína-proteína. As proteínas com domínio PAS só são funcionais quando dimerizadas com outras proteínas que têm o mesmo domínio; este mecanismo de interação protéica é essencial para o funcionamento do relógio circadiano. Os genes *Clock* e *Bmal1* possuem um domínio adicional chamado *basic-helix-loop-helix* que permite a interação destes genes com a molécula de DNA<sup>12</sup>. O heterodímero CLOCK/BMAL1 possui a capacidade de ligação com o DNA e age como um fator de transcrição para os outros genes relógio e para outros genes conhecidos como genes controlados pelo relógio<sup>10,38</sup>.

Baseado nestas características, Lowrey et al. propuseram um mecanismo no qual uma alça de retroalimentação negativa que envolve a transcrição e a tradução de todos os genes relógio estaria atuando como reguladora da ritmicidade circadiana<sup>10</sup>. O heterodímero formado pelas proteínas CLOCK e BMAL1 promove a transcrição dos genes *Per1*, *Per2*, *Per3*, *Cry1* e *Cry2*. As proteínas codificadas por estes genes, uma vez sintetizadas, formam dímeros no citoplasma e, quando alcançam determinados níveis, retornam ao núcleo, bloqueando a ação do heterodímero CLOCK/BMAL1

na transcrição de seus próprios genes, formando assim uma alça de retroalimentação negativa de transcrição e tradução que dura aproximadamente 24h<sup>10,32</sup>. As enzimas CKI $\epsilon$  e CKI $\delta$  também estão envolvidas neste mecanismo e têm como papel principal regular a atividade das proteínas PER por meio de fosforilação<sup>10</sup>. Entretanto, está claro que este é um modelo bastante simplificado (Figura 1), pois novas descobertas estão sendo descritas demonstrando a complexidade deste sistema.

As proteínas do sistema de temporização biológico, principalmente as proteínas PER, são bastante complexas. Elas possuem o domínio PAS associado com um domínio de localização citoplasmática, sítios de ligação com as CKIs, sítios de fosforilação e um domínio de localização nuclear. Nesta complexidade, se inclui também o fluxo de entrada e saída destas proteínas no núcleo celular que ainda não são completamente entendidas<sup>10,17-20</sup>.

Nos últimos cinco anos, foram descobertos novos genes envolvidos na regulação da ritmicidade circadiana. O gene *Rev-Erba* foi descrito como um regulador negativo dos genes *Clock* e *Bmal1*<sup>39</sup>. O gene *Rora* tem a função de ativar a transcrição do gene *Bmal1* no NSQ, funcionando como um regulador positivo<sup>40</sup>. Os genes *Dec1* e *Dec2* são fatores de transcrição *basic-helix-loop-helix* que reprimem a indução da ativação do gene *Per1* de camundongos pelo heterodímero CLOCK/BMAL1 por meio de interações diretas com a proteína BMAL1 e/ou competição por elementos E-box<sup>41</sup>. Estes novos genes participam de alças auxiliares para a alça de retroalimentação central do relógio biológico, descrita anteriormente. Em mamíferos, estas alças adicionais teriam a função de estabilizar e proporcionar um controle fino do mecanismo de transcrição e tradução, controlando a expressão e oscilações do gene *Bmal1*<sup>42</sup> (Figura 1).

Devido à complexidade da maquinaria molecular do relógio biológico, muitas moléculas provavelmente ainda serão descritas para explicar o exato mecanismo de interação entre alças de retroalimentação central e secundárias envolvidas no controle da ritmicidade circadiana.

## 2. O significado da existência do relógio molecular em humanos

Uma consequência dos estudos descritos anteriormente é entender como a regulação molecular do sistema de temporização em mamíferos é aplicável na regulação da ritmicidade circadiana em humanos. Se mutações nos genes relógio levam à regulação anormal da ritmicidade circadiana em animais, poderíamos supor que a regulação da fisiologia circadiana e seus aspectos fisiopatológicos podem ser consequências da variabilidade genética nestes genes relógio?

Uma consequência direta da regulação diferencial da ritmicidade circadiana em humanos são os já descritos cronotipos (preferência em realizar as atividades pela manhã ou pela tarde), os transtornos do ritmo circadiano (fases do sono atrasada e adiantada), transtornos do humor, principalmente os ligados à sazonalidade, e o transtorno bipolar.

## 3. Fenótipos de ritmo circadiano: patológicos e não patológicos (Tabela 1)

Existem três tipos de transtornos do sono caracterizados por anormalidades no sistema circadiano já bem descritos hoje em dia. A Síndrome da Fase Atrasada do Sono (SFAS) é um transtorno no qual o principal episódio de sono é atrasado, resultando em sintomas semelhantes à insônia e dificuldade de levantar no horário desejado pela manhã. A Síndrome de Fase Avançada do Sono (SFAVS) é

