

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Psiquiatria e Ciências do Comportamento

**Dos genes aos sintomas: um estudo sobre a relação entre
polimorfismos envolvidos na regulação dos ritmos
biológicos e desfechos em saúde mental.**

Felipe Gutiérrez Carvalho

Porto Alegre, 2020

Felipe Gutiérrez Carvalho

**Dos genes aos sintomas: um estudo sobre a relação entre
polimorfismos envolvidos na regulação dos ritmos
biológicos e desfechos em saúde mental.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Psiquiatria e Ciências do Comportamento da
Universidade Federal do Rio Grande do Sul como
requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em
Psiquiatria e Ciências do Comportamento.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Paz Loayza Hidalgo

Co-orientador: Prof. Dr. Benício Noronha Frey

Porto Alegre, 2020

CIP - Catalogação na Publicação

Carvalho, Felipe Gutiérrez
Dos genes aos sintomas: um estudo sobre a relação
entre polimorfismos envolvidos na regulação dos ritmos
biológicos e desfechos em saúde mental. / Felipe
Gutiérrez Carvalho. -- 2020.
172 f.
Orientadora: Maria Paz Loayza Hidalgo.

Coorientador: Benicio Noronha Frey.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de
Pós-Graduação em Psiquiatria e Ciências do
Comportamento, Porto Alegre, BR-RS, 2020.

1. Cronobiologia. 2. Sono. 3. Genes do relógio. 4.
Bem Estar. 5. Transtornos de humor. I. Hidalgo, Maria
Paz Loayza, orient. II. Frey, Benicio Noronha,
coorient. III. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO DA BANCA EXAMINADORA

FELIPE GUTIÉRREZ CARVALHO

DOS GENES AOS SINTOMAS: UM ESTUDO SOBRE A RELAÇÃO ENTRE
POLIMORFISMOS ENVOLVIDOS NA REGULAÇÃO DOS RITMOS BIOLÓGICOS E
DESFECHOS EM SAÚDE MENTAL.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Psiquiatria e Ciências do Comportamento da
Universidade Federal do Rio Grande do Sul como
requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em
Psiquiatria e Ciências do Comportamento.

Porto Alegre, 9 de março de 2020.

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a tese de doutorado “Dos genes aos sintomas: um estudo sobre a relação entre polimorfismos envolvidos na regulação dos ritmos biológicos e desfechos em saúde mental”, elaborada por Felipe Gutiérrez Carvalho, como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutor em Psiquiatria e Ciências do Comportamento.

Professora Doutora Neusa Sica da Rocha

Doutora Luísa Klaus Pilz

Professor Doutor Flávio Milman Shansis

Professora Doutora Ana Beatriz Cauduro Harb

*Aos “core-clock genes” – meus pais, Maria Ester e Paulo Roberto,
e minha irmã, Clarissa, junto da transcrição e tradução do dímero Maria Sofia e Vicente.*

E aos “core-clock related genes” – todas as minhas famílias do sangue e da vida.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Paulo Roberto e Maria Ester, à minha irmã, Clarissa, e aos recém-chegados Maria Sofia e Vicente (em ordem alfabética), pela parceria sempre presente e pela segurança que me trazem.

Aos orientadores Prof.^a Maria Paz L. Hidalgo e Prof. Benício N. Frey pela longa caminhada com tantos aprendizados e oportunidades.

Aos coautores e colaboradores, pela disponibilidade no auxílio e na elaboração dos assuntos abordados nesse projeto. Menção especial às alunas de iniciação científica Ana Maria Delgado Cunha, Juliana Jury Freitas e Lívia Lopez Torres, que me ajudaram nas diferentes etapas do trabalho; e à co-orientadora do mestrado, Camila Morelato de Souza, uma das idealizadoras das análises moleculares concretizadas nestes estudos.

Aos colegas do Laboratório de Cronobiologia e Sono do HCPA/UFRGS e do *Mood Disorders Program St. Joseph's Healthcare/McMaster University*, pelas ricas contribuições e por dividir as angústias cronobiomoleculofetivas da pós-graduação.

Aos grandes amigos e amigas e aos demais membros da família, que trouxeram tantos momentos de inspiração e alegrias ao longo dessa jornada – menção especial ao querido amigo Frank (*in memoriam*), eterno Mariante.

Not quite my tempo.

Terence Fletcher (J. K. Simmons)

RESUMO

A regulação dos ritmos biológicos envolve uma complexa rede de sinalizações que ocorre desde níveis moleculares até níveis comportamentais. A dessincronização entre ritmos individuais e ritmos ambientais e sociais está associada a manifestações patológicas. Os genes do relógio, um grupo de genes altamente especializado na regulação do sistema circadiano, são a parte primordial da regulação molecular dos ritmos biológicos. Além destes, uma variedade de outros genes participa na modulação desse processo. Entre os dados encontrados na literatura, há resultados promissores relacionando polimorfismos dos genes *AANAT*, *RORA*, e *TIMELESS* a alterações nos ritmos circadianos e a sintomas de humor. Já em níveis comportamentais, há evidências fortemente sugestivas de associação entre dessincronização de ritmos circadianos e infradianos, manifestada por alterações de sono e variações diárias e sazonais de sintomas de humor, e risco de desenvolvimento de alterações cardiometabólicas e psiquiátricas. Portanto, o objetivo do presente trabalho é avaliar os processos de regulação dos ritmos biológicos individuais, e sua relação com desfechos em saúde, levando em consideração os diferentes níveis que compõe o sistema circadiano: desde polimorfismos relacionados aos genes do relógio, até variações circadianas e sazonais de manifestações cognitivas, somáticas, e afetivas de humor. Para concretizar os objetivos mencionados neste projeto, foram avaliados dados de duas amostras distintas: para os estudos envolvendo dados de polimorfismos genéticos, foi analisada uma amostra de 987 indivíduos provenientes do Vale do Taquari-RS, Brasil; já para o estudo aprofundando dados de variações comportamentais, foi analisada uma amostra de 355 indivíduos de Hamilton-ON, Canadá. Foram utilizados instrumentos validados para a avaliação dos dados de qualidade e ritmos de sono, níveis de bem-estar psicológico, e risco de distúrbios psiquiátricos. Além disso, questionários estruturados foram preenchidos para coletar dados sociodemográficos, características de trabalho, e sintomas autodeclarados. Os resultados da presente tese demonstram achados significativos em níveis comportamentais: associação entre pior qualidade de sono e sintomas psiquiátricos/cardiometabólicos autorreferidos, sem efeito de mediação por horários de sono; e maior frequência de percepção do pico diário e sazonal de manifestações de humor em uma amostra com maior probabilidade de distúrbios psiquiátricos. Houve também achados significativos em relação às análises moleculares: associação do genótipo rs782931 *RORA* GA/AA com escores de pior qualidade de sono independentes de componentes de horários de sono. As conclusões desse trabalho trazem novos insights em relação às rotas de interação dos diferentes níveis de regulação do sistema circadiano individual. Visando ampliar as análises desse estudo para populações clínicas, como perspectiva futura, um terceiro elemento metodológico deste trabalho é a elaboração de um projeto de pesquisa a ser realizado no ambulatório de Psiquiatria do Sono do HCPA, com o objetivo final de esclarecer as indicações do uso de actigrafia no contexto clínico ambulatorial.

Palavras-chave: Cronobiologia, Sono, Genes do relógio, Bem Estar, Transtornos de humor.

ABSTRACT

Biological rhythms regulation operates through interactions of complex networks which comprise components from molecular to behavioral levels. The desynchronization between one's individual rhythms and its environmental/social rhythms may trigger pathological processes. The clock genes are the fundamental features of the biological rhythms regulation, performing the first step in molecular activity of one's circadian system. There are several circadian system-related genes which take part in the modulation of the core clock genes activity. Previous results show relevant associations of polymorphisms of *AANAT*, *RORA*, and *TIMELESS* genes with circadian rhythms and affective symptoms alterations. At the behavioral level, the misalignment of circadian and infradian rhythms, observed through sleep disturbances and daily/seasonal variation of mood symptoms, has been associated with higher risk of cardiometabolic and psychiatric symptoms. The current project aims to evaluate the association between individual biological rhythms regulation processes and health outcomes, considering a multilevel circadian system approach: from clock genes-related polymorphisms to circadian and seasonal behaviors in cognitive, somatic, and affective areas. Two independent samples were collected to achieve this objective: the polymorphisms analysis included a sample of 987 participants from Vale do Taquari-RS region, in Brazil; the perceived circadian and seasonal variations in behavioral aspects analysis included 355 participants from Hamilton-ON, Canada. Validated instruments were used to evaluate sleep quality, circadian rhythms, psychological well-being, and psychiatric disorders probability. Also, structured questionnaires were used to collect demographics, work characteristics, and self-declared symptoms. The results of the present analyses demonstrate significant findings at the behavioral level: association between worse sleep quality and self-declared psychiatric/cardiometabolic symptoms with no mediation effect of sleep timing parameters, and higher frequency of perceived daily peaks and seasonal variation of affective behaviors in a sample with higher probability for psychiatric disorders. Results of the molecular analysis also showed significant findings: association between rs782931 *RORA* GA/AA genotype and worse sleep quality scores with no sleep timing components. In conclusion, these findings bring new insights regarding the interaction among specific circadian rhythms synchronization pathways, at different levels of regulation. In an attempt to extend the scope of this approach to a clinical outpatient setting, a third methodological component was designed as a future perspective: a research project investigating the benefits of actigraphic measures in a Sleep Psychiatry Outpatient Clinic.

Keywords: Chronobiology, Sleep, Clock Genes, Well-being, Affective disorders.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REVISÃO DA LITERATURA

Figura 1 – Publicação do experimento com a Mimosa Pudica, em 1729, demonstrando a persistência do ritmo de abertura e fechamento das folhas mesmo sem a presença de estímulos luminosos (figura adaptada, acesso em 26/01/2020, Green CPU Wordpress - <https://jonathansobell.wordpress.com>; Desenho creditado a Mattias Karlén) – pág. 24.

Figura 2 – Processo envolvido desde o recebimento do sinal fótico até a produção e secreção da melatonina. (Acessado e traduzido em 26/01/2020, <https://thebrain.mcgill.ca>) – pág. 26.

Figura 3 – Esquema simplificado dos ciclos principal e secundários do relógio circadiano molecular nos mamíferos. (Traduzido e reproduzido de Hastings, 2007) – pág. 28.

Figura 4 – Análise dos ritmos circadianos moleculares em culturas de células do NSQ e de tecidos periféricos. (Reproduzido de Hastings et al., 2007, modificado) – pág. 29.

Figura 5 – Horários em que são observados os picos séricos de hormônios essenciais na regulação da homeostase corporal. GH: Hormônio do crescimento; TSH: Hormônio estimulador da tireoide; T3: Triiodotironina. (Reproduzido de Gamble et al., 2014 – modificado) – pág. 31.

ARTIGO 1

Figure 1 – Models of the study analysis – pág. 52.

Figure 2 – Flowchart of the study protocol – pág. 53.

Figure 3 – Final statistical diagram – pág. 54.

Figure S1 - Bivariate analysis between good and poor sleep quality for each of the PSQI components in Cardiometabolic self-reported symptoms and Psychiatric self-reported symptoms – pág. 55.

Figure S2 - Sleep timing differences between urban and rural work environment groups (N= 829) – pág. 56.

ARTIGO 2

Figure 1 – Model of the study analysis – pág. 84.

Figure 2 – Flowchart of the study protocol – pág. 85.

Figure 3 – A. *AANAT* and *RORA* polymorphisms genotypes and WHO-5 mean scores (percentage); Alarm clock on working days and WHO-5 mean scores (percentage). B. *AANAT* and *RORA* polymorphisms genotypes and Midpoint of sleep on working days mean scores; Alarm clock on working days and midpoint of sleep on working days mean scores – pág. 86.

Supplementary File 1 – GZLM parameters and analysis of model residuals – pág 87.

ARTIGO 3

Figure 1 – Hypothesis and Models of the study analysis – pág. 108.

Figure 2 – Probability scale for DP and SV in significant MRhI Items for the three latent classes solution – pág. 109.

Figure 3 – Bivariate analysis between the DPSV groups and SRQ-20 scores – pág. 110.

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

Table 1 – Descriptive demographic data (N= 829) – pág. 57.

Table 2 – Comparison between individuals with and without psychiatric or cardiometabolic self-reported symptoms – pág. 58.

Table 3 – Conditional direct and indirect effects of sleep quality on Psychiatric and Cardiometabolic self-reported symptoms according to Urban vs Rural work environment – pág. 59.

Table 4 – Association between Sleep parameters (PSQI score[†] and sleep timing) and *AANAT* and *RORA* polymorphisms: results of four separate multivariate analyses – pág. 60.

Table S1 - Occupational characteristics among Total sample, Psychiatric, and Cardiometabolic self-reported symptoms samples – pág. 61.

Table S2 - Descriptives of the genetic analysis subsample (N=552) – pág. 62.

Table S3 - Cardiometabolic and Psychiatric self-reported symptoms characteristics (N=829) – pág. 63.

Table S4 - Association analysis between gene polymorphisms and sleep parameters (N=552) – pág. 64.

Table S5 – Allele frequency of the minor variant nucleotide of the genes in our sample, in European (non Finnish) population (N=33,370), and in total population (N=60,706) (Lek et al., 2016) – pág. 65.

Table S6 - Association between *AANAT*, *RORA* and *TIMELESS* polymorphisms and PSQI Components[†] (N=552) – pág. 66.

ARTIGO 2

Table 1 – Sample characteristics (N=560) – pág. 88.

Table 2 – Demographic, genetic and clinical characteristics of the sample (N = 560) – pág. 89.

Table 3 – Circadian gene polymorphisms and psychological well-being: mean±SE of WHO-5 score adjusted for age, sex, alarm clock use and midsleep time on working days, obtained in the *AANAT* and *RORA* genotypes (N=560) – pág. 90.

Table S1 – Grandparents ancestry among the sample (N= 2245*) – pág. 91.

Table S2 – Genotype distribution in a Brazilian sample of 560* mostly euro descendant rural workers (Carvalho et al., 2019) – pág. 92.

Table S3 – Allele frequency of the minor variant nucleotides of the genes comparatively in a mostly euro descendant Brazilian sample (N=560 ‡) (Carvalho et al., 2019)*, in European (non Finnish) population (N=33,370), and in total population (N=60,706) (Lek et al., 2016) – pág. 93.

ARTIGO 3

Table 1 – Descriptive data of the sample (N= 355) – pág. 111.

Table 2 – Logistic regression between high risk of psychiatric condition (SRQ-20 score > 7 points) and the latent classes – pág. 112.

Table 3 – Results of the bivariate analysis between DP and SV items separately in low and high risk of psychiatric condition groups – pág. 113.

Table 4 – Multivariate analysis between MRhI DPSV component scores and Risk of psychiatric condition adjusted by Sex, Age and Chronotype – pág. 114.

Table S1 – LCA model fit evaluation information – pág. 115.

Table S2 – Pairwise comparison between groups according to DP and SV status in relation to SRQ-20 scores – pág. 116.

Table S3 – Comparison between overall proportion and the three class solution probability scale for DP and SV in MRhI Items – pág. 117.

Table S4 – Multivariate analysis between MRhI items and Risk of psychiatric condition separately by affective, cognitive, and somatic components – pág. 118.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

(REVISÃO DA LITERATURA E ITENS RELEVANTES DOS ARTIGOS)

AANAT – N-Acetil-Transferase;

ASMT ou HIOMT – Hidroxindol-metil-transferase;

BCa – Do inglês, *bias-corrected and accelerated bootstrap technique*;

BMAL1 – Do inglês, *Brain and Muscle Arnt-like protein 1*;

BMI – Índice de massa corporal (*Body mass index*);

CHGA – Cromogranina A;

CLOCK – Do inglês, *Circadian Locomotor Output Cycles Kaput*;

CRY – Do inglês, *Cryptochromes*;

D-Box (DBP) – Do inglês, *D site of albumin promoter (albumin D-box) binding protein*;

DIO2 – Iodotironina deiodinase 2;

DP – Pico diário;

DPSV – Escore de pico diário e variação sazonal;

E-Box – Do inglês, *Enhancer-box*;

E4BP4 (NFIL3) – Do inglês, *Nuclear factor interleukin 3 regulated*;

EYA3 – Do inglês, *Eyes absent homolog 3*;

FSH – Hormônio folículo-estimulante;

GCS – Gânglio cervical superior;

GnRH – Hormônio liberador de gonadotrofinas;

GZLM – Do inglês, *Generalized linear model*;

IL-6 - Interleucina 6;

LCA – Do inglês, *Latent Class Analysis*;

LH – Hormônio luteinizante;

MCTQ – Questionário de Cronotipos de Munique (*Munich ChronoType Questionnaire*);

MD ou MDD – Depressão maior;

MEQ – Questionário de Matutividade-Vespertinidade (*Morningness-Eveningness Questionnaire*);

MRhI – Instrumento de Ritmo de Humor (*Mood Rhythm Instrument*);

MT1 (MNTR1A ou MNTR1B) – Do inglês, *Melatonin Receptor 1A / Melatonin Receptor 1B*;

NPAS2 – Do inglês, *Neuronal PAS domain protein 2*;

NPV – Núcleo paraventricular;

NSQ – Núcleo supraquiasmático;

OMS – Organização Mundial de Saúde;

PCR – Do inglês, *Polymerase Chain Reaction*;

PER – Do inglês, *Period*;

PD – Pars Distalis;

PSQI – Índice de Qualidade de Sono Pittsburgh;

PT – Pars Tuberalis;

REV-ERB alfa e beta – Referentes aos genes NR1D1 e NR2D2, do inglês, *nuclear receptor subfamily 1 group D member 1/ subfamily 2 group D member 2*;

rMEQ – Questionário de Matutividade-Vespertividade reduzido (*reduced Morningness-Eveningness Questionnaire*);

ROR – Do inglês, *Retinoic Acid Receptor-Related Orphan Receptor*;

RORE – Do inglês, *ROR response elements*;

SAD – Transtorno afetivo sazonal;

SAOS - Síndrome da apneia obstrutiva do sono;

SNC – Sistema nervoso central;

SNP – Do inglês, *single nucleotide polymorphism*;

SPAQ – Questionário de Avaliação de Padrões Sazonais;

SRQ-20 – Do inglês, *Self-Reporting Questionnaire 20*;

SV – Variação sazonal;

T3 – Triiodotironina;

THB ou BD – Transtorno de humor bipolar;

THs – Hormônios tireoidianos;

TIM – Do inglês, *Timeless*;

TSH e TSHb – Hormônio estimulador da tireoide e subunidade beta do TSH;

TTFL – Do inglês, *Transcription-translation feedback loop*;

VEGF – Fator de crescimento endotelial vascular;

WHO-5 – Do inglês, *World Health Organization 5-Item Well-Being Index*.