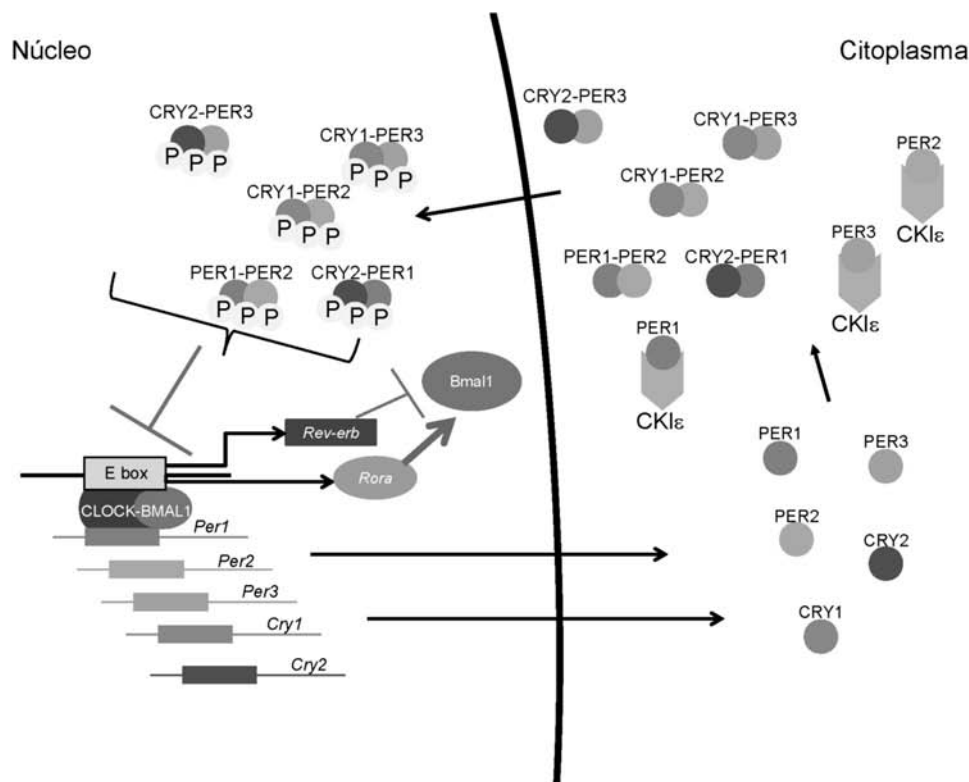


Figura 1 - Representação esquemática do mecanismo molecular do sistema de temporização circadiano em uma célula. Os círculos com um P no interior são os fosfatos adicionados durante a fosforilação pela CKI $\epsilon$ . Os símbolos  $\perp$  representam a inibição do heterodímero CLOCK-BMAL1 pelos dímeros formados pelas proteínas PERs e CRYs e a inibição do gene *Bmal1* pelo gene *Rev-erb*.



Tabela 1 - Resumo dos principais artigos sobre fenótipos do ritmo circadiano e genes relógio

Referências bibliográficas	Fenótipo, gene e polimorfismo	Resultados
Katzenberg et al., 1998 <sup>5</sup> Robilliard et al., 2002 <sup>45</sup>	Matutinos, vespertinos extremos, gene <i>Clock</i> , SNP T3111C Matutinos e vespertinos extremos e pacientes com SFAS, Gene <i>Clock</i> , SNP T3111C	Aumento da frequência do alelo C em vespertinos Nenhuma diferença encontrada entre o SNP T3111C e a preferência diurna ou a SFAS
Pedrazzoli et al., 2007 <sup>7</sup>	Matutinos, vespertinos extremos e pacientes com SFAS, Gene <i>Clock</i> , SNPs T3111C e T257G	Nenhuma diferença encontrada entre os SNPs T3111C e T257G e a preferência diurna ou a SFAS
Ebisawa et al., 2001 <sup>43</sup>	Pacientes com SFAS, Gene <i>Per3</i> , <i>Screening</i> em todos éxons do gene <i>Per3</i>	Associação de um dos haplótipos analisados com a SFAS
Archer et al., 2003 <sup>46</sup>	Indivíduos matutinos, intermediários e vespertinos e pacientes com SFAS, Gene <i>Per3</i> , VNTR	Aumento da frequência do alelo de quatro repetições nos vespertinos e pacientes com SFAS
Pereira et al., 2005 <sup>8</sup>	Indivíduos matutinos, intermediários, vespertinos e pacientes com SFAS, Gene <i>Per3</i> , VNTR	Aumento de frequência do alelo de quatro repetições nos vespertinos e aumento da frequência do alelo de cinco repetições nos pacientes com SFAS
Viola et al., 2007 <sup>51</sup>	Indivíduos selecionados pelo genótipo do gene <i>Per3</i> , homozigotos quatro repetições e homozigotos cinco repetições colocados em condições de rotina constante	Alelo de cinco repetições está associado com o aumento da pressão de sono, ou seja, com a homeostase do sono
Toh et al., 2001 <sup>54</sup>	Família de pacientes com SFAVS, gene <i>Per2</i> , mutação A2106G	Mutação presente em todos os membros afetados da família com SFAVS
Carpen et al., 2005 <sup>48</sup>	Indivíduos matutinos, intermediários, vespertinos, gene <i>Per2</i> , SNPs C1228T, C111G e G3853A	Somente no SNP C111G foi encontrado um aumento da frequência do alelo G nos indivíduos matutinos
Carpen et al., 2006 <sup>47</sup>	Matutinos, vespertinos extremos e pacientes com SFAS, gene <i>Per1</i> , SNP T2434C	Aumento da frequência do alelo C em matutinos. Nenhuma diferença entre o SNP e a SFAS

caracterizada por um episódio de sono adiantado, próximo ao começo da fase noturna e despertar espontâneo nas primeiras horas da manhã. Na síndrome do ciclo sono-vigília diferente de 24h (N-24) os pacientes apresentam um padrão constante crônico de atrasos diários em uma ou duas horas no começo e final do sono, resultando em um horário não constante de início do sono e despertar<sup>43</sup>.

Além destas condições patológicas do sistema circadiano, existe uma condição normal de sincronização circadiana ao ciclo de 24h, chamada preferência diurna, que caracteriza o já comentado cronotipo, ou seja, o horário preferido do dia para realizar atividades. Parte da população tem preferência em levantar cedo e realizar suas atividade pela manhã - são os chamados matutinos. Os vespertinos preferem acordar tarde e realizar suas atividades durante à tarde ou à noite. No entanto, a maioria da população é intermediária, ou seja, escolhe horários intermediários entre os dois extremos. Recentemente, foi demonstrado um caráter genético na escolha do momento ideal para a realização das atividades<sup>5,7,8,44</sup>.

A primeira publicação que demonstrou o efeito de um gene relógio na preferência diurna em humanos surgiu em 1998<sup>5</sup>. Neste estudo, Katzenberg et al.<sup>5</sup> demonstraram que um polimorfismo localizado na região 3' do gene *Clock* (C3111T) está associado ao cronotipo. Eles verificaram que o alelo C na posição 3111 está associado com a vespertinidade. Estudo em animais transgênicos que carregam polimorfismo T3111C do gene *Clock* humano mostra que os animais homozigotos CC, quando colocados em claro constante no período de lactação, tornam-se um modelo de animal com fase atrasada do sono. Este modelo de animal será importante em pesquisas futuras para entendermos melhor o mecanismo fisiopatológico da SFAS, bem como seu tratamento<sup>45</sup>.

Mas, apesar disso, os dados em relação a este polimorfismo ainda são controversos. Em 2002, Robilliard et al.<sup>46</sup> não encontraram a mesma associação em uma amostra da população inglesa e alguns dados obtidos em nosso laboratório também não mostram a associação do polimorfismo no gene *Clock* com a preferência diurna em uma amostra da população brasileira<sup>7</sup>.