APRESENTAÇÃO

O presente trabalho consiste na tese de doutorado intitulada "Dos genes aos sintomas: um estudo sobre a relação entre polimorfismos envolvidos na regulação dos ritmos biológicos e desfechos em saúde mental". O projeto foi apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Psiquiatria e Ciências do Comportamento, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio grande do Sul em 9 de março de 2020.

O trabalho é apresentado em quatro partes, na seguinte ordem:

1. Introdução, Revisão da literatura, Justificativa, e Objetivos;
2. Resultados das análises preponderantemente moleculares (Artigos 1 e 2);
3. Resultados das análises preponderantemente comportamentais (Artigo 3);
4. Discussão, Considerações Finais e Perspectivas Futuras.

Ao final da tese, encontram-se anexados documentos complementares relevantes.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	20
1.1.	Justificativa	23
2.	REVISÃO DA LITERATURA	24
2.1.	A Regulação dos Ritmos Biológicos	24
2.2.	O relógio molecular	27
2.3.	As variações fisiológicas e comportamentais	30
2.3.1.	Parâmetros de sono e vigília	32
2.3.1.1.	Qualidade de sono	32
2.3.1.2.	Ciclo sono e vigília – horários e cronotipos	33
2.4.	Os ritmos biológicos e a saúde	36
2.5.	Cronobiologia na vida real.....	38
3.	OBJETIVOS	41
3.1.	Objetivo geral	41
3.2.	Objetivos específicos	41
4.	RESULTADOS	42
4.1.	Artigo 1	42
4.2.	Artigo 2	67
4.3.	Artigo 3	94
5.	DISCUSSÃO	119
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS	124
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	125
	ANEXO I – PROJETO DE PESQUISA COMPLEMENTAR	142
	ANEXO II – PRODUÇÃO COMPLEMENTAR	163

1. INTRODUÇÃO

Visando apresentar os assuntos que serão abordados na defesa da presente tese, convido o leitor à reflexão de uma analogia apontando aspectos semelhantes entre o processo de regulação dos ritmos circadianos e uma situação mais cotidiana, como a interação de um baterista com a sua partitura:

Sinalização e Entrada/*Input*

De antemão, temos um sinal visual único, recebido pelo músico por meio da reflexão da luz na folha – nesse caso, refletindo o preto dos símbolos e o branco do papel. Esse sinal é emitido por uma fonte externa, e chega à sua retina após uma série de procedimentos essenciais para o fim a que se destinam – movimentação do globo ocular, capacidade de foco para diferentes distâncias, ou mesmo modulação da quantidade de luz que será recebida. A detecção das formas dos símbolos, pelo contraste entre o preto e o branco, é atributo de receptores específicos do aparelho visual humano – cabe aqui a observação de que, embora a situação aqui usada como analogia utilize de exemplos visuais, os processos que serão explicitados posteriormente não envolvem o sentido da visão propriamente dito (1). Assim, os sinais que chegam aos olhos do baterista são o que podemos considerar como o primeiro elemento do fenômeno que está sendo descrito: a entrada (ou *input*), que é a interação desse(s) receptor(es) com determinado(s) sinal(is).

Processamento

Recebido o sinal descrito, o que fazer com isso? Para um leigo, os sinais descritos em uma partitura são apenas formas curvas em linhas pretas com características diversas contrastadas pelo fundo branco. É, pois, a capacidade da interpretação da etapa de entrada/*input* que enfim pode gerar o entendimento de uma mensagem por parte do músico. A capacidade de processamento da informação exemplificada é um fenômeno complexo que envolve diversas estruturas do nosso aparelho psíquico (2). Emitido o sinal por uma fonte externa, e ativada a etapa de entrada/*input*, uma rede de novas sinalizações ocorrerá em diferentes estruturas cerebrais, que serão responsáveis por procedimentos essenciais para o fim a que se destinam: o processamento, ou interpretação do que está sendo recebido (3).

Saída/Output

Seguindo a mesma linha de raciocínio, ao ser processada a informação recebida, o que acontece? Em um nível comportamental, o exemplo que está sendo usado nos leva a algumas possibilidades que se encontram no plano das (re)ações. Ou seja, recebida e processada a mensagem do sinal emitido, o músico tocará um ou mais elementos da bateria (ou permanecerá em silêncio) por um intervalo de tempo específico. E assim a forma de um simples sinal visual ganhou atributo de símbolo, foi dotado de significado (batida), e por fim gerou uma ação adequada a um contexto específico (som/silêncio).

Metrônomo claro/escuro ~ 365 bpa (batidas por ano)

Nosso ambiente apresenta características cíclicas com ritmos claro-escuro de aproximadamente 24 horas, e ritmos sazonais de aproximadamente 365 dias. Como forma de melhor adaptação ao longo da nossa evolução, visando antecipar os ciclos ambientais, a fisiologia humana também apresenta variações rítmicas em períodos determinados – talvez uma das características mais evidentes seja a do nível de consciência, observada nos ciclos de sono e vigília. Na retina do olho humano, são encontrados fotorreceptores chamados de melanopsinas, que, diferentemente do que ocorre na leitura de uma partitura, não participam das funções visuais, mas sim da recepção do sinal da luz para dar início ao mecanismo de sincronização temporal interna com as pistas temporais externas (4–6). Perceba-se que, embora não envolva o sentido da visão, as vias ativadas pelo mecanismo do sistema circadiano agem de maneira semelhante à descrita anteriormente, com a recepção de um sinal pela retina, levando ao processamento da informação por áreas especializadas, e gerando por fim manifestações fisiológicas e comportamentais de maior complexidade (7).

Ritmos e Harmonia

Na analogia proposta, as variações na entrada/*input* e no processamento levarão a variações na saída/*output*. Ou seja, tanto uma partitura mal escrita pode levar a considerar um ritmo de rock quando na verdade se trata de jazz, como também um sinal luminoso distorcido pode levar o corpo a interpretar meio-dia quando na verdade é meia-noite. Do mesmo modo, a interpretação errada de um ritmo adequadamente descrito no papel levará a uma execução equivocada, assim como a percepção distorcida dos ritmos circadianos poderá levar a alterações fisiológicas e comportamentais. Em ambos os casos, são as

informações processadas pela execução consecutiva desse mecanismo entre os diferentes níveis de entrada/*input* e saída/*output* que, ao decorrer dos compassos/dos dias, ganham um significado maior, e levam o resto da banda/das estruturas do corpo a manter a harmonia nos ritmos das suas atividades (8).

Dessa forma, assim como a leitura de uma partitura, o sistema circadiano lê a mensagem temporal do ambiente e processa essa informação rítmica desde níveis moleculares até níveis superiores. Retornando à analogia, um enfraquecimento do contorno dos símbolos pela superposição do branco do papel sobre o preto da escrita, ou o borramento da escrita por um excesso de tinta preta sobre as linhas da partitura prejudicará o processamento daquela informação, e conseqüentemente a correta execução do ritmo – tanto do baterista como do resto da banda. Em termos evolutivos, o advento da luz elétrica na sociedade contemporânea 24/7 é extremamente recente, o que suscita dúvidas quanto às capacidades biológicas de adaptação a essa mudança. Trata-se de uma modificação importante no paradigma de comportamentos cíclicos, visto que promoveu uma maior dissociação entre o ritmo ambiental e os ritmos sociais secundários à poluição luminosa (9). Embora se dê uma maior ênfase à luz, que é o sinal temporal de maior potência, outros aspectos comportamentais, como os períodos do dia em que se executam atividades físicas ou refeições, também exercem um papel importante na função de sinalizadores de pistas temporais (10). Exposto isso, é compreensível que problemas na regulação dos ritmos internos estejam associados a problemas de saúde (11–13). Logo, um melhor entendimento das características desse processo pode trazer resultados promissores para fins de avaliação e tratamento.