Archer et al.<sup>47</sup> e Pereira et al.<sup>8</sup> demonstraram que um polimorfismo de repetição (VNTR - *Variable Number of Tandem Repeat*) no gene

*Per3* humano está associado com a preferência diurna. Ambos os grupos de pesquisa demonstraram que a frequência do alelo curto (quatro repetições) é maior em grupos de vespertinos do que em grupos de matutinos.

Carpen et al. analisaram polimorfismos no gene *Per1* (T2434C) e na região 5' não-traduzida no gene *Per2* (C111G) e verificaram associação com o cronotipo<sup>48,49</sup>. Como o polimorfismo T2434C não altera a seqüência de aminoácidos na proteína e nem a estrutura do RNAm, os autores sugerem que alteração (T2434C) esteja em desequilíbrio de ligação com algum polimorfismo desconhecido; por outro lado, o polimorfismo do gene *Per2* pode alterar a estrutura secundária do RNAm transcrito e, como o alelo 111G está associado com a matutividade, os autores sugerem que este alelo seja também um forte candidato de associação para pacientes com SFAVS.

Estes e outros polimorfismos em genes relógio têm sido estudados em casos esporádicos de transtornos do ritmo circadiano. Ebisawa et al. mostraram que polimorfismos presentes no gene *Per3* podem estar associados com a SFAS<sup>44</sup>. Archer et al.<sup>47</sup> reduziram a região estudada por Ebisawa et al.<sup>44</sup> e verificaram que o VNTR presente no gene *Per3* está associado com a SFAS. Estes pesquisadores verificaram que a frequência do alelo curto de quatro repetições era maior no grupo de pacientes com SFAS. Nosso grupo<sup>8</sup> encontrou associação do alelo oposto, o alelo longo (cinco repetições), com a SFAS. Os dois estudos foram feitos em populações com origem étnica caucasiano-européia vivendo em diferentes latitudes, indicando que a latitude pode afetar a expressão dos genes relógio. Como consequência, apesar de causar estranheza, sugere que pacientes com SFAS podem apresentar melhora ao mudar de latitude. Interessantemente, há um relato de caso sobre um paciente com SFAS morador de Paris que apresentou uma melhora do quadro de atraso do sono ao mudar-se para o Rio de Janeiro<sup>50</sup>.

A lógica biológica para se entender a relação entre latitude e preferência diurna ou transtornos do ritmo circadiano reside no fato de que a latitude traz embutida uma diferença gritante nas variações anuais de energia solar luminosa ou comprimento do dia. Estas variações são elementos essenciais de sinalização temporal do ambiente para o cérebro e exige do sistema de temporização

circadiano plasticidade suficiente para efetuar a sincronização ao claro/escuro ambiental.

Em São Paulo, a diferença entre o dia mais curto e o mais longo do ano é de aproximadamente 2h, enquanto em Londres esta diferença é de 8h. Dados de nosso grupo a partir da caracterização de 12 mil pessoas no Brasil reforçam o efeito da latitude no cronotipo. Estes dados mostram que as pessoas que vivem próximas à linha do equador nos Estados do Norte e Nordeste (onde praticamente não há variabilidade da energia luminosa ao longo do ano) têm uma tendência maior a serem matutinos em relação a indivíduos que vivem no Sul do país (comunicação pessoal). Interessantemente, um recente estudo mostra que o índice de suicídios no país ao longo do ano tem uma tendência sazonal, como em países do hemisfério norte, somente nos Estados do Sul nos quais, devido à latitude, há um contraste muito maior na variação da energia luminosa ao longo do ano<sup>51</sup>.

Um estudo em condições laboratoriais constantes e monitoradas em indivíduos saudáveis selecionados por seu genótipo no gene *Per3* (homozigotos para quatro ou cinco repetições) corrobora estudos de campo sobre os notáveis efeitos deste gene na estrutura do sono, incluindo marcadores da homeostase. Este estudo sugere que o gene *Per3* esteja envolvido não somente com a regulação circadiana, como também com a regulação homeostática do sono<sup>52</sup>.

Estudos em famílias têm demonstrado que o avanço ou o atraso de fase do sono possui um caráter hereditário<sup>53,54</sup>. A identificação de famílias com transtornos do ritmo circadiano é uma importante ferramenta para identificar genes relacionados com a regulação dos ritmos circadianos do ciclo sono-vigília em humanos.

Em 2001, Reid et al. caracterizaram fenotipicamente uma família com SFAVS e observaram que existia um indivíduo afetado para cada geração, seguindo um padrão mendeliano de herança autossômica dominante<sup>54</sup>. Ancoli-Israel et al. publicaram um heredograma de uma família com SFAVS<sup>53</sup>.

Toh et al. analisaram molecularmente uma família com SFAVS e verificaram que uma mutação encontrada no gene *Per2* (A2106G) estava presente em todos os membros afetados da família<sup>55</sup>. Em 2007, Xu et al. inseriram esta mutação humana do gene *Per2*

(A2106G) em camundongos e observaram o mesmo fenótipo de avanço de fase nos animais e conseqüentemente a diminuição do período endógeno, reforçando a associação desta mutação com a SFAVS<sup>56</sup>.

Em geral, estudos em animais têm demonstrado que variações nos genes relógio causam anormalidades na regulação dos ritmos circadianos, principalmente por alteração no comprimento do período endógeno, levando a uma alteração no ângulo de fase de sincronização pela luz. Fenótipos circadianos muito semelhantes aos encontrados em animais são vistos em humanos, abrindo um leque bastante grande para pesquisas científicas, que visam buscar associações de alterações nos genes relógio com fenótipos circadianos. Provavelmente, nos próximos anos, novas variações serão encontradas e associadas com a regulação circadiana em humanos. Assim, fica aberta a possibilidade de podermos construir um mapa de variações genéticas dos genes relógio, que poderá ser aplicado à biologia circadiana humana e auxiliar no tratamento de problemas de saúde desenvolvidos por regulação anormal dos ritmos circadianos.