1.1. Justificativa

À vista disso, chama-se a atenção sobre o potencial que características da regulação dos ritmos biológicos podem apresentar em termos de saúde, e sobre a complexidade das estruturas envolvidas nesse mecanismo. O presente trabalho visa, portanto, analisar a relação entre aspectos genéticos e comportamentais no processo de sincronização temporal do indivíduo com o ambiente:

- A. Propondo-se uma análise que engloba níveis moleculares, por meio de polimorfismos relacionados aos genes do relógio, e aspectos comportamentais, por meio características habituais de sono e vigília, qualidade de sono e bem-estar psicológico.
- B. E uma análise da percepção de ritmicidade de variações circadianas e de variações sazonais nas áreas afetiva, cognitiva, e somática, e sua associação com probabilidade de transtorno psiquiátrico avaliada por escala validada.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. A Regulação dos Ritmos Biológicos

Estudos sobre os movimentos periódicos das folhas da planta *Mimosa Pudica* ao longo dos períodos do dia e da noite, que demonstraram a manutenção dos padrões de movimentação mesmo na ausência de luz, foram os primeiros experimentos melhor documentados que introduziram o conceito de que o fenômeno rítmico observado nos seres vivos não ocorre apenas por reação aos estímulos externos, mas também pela atividade de processos biológicos internos (14).

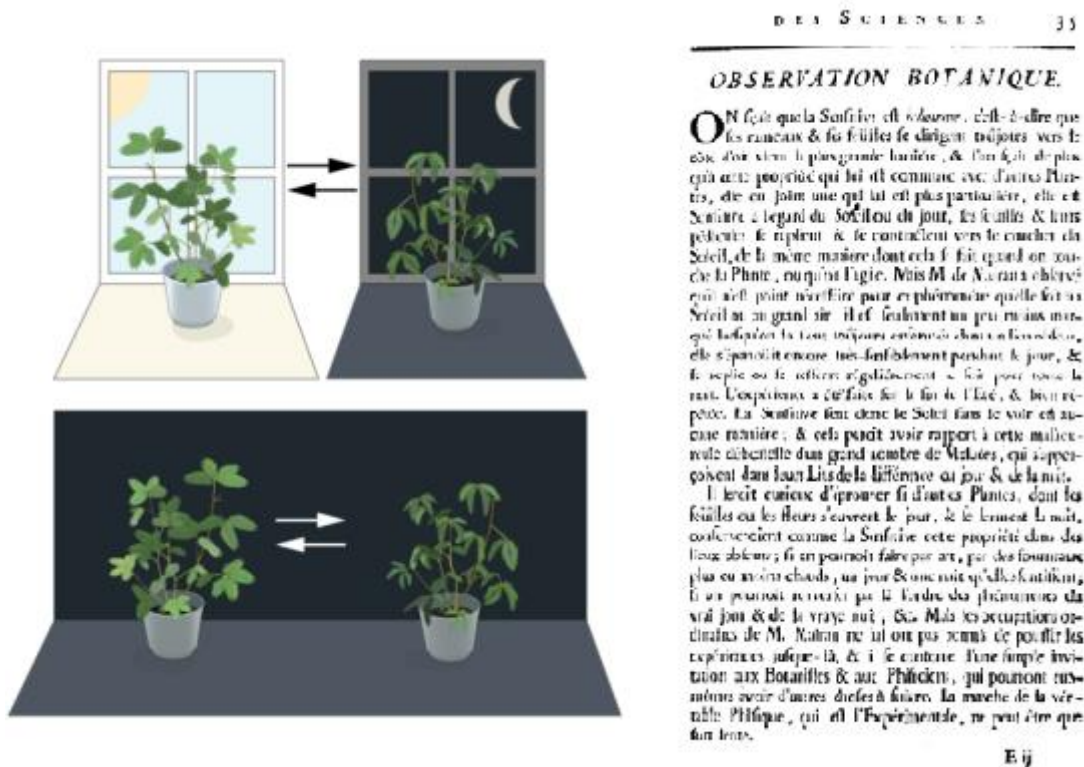


Figura 1 – Publicação do experimento com a *Mimosa Pudica*, em 1729, demonstrando a persistência do ritmo de abertura e fechamento das folhas mesmo sem a presença de estímulos luminosos (figura adaptada, acesso em 26/01/2020, Green CPU Wordpress - <https://jonathansobel1.wordpress.com/>; Desenho creditado a Mattias Karlén).

Denominam-se como *zeitgebers* (do alemão *zeit* = tempo, *geber* = quem dá) os sinais temporais da interação entre o ritmo externo e a regulação do ritmo interno. A luz é considerada como o *zeitgeber* de maior potência. Nos mamíferos, os sinais fóticos do ambiente externo são detectados por fotorreceptores contendo melanopsinas, que são fotopigmentos expressos nas células ganglionares da retina, e participam da regulação temporal entre os ciclos claro e escuro. A sinalização dessas estruturas é transmitida por sinapses glutamatérgicas via trato retino-hipotalâmico até o Núcleo Supraquiasmático (NSQ), uma importante estrutura localizada no Hipotálamo, e que pode ser entendida como o marcapasso central do nosso corpo (15). A sua atividade sincronizadora se dá por meio de projeções que passam pelo núcleo paraventricular hipotalâmico (NPV) para os neurônios simpáticos do núcleo intermediolateral do segmento superior da medula espinhal torácica. A partir daí, fibras nervosas eferentes passam pelo tronco simpático, e fazem sinapse com células nervosas do gânglio cervical superior (GCS), que inervam então a glândula pineal (16). Sabe-se que o ciclo claro/escuro é o principal regulador desse sistema, e este circuito elétrico é “desligado” quando há incidência de luz. No escuro, a atividade da via descrita libera noradrenalina, que atua sobre os adrenoceptores localizados nos pinealócitos, desencadeando a ativação da síntese da melatonina (17). Na pineal, a melatonina é sintetizada a partir da serotonina (5-HT), a qual, ao sofrer acetilação, forma o intermediário N-acetilserotonina. Este, por sua vez, converte-se em 5-metoxi-N-acetilserotonina (melatonina) ao sofrer metilação. As enzimas que participam da transformação da serotonina em melatonina, a N-Acetil-Transferase (AANAT) e Hidroxindol-metil-transferase (HIOMT ou ASMT), apresentam variações circadianas relacionadas principalmente ao estímulo simpático noradrenérgico (16,17).

Após sua síntese, a melatonina é liberada na corrente sanguínea de forma imediata, sem ser estocada. Apesar de a melatonina ser produzida em níveis bem reduzidos por outras células (mucosa estomacal, linfócitos, macrófagos e células do colostro), pode-se considerar que o pico noturno de melatonina é a expressão da atividade pineal e, por conseguinte, a expressão da atividade autonômica simpática (18,19). Embora seja reconhecidamente uma molécula com múltiplas funções, sua função primária é a sinalização das informações referentes aos ritmos claro-escuro do sistema nervoso central (SNC) para os sistemas periféricos, auxiliando na sincronização circadiana de atividades moleculares e hormonais (20).

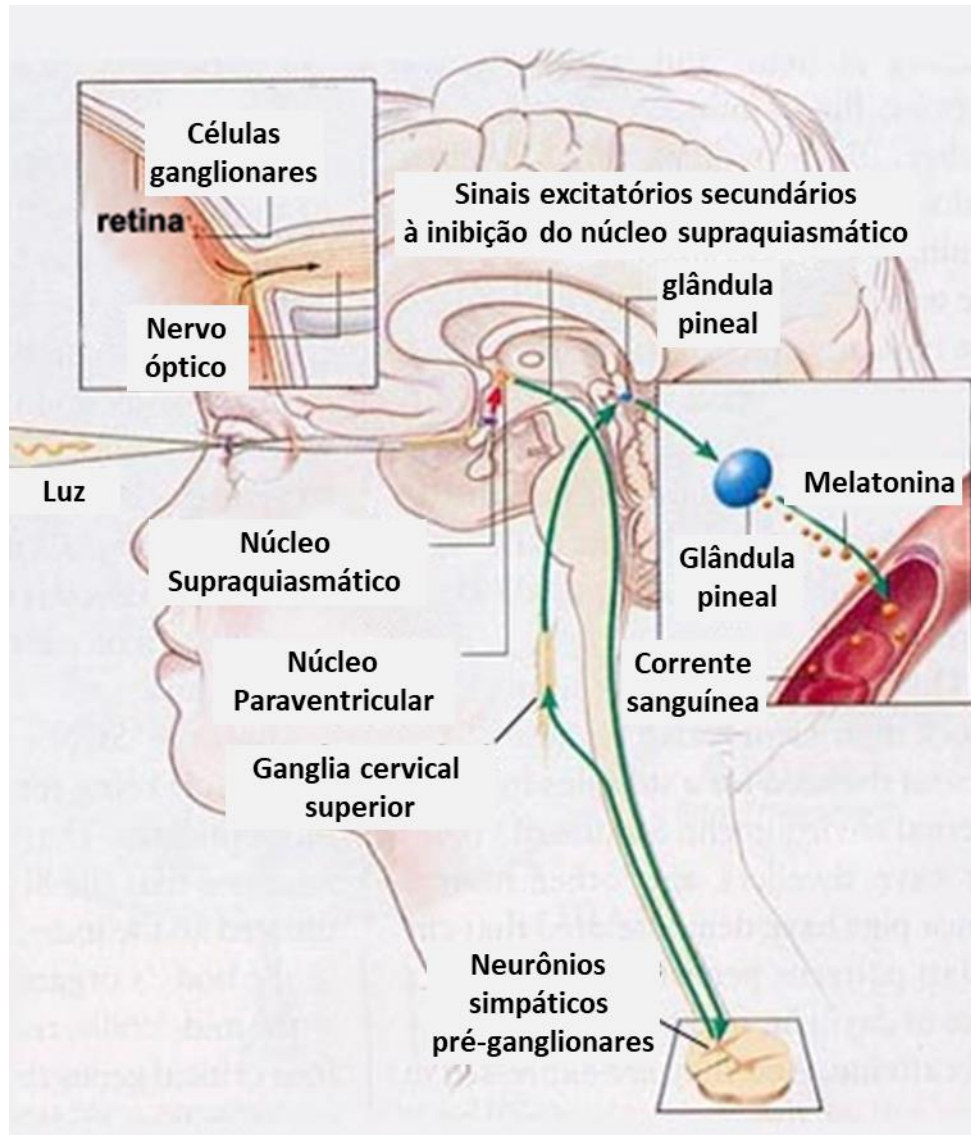


Figura 2 – Processo envolvido desde o recebimento do sinal fótico até a produção e secreção da melatonina. (Acessado e traduzido em 26/01/2020, <https://thebrain.mcgill.ca>).

Além disso, os processos moleculares e fisiológicos da regulação infradiana, ou circanual, parecem também estar intimamente relacionada aos mecanismos descritos (21). Um grande foco das pesquisas nessa área tem sido a inter-relação entre a atividade da Pars Tuberalis (PT) e a regulação da função tireoidiana (8). A PT compõe a parte anterior da glândula hipófise. Em espécies de mamíferos com comportamentos sazonais bem definidos, uma característica em comum dessa estrutura é a expressão de receptores de melatonina MT1 (MNTR1A) nas células tireotróficas PT-específicas (22–25). Uma variedade de estudos experimentais demonstra que os hormônios tireoidianos (THs) exercem papel

fundamental na regulação de ritmos sazonais (26–29), contudo, as vias pelas quais essa regulação ocorre ainda são pouco compreendidas.

2.2. O relógio molecular

A integração entre os sistemas central e periférico apresenta características hierárquicas, com maior influência dos sinais centrais sobre os sinais periféricos. Chegada a atividade proveniente do sinal fótico ao NSQ, a regulação dos mecanismos moleculares do sistema circadiano nos neurônios dessa estrutura ocorre por uma sucessão de ciclos, ou *loopings*, de retroalimentação da transcrição e tradução gênica (TTFLs) com duração aproximada de 24h. Descrito inicialmente pelos pesquisadores Jeffrey C. Hall, Michael Rosbash and Michael W. Young (ganhadores do prêmio Nobel de 2017 em Medicina), esse mecanismo considera a relação entre dois eixos principais: a transcrição e tradução dos genes do eixo positivo leva ao acúmulo de proteínas que agem na estimulação da transcrição e tradução de genes com efeito oposto, o eixo negativo. Este ativa a formação de proteínas que levam à contenção da transcrição e tradução dos produtos previamente mencionados. Assim, forma-se um processo autorregulatório de características oscilatórias (7).

Nos mamíferos, o ciclo principal é composto pelas proteínas traduzidas pelos genes *CLOCK* e *BMAL1*, que formam o complexo de dímeros do eixo positivo CLOCK-BMAL1. Através de atividade E-box, esse complexo induz a expressão gênica dos seus reguladores, *PER* e *CRY*, que, de maneira semelhante, leva à formação do complexo de dímeros do eixo negativo, PER-CRY, o qual suprime a atividade transcricional dos genes *CLOCK* e *BMAL1*, conseqüentemente gerando também a sua autossupressão. Assim, no momento em que a concentração de PER-CRY reduz, é retomada a transcrição de CLOCK-BMAL1, o que leva ao início de um novo ciclo. O dímero CLOCK-BMAL1 também induz a expressão de receptores nucleares REV-ERB alfa e beta, os quais, junto da expressão de ROR alfa, beta e gama, formam um ciclo secundário que regula especificamente o ritmo de expressão do gene *BMAL1*. A participação da proteína E4bp4 (NFIL3) é considerada como um terceiro ciclo de regulação que atua através de sequências D-Box (DBP) (7).

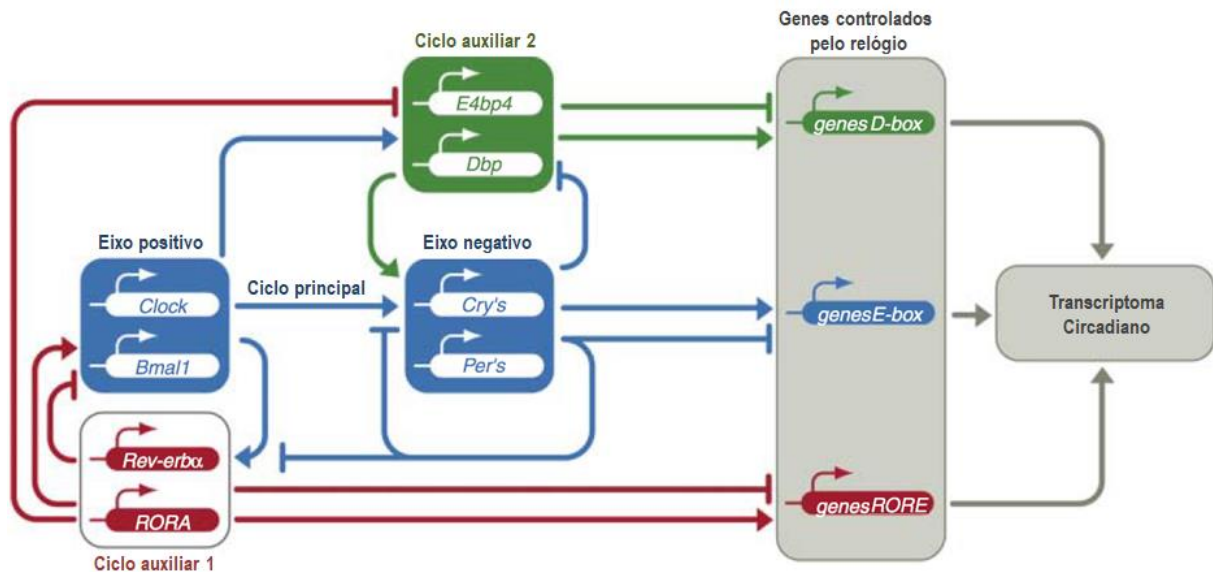


Figura 3 – Esquema simplificado dos ciclos principal e secundários do relógio circadiano molecular nos mamíferos. RORE: ROR *response elements*. (Traduzido e reproduzido de Hastings, 2007).

Em mamíferos, o papel do gene *TIM* (*Timeless*), o qual é um dos principais elementos dos ciclos de retroalimentação de transcrição e tradução em animais de filos inferiores, parece ter sido substituído pela ação de *CRY*, embora estudos experimentais demonstrem que há uma relação regulatória ainda não bem esclarecida entre esses dois genes (30,31).

Além das interações transcricionais levando a retroalimentação de ativação e supressão dos ciclos descritos, achados recentes vêm demonstrando uma variedade de outros mecanismos igualmente importantes na regulação dos períodos de expressão dos genes do relógio. Entre esses, observam-se atividades de processos de domínios de associação topológica, partes do genoma com extensa interação de regiões promotoras e acentuadoras, como observado, pelo menos em parte, na ação dos *REV-ERB* (32).

Embora os processos oscilatórios descritos estejam presentes em todas as células do nosso corpo (com exceção de células germinativas e células somáticas que tenham sofrido transformação maligna), as células do NSQ são as únicas que apresentam a característica de manter as propriedades rítmicas por longos períodos de tempo de forma independente (33).