#### 4. Transtornos do humor (Tabela 2)

Embora a etiologia dos transtornos do humor seja extremamente complexa e não completamente entendida, uma possível explicação para estes transtornos seria o mau funcionamento do sistema de temporização circadiano que produziria uma dessincronização da ordem temporal interna e provavelmente dificuldades para sincronização com os ciclos ambientais, produzindo os fenótipos observados nestes pacientes. Alguns estudos mostram que nos transtornos do humor, como, por exemplo, o transtorno sazonal, o transtorno bipolar e a depressão, há uma disfunção nos ritmos circadianos de secreção de cortisol, da temperatura corporal central e do ciclo sono/vigília<sup>57-60</sup>. O tratamento com terapia de luz intensa é bastante eficaz em pacientes com transtorno afetivo sazonal e pode ser comparado com a eficácia dos medicamentos antidepressivos<sup>61</sup>. Estes fatos reforçam uma ligação importante entre estes transtornos e a regulação anormal da ritmicidade circadiana.

**Tabela 2 - Resumo dos principais artigos sobre transtornos de humor e genes relógio**

Referências bibliográficas	Fenótipo, gene e polimorfismo	Resultados
Desan et al., 2000 <sup>60</sup>	Pacientes com depressão maior, controles, indivíduos europeus-americanos (EA), indivíduos africanos-americanos (AA), Gene <i>Clock</i> , SNP T3111C	Nenhuma diferença foi encontrada entre pacientes e controles. Diferença significativa da frequência do polimorfismo entre EA e AA
Benedetti et al., 2003 <sup>72</sup>	Pacientes com transtorno bipolar e indivíduos controles, gene <i>Clock</i> , SNP T3111C	Aumento da frequência do homozigoto CC em pacientes com transtorno bipolar (sintomas por mais de cinco anos)
Serreti et al., 2003 <sup>77</sup>	Pacientes com depressão maior e transtorno bipolar, gene <i>Clock</i> , SNP T3111C	Os pacientes homozigotos CC mostraram aumento da recorrência de insônia
Serreti et al., 2005 <sup>78</sup>	Pacientes em fase de tratamento com antidepressivos, gene <i>Clock</i> , SNP T3111C	A maioria dos pacientes com insônia durante o tratamento eram homozigotos CC
Bailer et al., 2005 <sup>71</sup>	Pacientes com transtorno unipolar e bipolar e controles saudáveis, gene <i>Clock</i> , SNP T3111C	Nenhuma associação deste polimorfismo foi encontrada entre os pacientes e os controles
Benedetti et al., 2007 <sup>73</sup>	Pacientes com transtorno bipolar, gene <i>Clock</i> , SNP T3111C	Pacientes homozigotos TT são mais ativos durante a tarde, o início do sono é atrasado e a duração do sono é menor
Nievergelt et al., 2006 <sup>75</sup>	Pacientes com transtorno afetivo bipolar, 10 Genes Relógio (ARNTL, CLOCK, CRY2, CSNK1epsilon, DBP, GSK3beta, NPAS2, PER1, PER2, e PER3)	Haplótipos do gene <i>Bmal1</i> e <i>Per3</i> estão associados com o transtorno afetivo bipolar
Partonen et al., 2007 <sup>76</sup>	Pacientes com transtorno afetivo sazonal e controles, Genes <i>Per2</i> , <i>Bmal1</i> e <i>Npas2</i>	Associação do transtorno afetivo sazonal com polimorfismos nos três genes estudados
Artioli et al., 2007 <sup>70</sup>	Pacientes com depressão maior e transtorno bipolar, gene <i>Per3</i> , 1SNP no éxon 15 (T/G), 1SNP no éxon 18 (TC), VNTR no éxon 18	Significante associação destes polimorfismos com a idade de início destes transtornos, a resposta ao tratamento e as respostas circadianas ao humor e ao temperamento
Mansour et al., 2006 <sup>74</sup>	Pacientes com transtorno bipolar e com esquizofrenia e indivíduos controles, oito Genes relógio ( <i>Bmal1</i> , <i>Clock</i> , <i>Per1</i> , <i>Per2</i> , <i>Per3</i> , <i>Cry1</i> , <i>Cry2</i> e <i>Tim</i> ), 46 polimorfismos nestes genes	Associações entre polimorfismos nos genes <i>Tim</i> e <i>Per3</i> com a esquizofrenia e uma modesta associação dos genes <i>Bmal1</i> e <i>Tim</i> com o transtorno bipolar

O tratamento com lítio é bastante eficaz em pacientes com transtorno bipolar<sup>62-64</sup>. O lítio é um potente inibidor da enzima glicogênio sintase quinase – 3, uma enzima que fosforila e estabiliza a proteína REV-ERB (componente negativo do “relógio biológico”). Yin et al. mostraram, em células em cultura, que a aplicação de lítio leva a uma degradação rápida de REV-ERB e, conseqüentemente, à regularização da expressão do gene *Bmal-1*<sup>65</sup>. Portanto, o controle da estabilidade da proteína REV-ERB parece importante para a manutenção do relógio biológico molecular na terapia com lítio em pacientes bipolares.

Estudos em animais com genes relógio não funcionais (animais *knock-out*) têm mostrado regulação anormal do ciclo sono/vigília, dificuldades de sincronização e falta de persistência de ritmos circadianos<sup>29,66,67</sup>. Estes genes são, portanto, excelentes candidatos para ter um papel na patofisiologia dos transtornos do humor. Além disso, estudos em famílias, gêmeos e com crianças adotadas têm mostrado que uma história familiar positiva é um fator de risco importante, sugerindo que fatores genéticos são componentes importantes que contribuem para aumentar o risco destes transtornos<sup>68-70</sup>.

A ligação relativamente óbvia entre a regulação molecular dos ritmos circadianos e os transtornos do humor desencadearam uma série de estudos que mostram que alterações ou variações em genes relógio estão associadas a estes transtornos<sup>71-79</sup>. Esta linha de pesquisa abre novos caminhos para o melhor entendimento da fisiologia destes transtornos, bem como novos tratamentos.

O gene *Clock* tem sido bastante investigado em pacientes com transtornos do humor. Benedetti et al. investigaram o papel do polimorfismo T3111C do gene *Clock* em pacientes com transtorno bipolar e verificaram um aumento da frequência do homocigoto C em pacientes que têm este transtorno por mais de cinco anos<sup>73</sup>.