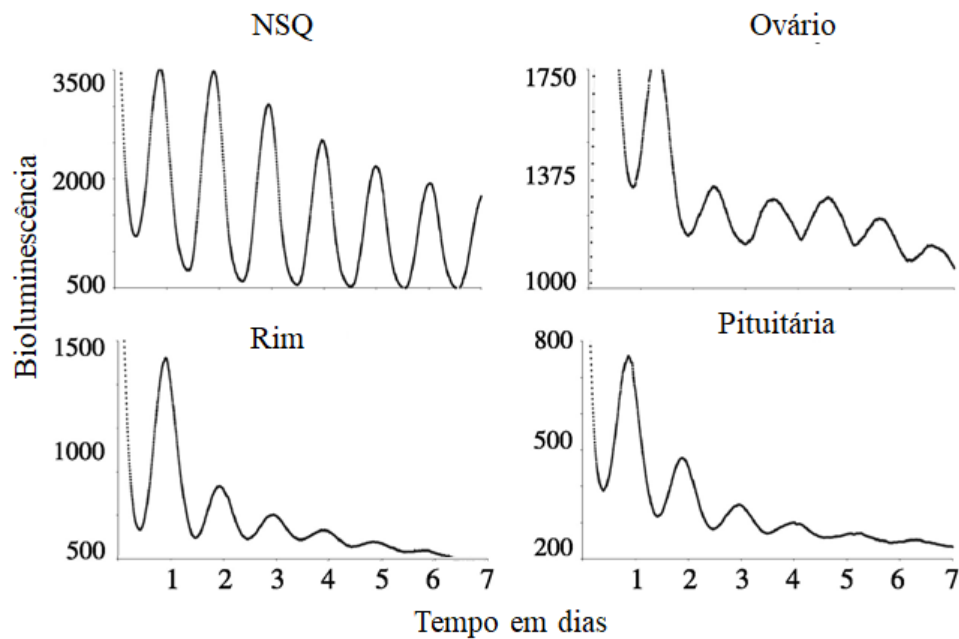


Figura 4 – Análise dos ritmos circadianos moleculares em culturas de células do NSQ e de tecidos periféricos. (Reproduzido de Hastings et al., 2007, modificado)

Em relação à regulação circadiana, o gene *EYA3* vem sendo demonstrado como um dos principais elementos desse mecanismo. Sua expressão ocorre em situações de fotoperíodo longo (34,35). Além disso, age como coativador transcricional na expressão da subunidade TSH beta (TSHb), demonstrando ser parte essencial na regulação da atividade das células tireotróficas PT-específicas (34,36). Diferentemente do NSQ, onde a coexpressão rítmica de *PER* e *CRY* exerce função moduladora via ligação E-box (37), a atividade do relógio molecular das células da PT parece sofrer preponderantemente a influência da ação melatoninérgica retrógrada. Nessa estrutura, observa-se que, enquanto a expressão de *CRY1* é induzida pela ação da melatonina nos períodos de escuro (22,23,38–41), a expressão de *PER1* ocorre na ausência de ação melatoninérgica, decorrente da presença da luz (27). Visto que a expressão de *EYA3* é induzida pela ação das proteínas *CLOCK* e *BMAL1* (34), vem sendo desenvolvida a hipótese de que a ativação de *CRY1* pela ação melatoninérgica sobre a PT atua na programação da expressão de *CLOCK/BMAL1* para um período posterior, o que também influencia a expressão de *EYA3* e a regulação da atividade tireoidiana (26,34,36).

Conectando os processos regulatórios entre esses dois hormônios, estudos experimentais demonstram haver influência da duração do fotoperíodo externo sobre a

expressão das enzimas deiodinases, levando também a variações nos níveis de T3 (42). A participação dos receptores MT1 e TSH no efeito que o fotoperíodo exerce sobre a atividade da iodotironina deiodinase 2 (DIO2) evidencia uma conexão entre a ação melatoninérgica e tireoidiana, a qual pode ocorrer através da atividade dos receptores MT1 expressos na PT (43–45). Além disso, a via de ativação melatoninérgica retrógrada atinge o eixo gonadal (46), o que pode ter relação com os ritmos circadianos e infradianos observados na regulação reprodutiva das espécies.

Como contrapartida à atividade TSHb/EYA3, estudos recentes identificaram a cromogranina A (CHGA), uma molécula que promove a redução do armazenamento e secreção das células tireotróficas da PT, e que tem como característica uma maior atividade em situações de fotoperíodo curto (47). Esse mesmo grupo de pesquisadores analisou a distribuição de atividade TSHb/EYA3 e CHGA em células tireotróficas da PT em diferentes fases do ciclo circanual, e observou não haver coexpressão de ambas as atividades na mesma célula, sugerindo um mecanismo binário de regulação celular (fase de fotoperíodo curto vs fase de fotoperíodo longo), o que poderia explicar o processamento cumulativo nas informações das diferenças do fotoperíodo ambiental ao longo das estações do ano.

2.3. As variações fisiológicas e comportamentais

A manutenção das oscilações moleculares de regiões periféricas depende da regulação do marcapasso central para manter seus ritmos sincronizados com todo o sistema. A dissociação entre os relógios central e periféricos leva a alterações nas funções fisiológicas corporais, como alterações na homeostase dos níveis de glicose sérica (48,49). Além dos mecanismos autonômicos descritos anteriormente, a regulação da temperatura corporal, as atividades físicas e a ingestão de alimentos exercem um papel importante na regulação dos relógios periféricos (10,50–53).

Uma forma de abordar as características cíclicas dos mecanismos aqui descritos parte de demandas evolutivas de crescimento, sobrevivência e reprodução entre as espécies. A discussão sobre a sincronização fisiológica do organismo com o tempo externo, à luz do exposto, é possibilitada a partir dos achados de estudos moleculares, ao identificar que não apenas o relógio molecular, mas uma série de atividades transcricionais fisiológicas

demonstram oscilações circadianas. Em períodos de vigília, observa-se predomínio de metabolismo energético, neurotransmissão excitatória, aquisição de memória e mecanismos regulatórios de estresse celular, ao passo que no sono essas atividades centram-se processos de reparo e homeostase, como síntese proteica cerebral, consolidação sináptica, manutenção de membranas (metabolismo de colesterol, formação de mielina, *turnover* de vesículas sinápticas), e *clearance* de toxinas (sistema “glinfático”) (54–56).

A melatonina circulante é produzida e atinge o seu pico de secreção durante o período noturno, conforme descrito anteriormente. Em primatas, a melatonina é capaz de modular a produção de cortisol pela glândula suprarrenal através da ação em receptores melatoninérgicos MT1 (57). A secreção de diversos outros hormônios parece ter relação com os ritmos de liberação da melatonina, como o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), o hormônio luteinizante (LH) e o hormônio folículo-estimulante (FSH) (58). A ação retrógrada da melatonina sobre as células tireotróficas PT-específicas pode ser outra via importante na regulação dos ritmos hormonais, levando a uma possível ação parácrina sobre a glândula hipófise através da atividade de fatores de crescimento endotelial vascular (VEGF) e de Rfamidas (8,59).

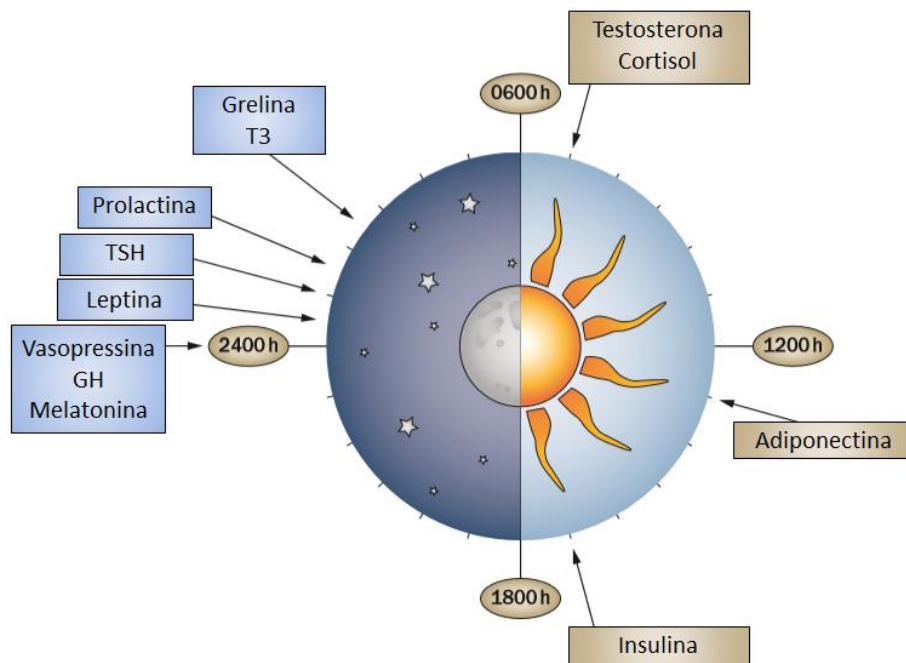


Figura 5 – Horários em que são observados os picos séricos de hormônios essenciais na regulação da homeostase corporal. GH: Hormônio do crescimento; TSH: Hormônio estimulador da tireoide; T3: Triiodotironina. (Reproduzido de Gamble et al., 2014 – modificado)

2.3.1. Parâmetros de sono e vigília

Entre os aspectos do sono e dos ritmos de sono e vigília que mais são abordados na pesquisa científica, destacam-se os conceitos de qualidade do sono, horários de sono e cronotipos. Para aprofundar o seu entendimento, além das características de cada um desses parâmetros, também serão descritos a seguir os instrumentos de avaliação mais comumente utilizados para a sua mensuração.

2.3.1.1. Qualidade de sono

A qualidade de sono é um conceito bastante abrangente na sua concepção. Entre os parâmetros utilizados para caracterizá-la, são examinados desde achados polissonográficos até aspectos essencialmente subjetivos (60). De um modo geral, a maior parte dos estudos engloba a avaliação de características autodeclaradas sobre o período de sono: aspectos temporais, como horários de início, término, e duração; presença de alterações sintomáticas relacionadas a distúrbios do sono, como dificuldades respiratórias ou movimentação excessiva; ou mesmo a própria percepção subjetiva de sono reparador.

O Índice de Qualidade de Sono Pittsburgh (PSQI) é a escala mais utilizada, e dispõe de uma versão validada para o português brasileiro (61). É um questionário composto por 19 itens que medem a qualidade do sono no último mês através da avaliação de sete componentes: (1) Qualidade subjetiva do sono, (2) Latência de início de sono, (3) Duração do sono, (4) Eficiência habitual do sono, (5) Distúrbios do sono, (6) Uso de medicações para dormir, e (7) Funcionalidade durante o dia (62). O escore de cada um dos componentes varia entre 0 e 3 pontos, e o escore total da escala pode variar entre 0 e 21 pontos, sendo calculado pela soma dos escores dos sete componentes. É sugerido o ponto de corte para o escore total de até 5 pontos para boa qualidade de sono, e 6 pontos ou mais para má qualidade de sono, embora, pelas características da escala, a análise dos escores pelos diferentes componentes mostra-se igualmente válida. Os parâmetros desse questionário foram estruturados pela comparação entre sujeitos hígidos (considerados “bons dormidores”), e sujeitos com morbidades que levam a prejuízo no sono, como depressão e distúrbios do sono (considerados “maus dormidores”). Dessa forma, a maior parte dos estudos no tema usa, para cada um dos componentes, os seguintes pontos de corte:

1. *Duração de sono de pelo menos 7 horas;*
2. *Ausência de sintomas relacionados a distúrbios do sono, como noctúria, roncos, apneias observadas, alterações relacionadas à temperatura corporal, sonhos incômodos/pesadelos, dores, episódios de confusão mental durante a noite, atividade motora incomum ou incômoda;*
3. *Latência de início de sono de no máximo 15 minutos;*
4. *Manutenção da funcionalidade das rotinas diurnas em relação ao sono;*
5. *Tempo de sono de pelo menos 85% do tempo total de permanência na cama;*
6. *Bons níveis de qualidade subjetiva do sono;*
7. *Não fazer uso de medicações para induzir o sono.*

Logo, características que diferem dos pontos de corte mencionados tendem a piores escores de qualidade de sono segundo este instrumento. Contudo, embora relevantes em relação ao caráter subjetivo, esses parâmetros não devem ser considerados para entendimento de dados objetivos de sono. Estudos demonstram haver mínima correlação dos escores do PSQI com dados obtidos por polissonografia, sendo observada maior correlação com parâmetros psicológicos (63). Em estudo recente utilizando técnicas de *machine learning*, observou-se que os parâmetros polissonográficos podem explicar apenas 11 a 13% da variação de escores de qualidade de sono subjetiva (64). Esses achados reforçam a necessidade de se manter atenção quanto aos métodos de análise empregados, visto que há diferenças importantes entre os dados objetivos e os dados subjetivos em relação à qualidade do sono.

2.3.1.2. Ciclo sono e vigília – horários e cronotipos

Em relação à avaliação das características de sono e vigília, é observada uma maior variedade de escalas utilizadas, com variações em relação aos seus objetivos e abordagens (65). Os horários de sono são uma característica forte da regulação circadiana individual. Um ponto importante a ser considerado para a avaliação desse parâmetro são as diferenças entre as rotinas de dias de trabalho e dias livres. O *Munich Chronotype Questionnaire*

(MCTQ) tem como o seu diferencial a separação dos dados de sono em rotinas específicas (66). Com isso, possibilita calcular o débito de sono acumulado nos dias de trabalho e identificar o desvio do ponto médio de sono dos dias livres. Não apenas restrita ao débito de sono, a análise das diferenças persistentes em ritmos de sono e vigília entre dias de trabalho e dias livres propiciou a observação do fenômeno o qual foi denominado como *jet lag social*. Esse nome foi inspirado em achados que, de forma semelhante ao processo de adaptação aos diferentes fuso-horários de viagens intercontinentais, observaram em um grande número de indivíduos diferenças no ponto médio de sono entre os padrões rítmicos de dias de trabalho/estudo e dias livres. Há, todavia, ressalvas importantes quanto à comparação mencionada, o que inclusive trouxe à rediscussão do termo em questão, haja vista que, ao longo dos últimos anos, a análise de uma maior quantidade de dados demonstra que apenas a consideração sobre a dessincronização de horários parece ser incompleta, podendo levar a uma compreensão simplista dos demais processos envolvidos. Contudo, ainda assim é uma medida que demonstra associação com piores desfechos em saúde, sendo relevante seu estudo e melhor entendimento (67–70).

Um conceito mais amplo sobre características individuais e ritmos é o de cronotipo, que é entendido como um construto biológico que se relaciona ao fenótipo temporal do conjunto de manifestações fisiológicas e comportamentais de um indivíduo, não só em relação a horários de dormir e acordar, mas também em relação à capacidade de adaptação para realizar tarefas com demandas cognitivas e físicas. Esses padrões tendem a variar entre cronotipos matutinos, com melhor adaptação a horários “adiantados” (concentram atividades no período diurno, e dormem cedo), cronotipos intermediários/indiferentes, e cronotipos vespertinos, com melhor adaptação a horários “atrasados” (concentram atividades no final do período diurno ou mesmo nos períodos noturnos, e dormem tarde) (70).

A *Morningness-Eveningness Questionnaire* (MEQ) foi a primeira escala a ser desenvolvida para esse fim. Descrita pela primeira vez em 1976, é uma das escalas mais utilizadas para a avaliação de cronotipos (71). Trata-se de um instrumento com 19 itens que avaliam os horários de melhor adaptação de atividades físicas e intelectuais, além dos ritmos de sono. Os resultados variam entre scores de 16 a 86 pontos, com a possibilidade de identificação de 5 cronotipos diferentes: matutinos extremos, matutinos moderados, intermediários, vespertinos moderados, vespertinos extremos. A *reduced Morningness-Eveningness Questionnaire* (rMEQ) é uma versão reduzida da mesma escala, a qual utiliza

apenas 5 das 19 perguntas da escala original (72). Mantém uma boa capacidade de discriminar diferentes cronotipos, porém restringe as categorias para três resultados possíveis: matutinos, intermediários e vespertinos apenas.

Uma escala desenvolvida recentemente e que traz detalhes importantes de aspectos comportamentais característicos dos períodos de sono e de vigília é o Instrumento de Ritmo de Humor (*Mood Rhythm Instrument - MRhI*). Essa escala tem como objetivo avaliar a percepção de ritmo de diferentes variáveis que fazem parte do diagnóstico clínico de transtorno de humor (73). Composta por 15 questões (alerta, sono, capacidade em resolver problemas, autoestima, concentração, apetite, libido, irritabilidade, ansiedade, tristeza, disposição para atividade físicas, memória, pessimismo, motivação para falar com amigos, e energia) divididas em três componentes principais (afetivo, cognitivo e somático), é solicitado ao participante que responda sobre a presença de percepção de um pico diário para cada um dos itens, identificando o horário de pico em uma escala análogo visual que corresponde às 24 horas do dia. Os dados resultantes possibilitam a avaliação de variáveis categóricas relacionadas à percepção de ritmos, e avaliações temporais pela distribuição do pico diário dos itens (74). Com o objetivo de aprimorar a precisão das suas medidas, uma versão revisada deste instrumento está sendo construída, na qual se propõe a reformulação da sua estrutura de 15 para 11 itens (Oliveira et al., não publicado).

Em relação a medidas subjetivas de variações comportamentais sazonais, existem poucos instrumentos validados disponíveis. O instrumento mais utilizado é o Questionário de Avaliação de Padrões Sazonais (*Seasonal Pattern Assessment Questionnaire - SPAQ*) (75), o qual se propõe principalmente ao diagnóstico do transtorno afetivo sazonal (76,77). Diferentemente dos dados relacionados à qualidade do sono, os dados coletados por instrumentos que medem parâmetros subjetivos em relação aos horários e aos ritmos circadianos de sono e vigília, incluindo o MEQ, rMEQ e MCTQ, demonstram forte correlação com os resultados de métodos de aquisição objetiva (actigrafia) para ritmos circadianos (78,79), porém ainda controversos em relação aos ritmos sazonais (80). Estudos recentes vêm possibilitando também a identificação de aspectos moleculares de parâmetros de horários de sono, como as diferentes vias transcricionais relacionadas à duração do sono, às quais envolvem genes relacionados tanto à regulação do sono e dos ritmos circadianos, quanto a processos metabólicos envolvidos na secreção de insulina e na regulação de gliconeogênese e lipogênese (81).