Outro estudo publicado em 2007 por este mesmo grupo<sup>74</sup> analisou a atividade diurna e noturna de pacientes com depressão bipolar por meio de actimetria e verificou que os indivíduos homocigotos T eram mais ativos durante à tarde, iniciavam o sono com certo atraso (em média 79 minutos) e dormiam menos durante a noite (em média 75 minutos). Animais *knock-out* para o gene *Clock* podem apresentar estados comportamentais semelhantes à mania<sup>80</sup>.

Serreti et al. analisaram o polimorfismo T3111C em 620 pacientes com depressão maior e transtorno bipolar<sup>78</sup>. Foi detectado um aumento da recorrência de insônia nos pacientes homocigotos 3111C. Este mesmo grupo de pesquisadores, em 2005<sup>79</sup>, analisaram a influência deste polimorfismo sobre a insônia de pacientes em fase de tratamento com antidepressivos. Foi verificado que a maioria dos pacientes que tinham insônia durante o tratamento era homocigoto 3111C. Entretanto, alguns estudos não encontram associação entre este polimorfismo (T3111C) e transtorno unipolar ou transtorno bipolar<sup>72</sup> e a depressão maior<sup>81</sup>.

Outro estudo recente demonstrou que haplótipos nos genes relógio *Bmal1* e *Per3* estão associados com o transtorno afetivo bipolar<sup>76</sup>. Partonen et al. fizeram análises “*in silico*” de três genes relógio (*Per2*, *Bmal1*, *Npas2*) e verificaram que variações nestes genes estão associadas com a depressão sazonal, sustentando a hipótese de que mecanismos moleculares circadianos contribuem para o desenvolvimento deste transtorno<sup>77</sup>.

Artioli et al. analisaram três variantes no gene *Per3* em pacientes com depressão maior e transtorno bipolar e mostraram uma significativa associação destes polimorfismos com a idade de início, a resposta ao tratamento, as respostas circadianas ao humor e ao temperamento<sup>71</sup>.

Mansour et al. analisaram 46 polimorfismos em oito genes relógio: *Bmal1*, *Clock*, *Per1*, *Per2*, *Per3*, *Cry1*, *Cry2* e *Tim* em pacientes com transtorno bipolar e pacientes com esquizofrenia e verificaram que existem associações de polimorfismos nos genes *Tim* e *Per3* com a esquizofrenia, além de uma modesta associação dos genes *Bmal1* e *Tim* com o transtorno bipolar<sup>75</sup>.

### Conclusões

Existe uma grande variedade de estudos de associações de polimorfismos nos genes relógio com transtornos do ritmo circadiano e transtornos do humor. Estes estudos estão aumentando consideravelmente na literatura especializada nos últimos anos, devido à importância dos resultados no sentido de melhorar o entendimento da gênese e do desenvolvimento destes transtornos, bem como seus tratamentos. A possibilidade de verificar a expressão destes genes em células periféricas, como, por exemplo, no sangue de pacientes<sup>82</sup>, abre um caminho para o diagnóstico.

A descoberta de variações genéticas regulando os fenótipos circadianos, incluindo alguns transtornos do humor, pode levar a um importante impacto terapêutico na medicina preventiva. Estes estudos podem ajudar no entendimento e tratamento dos transtornos do sono, do ritmo circadiano e de humor, bem como na prevenção de riscos para saúde causados por viagens transcontinentais e trabalhos por turno e noturno.

Com a finalização do Projeto Genoma (mapeamento e seqüenciamento do genoma humano), o conhecimento sobre os fatores genéticos associados às doenças humanas mais prevalentes está crescendo rapidamente. Embora a aplicação generalizada na clínica médica não ter chegado ao alcance destas conquistas, a revolução genômica indica uma mudança de paradigma em direção a uma medicina personalizada, que inclui a farmacogenômica. A área de cronobiologia aplicada à medicina tem potencial de ser umas das primeiras a se beneficiar destes avanços.

### Fontes de financiamento

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) – CEPID N° 98/143003-3 e Associação Fundo de Incentivo à Psicofarmacologia (AFIP).

### Financiamento e conflito de interesses

Membro do grupo de autores	Local de trabalho	Verba de pesquisa <sup>1</sup>	Outro apoio à pesquisa ou educação médica continuada <sup>2</sup>	Honorários de palestrante	Participação acionária	Consultor/ Conselho consultivo	Outro <sup>3</sup>
Danyella Silva Pereira	UNIFESP	---	---	---	---	---	---
Sergio Tufik	UNIFESP	---	---	---	---	---	---
Mario Pedrazzoli	UNIFESP	---	---	---	---	---	---

\* Modesto

\*\* Significativa

\*\*\* Significativa. Montantes fornecidos à instituição do autor ou a colega para pesquisa onde o autor tem participação, não diretamente ao autor.

Nota: UNIFESP = Universidade Federal de São Paulo.

Mais informações, consultar as Instruções aos autores.



## Referências

1. Moore RY, Eicher VB. Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Res.* 1972;42(1):201-6.
2. Stephan FK, Zucker I. Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1972;69(6):1583-6.
3. Weaver DR. The suprachiasmatic nucleus: a 25-year retrospective. *Biol Rhythms.* 1998;13(2):100-12.
4. Wittmann M, Dinich J, Mellow M, Roenneberg T. Social jetlag: misalignment of biological and social time. *Chronobiol Int.* 2006;23(1-2):497-509.
5. Katzenberg D, Young T, Finn L, Lin L, King DP, Takahashi JS, Mignot E. A CLOCK polymorphism associated with human diurnal preference. *Sleep.* 1998;21(6):569-76.
6. Pedrazzoli M, Pereira DS. 24h Timing molecules: implications for circadian rhythms phenotypes in humans. *Hypnos.* 2004;1(1):130-41.
7. Pedrazzoli M, Louzada FM, Pereira DS, Benedito-Silva AA, Lopez AR, Martynhak BJ, Korczak AL, Koike Bdel V, Barbosa AA, D'Almeida V, Tufik S. Clock polymorphisms and circadian rhythms phenotypes in a sample of the Brazilian population. *Chronobiol Int.* 2007;24(1):1-8.
8. Pereira DS, Tufik S, Louzada FM, Benedito-Silva AA, Lopez AR, Lemos NA, Korczak AL, D'Almeida V, Pedrazzoli M. Association of the length polymorphism in the human Per3 gene with the delayed sleep-phase syndrome: does latitude have an influence upon it? *Sleep.* 2005;28(1):29-32.
9. Konopka RJ, Benzer S. Clock Mutants of *Drosophila* Dielano-gaster. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1971;68(9):2112-6.
10. Lowrey PL, Shimomura K, Antoch MP, Yamazaki S, Zemenides PD, Ralph MR, Menaker M, Takahashi JS. Positional syntetic cloning and functional characterization of the mammalian circadian mutation tau. *Science.* 2000;288(5465):483-91.
11. Ralph MR, Menaker M. A mutation of the circadian system in golden hamsters. *Science.* 1988;241(4870):1225-7.
12. Shearman LP, Zylka MJ, Reppert SM, Weaver DR. Expression of basic helix-loop-helix/PAS genes in the mouse suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience.* 1999;89(2):387-97.
13. Vitaterna MH, King DP, Chang AM, Kornhauser JM, Lowrey PL, McDonald JD, Dove WF, Pinto LH, Turek FW, Takahashi JS. Mutagenesis and mapping of a mouse gene, Clock, essential for circadian behavior. *Science.* 1994;264(5159):719-25.
14. Gekakis N, Staknis D, Nguyen HB, Davis FC, Wilsbacher LD, King DP, Takahashi JS, Weitz CJ. Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism. *Science.* 1998;280(5369):1564-9.
15. Bunger MK, Wilsbacher LD, Moran SM, Clendenin C, Radcliffe LA, Hogenesch JB, Simon MC, Takahashi JS, Bradfield CA. Mop3 is an essential component of the master circadian pacemaker in mammals. *Cell.* 2000;103(7):1009-17.
16. Maler T, Ralph MR, Gorczynski RM, Moldofsky H, O'Dowd BF, Du DC. The *Drosophila* per gene homologs are expressed in mammalian suprachiasmatic nucleus and heart as well as in molluscan eyes. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992;184(2):1082-7.
17. Tei H, Okamura H, Shigeyoshi Y, Fukuhara C, Ozawa R, Hirose M, Sakaki Y. Circadian oscillation of a mammalian homologue of the *Drosophila* period gene. *Nature.* 1997;389(6650):512-6.
18. Takumi T, Matsubara C, Shigeyoshi Y, Taguchi K, Yagita K, Maebayashi Y, Sakakida Y, Okumura K, Takashima N, Okamura H. A new mammalian period gene predominantly expressed in the suprachiasmatic nucleus. *Genes Cells.* 1998;3(3):167-76.
19. Takumi T, Taguchi K, Miyake S, Sakakida Y, Takashima N, Matsubara C, Maebayashi Y, Okumura K, Takekida S, Yamamoto S, Yagita K, Yan L, Young MW, Okamura H. A light-independent oscillatory gene mPer3 in mouse SCN and OVL. *EMBO J.* 1998;17(16):4753-9.
20. Zylka MJ, Shearman LP, Weaver DR, Reppert SM. Three period homologs in mammals: differential light responses in the suprachiasmatic circadian clock and oscillating transcripts outside of brain. *Neuron.* 1998;20(6):1103-10.
21. Dunlap JC, Loros JJ, Liu Y, Crosthwaite SK. Eukaryotic circadian systems: cycles in common. *Genes Cells.* 1999;4(1):1-10.
22. Vitaterna MH, Takahashi JS, Turek FW. Overview of circadian rhythms. *Alcohol Res Health.* 2001;25(2):85-93.
23. Shearman LP, Jin X, Lee C, Reppert SM, Weaver DR. Targeted disruption of the mPer3 gene: subtle effects on circadian clock function. *Mol Cell Biol.* 2000;20(17):6269-75.
24. Hsu DS, Zhao X, Zhao S, Kazantsev A, Wang RP, Todo T, Wei YF, Sancar A. Putative human blue-light photoreceptors hCRY1 and hCRY2 are flavoproteins. *Biochemistry.* 1996;35(44):13871-7.
25. Todo T, Ryo H, Yamamoto K, Toh H, Inui T, Ayaki H, Nomura T, Ikenaga M. Similarity among the *Drosophila* (6-4) photolyase, a human photolyase homolog, and the DNA photolyase-blue-light photoreceptor family. *Science.* 1996;272(5258):109-12.
26. van der Spek PJ, Kobayashi K, Bootsma D, Takao M, Eker AP, Yasui A. Cloning, tissue expression, and mapping of a human photolyase homolog with similarity to plant blue-light receptors. *Genomics.* 1996;37(2):177-82.
27. Stanewsky R, Kaneko M, Emery P, Beretta B, Wager-Smith K, Kay SA, Rosbash M, Hall JC. The cryb mutation identifies cryptochrome as a circadian photoreceptor in *Drosophila*. *Cell.* 1998;95(5):681-92.
28. Griffin Jr. EA, Staknis D, Weitz CJ. Light-independent role of CRY1 and CRY2 in the mammalian circadian clock. *Science.* 1999;286(5440):768-71.
29. van der Horst GTJ, Muijtjens M, Kobayashi K, Takano R, Kanno S, Takao M, Wit J, Verkerk A, Eker AP, Leenen D, Buijs R, Bootsma D, Hoeijmakers JH, Yasui AA. Mammalian Cry1 and Cry2 are essential for maintenance of circadian rhythms. *Nature.* 1999;398(6728):627-30.
30. Sehgal A, Price JL, Man B, Young MW. Loss of circadian behavioral rhythms and per RNA oscillations in the *Drosophila* mutant timeless. *Science.* 1994;263(5153):1603-6.
31. Koike N, Hida A, Numano R, Hirose M, Sakaki Y, Tei H. Identification of the mammalian homologues of the *Drosophila* timeless gene, Timeless1. *FEBS Lett.* 1998;441(3):427-31.
32. Sangoram AM, Saez L, Antoch MP, Gekakis N, Staknis D, Whiteley A, Fruech. Mammalian circadian autoregulatory loop: a timeless ortholog and mPer1 interact and negatively regulate CLOCK-BMAL1-induced transcription. *Neuron.* 1998;21(5):1101-13.
33. Zylka MJ, Shearman LP, Levine JD, Jin X, Weaver DR, Reppert SM. Molecular analysis of mammalian timeless. *Neuron.* 1998;21(5):1115-22.
34. Takumi T, Nagamine Y, Miyake S, Matsubara C, Taguchi K, Takekida S, Sakakida Y, Nishikawa K, Kishimoto T, Niwa S, Okumura K, Okamura H. A mammalian ortholog of *Drosophila* timeless, highly expressed in SCN and retina, forms a complex with mPer1. *Genes Cells.* 1999;4(1):67-75.
35. Gotter AL, Manganaro T, Weaver DR, Kolakowski Jr. LF, Possidente B, Sriram S, MacLaughlin DT, Reppert SM. A time-less function for mouse timeless. *Nat Neurosci.* 2000;3(8):755-6.
36. Barnes JW, Tischkau SA, Barnes JA, Mitchell JW, Burgoon PW, Hickok JR, Gillette MU. Requirement of mammalian Timeless for circadian rhythmicity. *Science.* 2003;302(5644):439-42.
37. Lindebro MC, Poellinger L, Whitelaw ML. Protein-protein interaction via PAS domains: role of the PAS domain in positive and negative regulation of the bHLH/PAS dioxin receptor-Arnt transcription factor complex. *EMBO J.* 1995;14(14):3528-39.
38. Shearman LP, Sriram S, Weaver DR, Maywood ES, Chaves I, Zheng B, Kume K, Lee CC, van der Horst GT, Hastings MH, Reppert SM. Interacting molecular loops in the mammalian circadian clock. *Science.* 2000;288(5468):1013-9.
39. Preitner N, Damiola F, Lopez-Molina L, Zakany J, Duboule D, Albrecht U, Schibler U. The orphan nuclear receptor REV-ERBalpha controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. *Cell.* 2002;110(2):251-60.
40. Sato TK, Panda S, Miraglia LJ, Reyes TM, Rudic RD, McNamara P, Naik KA, FitzGerald GA, Kay SA, Hogenesch JB. A functional genomics strategy reveals Rora as a component of the mammalian circadian clock. *Neuron.* 2004;43(4):527-37.
41. Honma S, Kawamoto T, Takagi Y, Fujimoto K, Sato F, Noshiro M, Kato Y, Honma K. Dec1 and Dec2 are regulators of the mammalian molecular clock. *Nature.* 2002;419(6909):841-4.
42. Gallego M, Virshup DM. Post-translational modifications regulate the ticking of the circadian clock. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8(2):139-48.
43. American Sleep Disorders Association - ASDA. *The International Classification of Sleep Disorders*. Revised. Rochester: American Sleep Disorder Association; 1997. p. 128-40.



44. Ebisawa T, Uchiyama M, Kajimura N, Mishima K, Kamei Y, Katoh M, Watanabe T, Sekimoto M, Shibui K, Kim K, Kudo Y, Ozeki Y, Sugishita M, Toyoshima R, Inoue Y, Yamada N, Nagase T, Ozaki N, Ohara O, Ishida N, Okawa M, Takahashi K, Yamauchi T. Association of structural polymorphisms in the human period3 gene with delayed sleep phase syndrome. *EMBO Rep.* 2001;2(4):342-6.
45. Wakatsuki Y, Kudo T, Shibata S. Constant light housing during nursing causes human DSPS (delayed sleep phase syndrome) behaviour in Clock-mutant mice. *Eur J Neurosci.* 2007;25(8):2413-24.
46. Robilliard DL, Archer SN, Arendt J, Lockley SW, Hack LM, English J, Leger D, Smits MG, Williams A, Skene DJ, Von Schantz M. The 3111 Clock gene polymorphism is not associated with sleep and circadian rhythmicity in phenotypically characterized human subjects. *J Sleep Res.* 2002;11(4):305-12.
47. Archer SN, Robilliard DL, Skene DJ, Smits M, Williams A, Arendt J, von Schantz M. A length polymorphism in the circadian clock gene Per3 is linked to delayed sleep phase syndrome and extreme diurnal preference. *Sleep.* 2003;26(4):413-5.
48. Carpen JD, von Schantz M, Smits M, Skene DJ, Archer SN. A silent polymorphism in the PER1 gene associates with extreme diurnal preference in humans. *J Hum Genet.* 2006;51(12):1122-5.
49. Carpen JD, Archer SN, Skene DJ, Smits M, von Schantz M. A single-nucleotide polymorphism in the 5'-untranslated region of the hPER2 gene is associated with diurnal preference. *J Sleep Res.* 2005;14(3):293-7.
50. Gottesmann C. Is the delayed sleep phase syndrome a physical or psychological disease? A case report of disappearance following a change of latitude. *Psychiatry Clin Neurosci.* 2000;54(5):543-6.
51. Benedito-Silva AA, Pires ML, Calil HM. Seasonal variation of suicide in Brazil. *Chronobiol Int.* 2007;24(4):727-37.
52. Viola AU, Archer SN, James LM, Groeger JA, Lo JC, Skene DJ, von Schantz M, Dijk DJ. PER3 polymorphism predicts sleep structure and waking performance. *Curr Biol.* 2007;17(7):613-8.
53. Ancoli-Israel S, Schnierow B, Kelsoe J, Fink R. A pedigree of one family with delayed sleep phase syndrome. *Chronobiol Int.* 2001;18(5):831-40.
54. Reid KJ, Chang AM, Dubocovich ML, Turek FW, Takahashi JS, Zee PC. Familial advanced sleep phase syndrome. *Arch Neurol.* 2001;58(7):1089-94.
55. Toh KL, Jones CR, He Y, Eide EJ, Hinz WA, Virshup DM, Ptáček LJ, Fu YH. An hPer2 Phosphorylation site mutation in familial advanced sleep phase syndrome. *Science.* 2001;291(5506):1040-3.
56. Xu Y, Toh KL, Jones CR, Shin JY, Fu YH, Ptáček LJ. Modeling of a human circadian mutation yields insights into clock regulation by PER2. *Cell.* 2007;128(1):59-70.
57. Beck-Friis J, Ljunggren JG, Thorén M, von Rosen D, Kjellman BF, Wetterberg L. Melatonin, cortisol and ACTH in patients with major depressive disorder and healthy humans with special reference to the outcome of the dexamethasone suppression test. *Psychoneuroendocrinology.* 1985;10(2):173-86.
58. Lee MA, Taylor MA. Cortisol suppression and circadian rhythm in endogenous depression: a preliminary report. *Biol Psychiatry.* 1983;18(10):1127-32.
59. Turek FW. From circadian rhythms to clock genes in depression. *Int Clin Psychopharmacol.* 2007;Suppl 2:S1-8.
60. Wichers MC, Myin-Germeys I, Jacobs N, Kenis G, Derom C, Vlietinck R, Delespaul P, Mengelers R, Peeters F, Nicolson N, Van Os J. Susceptibility to depression expressed as alterations in cortisol day curve: a cross-twin, cross-trait study. *Psychosom Med.* 2008;70(3):314-8.
61. Lam RW, Levitt AJ, Levitan RD, Enns MW, Morehouse R, Michalak EE, Tam EM. The Can-SAD study: a randomized controlled trial of the effectiveness of light therapy and fluoxetine in patients with winter seasonal affective disorder. *Am J Psychiatry.* 2006;163(5):805-12.
62. Perlis RH. Treatment of bipolar disorder: the evolving role of atypical antipsychotics. *Am J Manag Care.* 2007;13(7 Suppl):S178-88. Erratum in: *Am J Manag Care.* 2008;14(2):76.
63. Soares-Weiser K, Bravo Vergel Y, Beynon S, Dunn G, Barbieri M, Duffy S, Geddes J, Gilbody S, Palmer S, Woolacott N. A systematic review and economic model of the clinical effectiveness and cost-effectiveness of interventions for preventing relapse in people with bipolar disorder. *Health Technol Assess.* 2007;11(39):iii-iv, ix-206.
64. Storum JG, Wohlfarth T, Schene A, Elferink A, van Zwieten BJ, van den Brink W. Magnitude of effect of lithium in short-term efficacy studies of moderate to severe manic episode. *Bipolar Disord.* 2007;9(8):793-8.
65. Yin L, Wang J, Klein PS, Lazar MA. Nuclear receptor Rev-erbalpha is a critical lithium-sensitive component of the circadian clock. *Science.* 2006;311(5763):1002-5.
66. Collins B, Blau J. Keeping time without a clock. *Neuron.* 2006;50(3):348-50.
67. Kondratov RV, Kondratova AA, Gorbacheva VY, Vykhovanets OV, Antoch MP. Early aging and age-related pathologies in mice deficient in BMAL1, the core component of the circadian clock. *Genes Dev.* 2006;20(14):1868-73.
68. Althoff RR, Faraone SV, Rettew DC, Morley CP, Hudziak JJ. Family, twin, adoption, and molecular genetic studies of juvenile bipolar disorder. *Bipolar Disord.* 2005;7(6):598-609.
69. McGuffin P, Rijdsdijk F, Andrew M, Sham P, Katz R, Cardno A. The heritability of bipolar affective disorder and the genetic relationship to unipolar depression. *Arch Gen Psychiatry.* 2003;60(5):497-502.
70. Smoller JW, Finn CT. Family, twin, and adoption studies of bipolar disorder. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2003;123(1):48-58.
71. Artioli P, Lorenzi C, Pirovano A, Serretti A, Benedetti F, Catalano M, Smeraldi E. How do genes exert their role? Period 3 gene variants and possible influences on mood disorder phenotypes. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2007;17(9):587-94.
72. Baier U, Wiesegger G, Leisch F, Fuchs K, Leitner I, Letmaier M, Konstantinidis A, Stastny J, Sieghart W, Hornik K, Mitterauer B, Kasper S, Aschauer HN. No association of clock gene T3111C polymorphism and affective disorders. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2005;15(1):51-5.
73. Benedetti F, Serretti A, Colombo C, Barbini B, Lorenzi C, Campori E, Smeraldi E. Influence of CLOCK gene polymorphism on circadian mood fluctuation and illness recurrence in bipolar depression. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2003;123(1):23-6.
74. Benedetti F, Dallaspezia S, Fulgosi MC, Lorenzi C, Serretti A, Barbini B, Colombo C, Smeraldi E. Actimetric evidence that CLOCK 3111 T/C SNP influences sleep and activity patterns in patients affected by bipolar depression. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2007;144(5):631-5.
75. Mansour HA, Wood J, Logue T, Chowdari KV, Dayal M, Kupfer DJ, Monk TH, Devlin B, Nimgaonkar VL. Association study of eight circadian genes with bipolar I disorder, schizoaffective disorder and schizophrenia. *Genes Brain Behav.* 2006;5(2):150-7.
76. Nievergelt CM, Kripke DF, Barrett TB, Burg E, Remick RA, Sadovnick AD, McElroy SL, Keck PE Jr, Schork NJ, Kelsoe JR. Suggestive evidence for association of the circadian genes PERIOD3 and ARNTL with bipolar disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2006;141(3):234-41.
77. Partonen T, Treutlein J, Alpmann A, Frank J, Johansson C, Depner M, Aron L, Rietschel M, Wellek S, Soronen P, Paunio T, Koch A, Chen P, Lathrop M, Adolfsson R, Persson ML, Kasper S, Schalling M, Pelttonen L, Schumann G. Three circadian clock genes Per2, Arntl, and Npas2 contribute to winter depression. *Ann Med.* 2007;39(3):229-38.
78. Serretti A, Benedetti F, Mandelli L, Lorenzi C, Pirovano A, Colombo C, Smeraldi E. Genetic dissection of psychopathological symptoms: insomnia in mood disorders and CLOCK gene polymorphism. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2003;121(1):35-8.
79. Serretti A, Cusin C, Benedetti F, Mandelli L, Pirovano A, Zanardi R, Colombo C, Smeraldi E. Insomnia improvement during antidepressant treatment and CLOCK gene polymorphism. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2005;137(1):36-9.
80. Roybal K, Theobald D, Graham A, DiNieri JA, Russo SJ, Krishnan V, Chakravarty S, Peevey J, Oehrlein N, Birnbaum S, Vitaterna MH, Orsulak P, Takahashi JS, Nestler EJ, Carlezon WA Jr, McClung CA. Mania-like behavior induced by disruption of CLOCK. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(15):6406-11.
81. Desan PH, Oren DA, Malison R, Price LH, Rosenbaum J, Smoller J, Charney DS, Gelernter J. Genetic polymorphism at the CLOCK gene locus and major depression. *Am J Med Genet.* 2000;96(3):418-21.
82. Yang S, Van Dongen HP, Wang K, Berrettini W, Bućan M. Assessment of circadian function in fibroblasts of patients with bipolar disorder. *Mol Psychiatry.* 2008;14(2):143-55.