2.4. Os ritmos biológicos e a saúde

A evolução das metodologias dos estudos genéticos ao longo das últimas décadas vem possibilitando a compreensão de relações cada vez mais complexas entre o código genético e os processos relacionados à saúde (82). De uma maneira bastante simplificada, o DNA é um composto orgânico formado por unidades repetidas de nucleotídeos, as quais são denominadas de bases nitrogenadas são elas: adenina (A), citosina (C), guanina (G) e timina (T). Essas, por sua vez, formam pontes de hidrogênio entre si, gerando então o conceito de pares de bases. Esta formação de pontes de hidrogênio entre as bases nitrogenadas é o que promove a formação da estrutura em dupla hélice do DNA. Adicionalmente, o genoma humano é composto por aproximadamente 3 bilhões de pares de bases, as quais se dispõem formando filamentos de DNA. O entendimento de gene compreende sequências de DNA que contêm uma região promotora, composta pela porção 5' UTR (untranslated region) à montante da fase de leitura, a porção denominada fase de leitura, a qual será transcrita em RNA mensageiro, e por fim a região 3' UTR à jusante da fase de leitura. Essa sequência poderá ser transcrita em RNA mensageiro, que por sua vez pode ser expressa em proteínas. Assim sendo, o termo polimorfismo de nucleotídeo simples (SNP) refere-se à análise entre diferenças como trocas de pares de base em determinados genes. Assim, visando detectar relações entre variações dos SNPs e desfechos em saúde, os estudos genéticos partiram de análises simples para metodologias cada vez mais avançadas, ganhando um maior alcance após o surgimento dos métodos de associação genômica ampla (GWAS) (83).

As relações entre alterações psiquiátricas e ritmos circadianos e sazonais vêm sendo extensamente estudadas ao longo das últimas décadas (84). Análises genéticas de polimorfismos envolvidos na regulação circadiana tem apresentado associação com transtornos de humor (85,86). Especificamente em relação à depressão maior, há achados sugerindo associação de polimorfismos dos genes envolvidos na rota de síntese de melatonina pela pineal, *AANAT* (87) e *ASMT* (88), do gene relacionado ao receptor MT1 de melatonina, *MTNR1B* (89), de genes relacionados aos ciclos regulatórios do eixo principal, *RORA* (90) e *TIMELESS* (91,92), e também dos core-clock genes, *BMAL1* (91), *CRY1* (93,94) e *CRY2* (95). A ritmicidade na expressão gênica do relógio molecular em pacientes com Depressão maior (MDD) encontra-se alterada em regiões encefálicas específicas,

conforme análises pós-mortem nas regiões do córtex pré-frontal dorsolateral, córtex cingulado anterior, hipocampo, amígdala, núcleo accumbens e cerebelo (96).

A observação de padrões rítmicos diários de sintomas de humor em pacientes com diagnóstico de MDD reforça a hipótese de que há componentes desse sistema nos transtornos de humor (97). Estudos envolvendo a relação entre probabilidade de transtornos psiquiátricos e percepção de ritmos nas manifestações de humor identificaram a noção de uma maior percepção do pico diário de pessimismo, assim como uma menor percepção do pico diário de motivação para se exercitar como características significativas para desfechos mentais desfavoráveis (74). O somatório de itens nos quais há percepção de ritmicidade igualmente demonstrou significância para desfechos secundários, como sintomas depressivos e bem-estar psicológico (98). Os mecanismos de cronodisrupção, como os observados em casos de *jet lag* social intenso e de trabalhos de turno invertido, também parecem exercer papel importante em relação ao bem-estar psicológico e a manifestações depressivas (99–101). O uso de métodos objetivos de monitorização de ritmos de atividade e repouso, como a actigrafia, também se mostra relevante nesse tema, ao ser capaz de auxiliar na determinação de diferentes subtipos de quadros depressivos (102). Já em relação a manifestações de ansiedade, embora haja resultados associando alterações nos ritmos circadianos e transtornos de ansiedade, há controvérsias quanto a se existe uma relação direta ou se essa relação é mediada por alterações de sono e sintomas de humor (103). O estudo dos ritmos circadianos também demonstra resultados promissores para aspectos terapêuticos, haja vista que importantes achados relacionando a excreção de metabólitos da degradação da melatonina noturna à resposta ao tratamento com antidepressivos podem levar ao uso de biomarcadores em contextos clínicos (104).

A alta herdabilidade do transtorno de humor bipolar (THB) leva a considerar características genéticas relevantes envolvidas na sua etiopatogênese (105). Contudo, os mecanismos moleculares envolvidos ainda não são compreendidos. Alguns achados sugerem relação de genes do relógio biológico com o risco de THB, e a participação de alterações dos ritmos comportamentais como mecanismo de susceptibilidade à desestabilização (106,107). A comanifestação de alterações de ritmos circadianos e THB é reforçada por achados da literatura, embora não seja possível determinar se são manifestações relacionadas à doença, ou fatores causadores de episódios de desestabilização (108). Contudo, a cronodisrupção do componente temporal das viagens transmeridionais (*jet lag*), ou mesmo por quebra brusca nos ritmos sociais (*jet lag* social),

parece estar relacionada com a indução de episódios de descompensação no THB (109,110). Achados interessantes relacionando a detecção de episódios depressivos e maníacos por meio da avaliação de ritmos celulares e de cortisol em amostras salivares demonstram um potencial promissor do sistema circadiano para o contexto clínico (111).

2.5. Cronobiologia na vida real: Perfil epidemiológico e fenotípico de uma amostra caucasiana do Vale do Taquari

O presente trabalho faz parte da linha de pesquisa cujo foco é o estudo epidemiológico em cronobiologia. Inicialmente, escolhemos a região do Vale Taquari por ser uma população de aspectos culturais relativamente homogêneos, e densamente povoada por descendentes de origem alemã e italiana, o que possibilitava a realização de análises em amostras com características genótípicas homogêneas e a comparação com populações em outras localidades. Para tanto, estabelecemos uma parceria com a UNIVATES, Lajeado-RS, Brasil e a *Ludwig-Maximilians-University of Munich* - LMU, Munique. Em uma primeira etapa, coletamos um total de 6506 indivíduos, o que representava na época 20% do total de habitantes. Em uma segunda etapa, estimou-se inclusão apenas de participantes com padrões de sono extremos, os quais tiveram outros parâmetros avaliados, incluindo amostras de sangue para análise genética. Maiores detalhes do planejamento da amostragem e das características da população podem ser consultadas em artigo publicado em 2014 (112).

As hipóteses levantadas a priori foram: (i) cronotipos extremos estão associados a piores níveis de bem-estar e qualidade de sono, esperando-se um maior consumo de estimulantes nesse grupo; (ii) cronotipo e duração de sono associam-se a habilidades de *coping*, sintomas depressivos, e cefaleia; (iii) cronotipo e duração de sono apresentam componentes hereditários; (iv) polimorfismos previamente descritos por colaboradores do grupo associam-se com a regulação dos fenótipos envolvidos nos comportamentos circadianos e nas características de sono.

As hipóteses (i) e (ii) foram respondidas em uma série de estudos focados em bem-estar psicológico e sintomas depressivos. Pôde-se demonstrar que não existe uma relação direta entre vespertinidade e sintomas depressivos, mas sim uma associação de piores níveis de sintomas depressivos com maiores níveis de *jet lag* social (100). Em estudo posterior, a correlação de parâmetros de sono vespertinos em dias de trabalho com piores

níveis de bem-estar psicológico levantou a possibilidade de usar as medidas de ponto médio de sono em dias de trabalho não apenas como parâmetros de sono individuais, mas também como a medida relacionada às diferenças entre ritmos individuais e ritmos de trabalho (99). Em 2018, os resultados do artigo que precede a presente tese demonstraram que a interação entre rotinas de trabalho mais tardias e horários de sono também mais tardios levam a piores níveis de bem-estar psicológico (113). Os achados mencionados também foram observados em populações de crianças e adolescentes, ao se observar correlação entre pontos médios de sono mais tardios em dias escolares a sintomas depressivos em crianças (114). Avaliando também os dados relacionados à exposição à luz, demonstramos uma correlação positiva entre níveis de interleucina 6 (IL-6) na corrente sanguínea e exposição à luz solar estimada pelo MCTQ, com a observação de características diferentes nos níveis séricos entre participantes com mais sintomas depressivos quando comparados a indivíduos com menos sintomas depressivos (115).

Com os achados que demonstraram a importância das diferenças entre os ritmos de dias de trabalho e dias livres, foram desenvolvidos estudos visando esclarecer os demais aspectos dessas características, como as diferenças entre adultos com atividades de trabalho rural e urbano, levando em consideração principalmente os padrões de exposição à luz diurna e os horários de sono em dias de trabalho e dias livres. Com essa análise, foi demonstrado que não apenas características ambientais, mas também características sociais das rotinas de trabalho relacionaram-se com as características dos padrões de sono (112). Os achados não se restringem a adultos, visto que, em 2015, em parceria com a Universidade de Barcelona e a Universidade de Bologna, realizamos um estudo com crianças da mesma região que também demonstrou resultados similares, ao ser observada associação entre parâmetros de sono e rotinas dos dias escolares (116). Em 2017, análises comparativas entre crianças que estudavam pela manhã e crianças que estudavam à tarde demonstraram que horários de início das atividades escolares em período matutino estavam associados também a alterações nos níveis de melatonina (117).

Com relação às hipóteses (iii) e (iv) sobre parâmetros genéticos e fenótipos cronobiológicos, o primeiro estudo dessa linha foi publicado em 2017. Esse artigo incluiu análises moleculares dos dados coletados no Vale do Taquari, juntamente com dados de outros grupos colaboradores, sendo analisadas as vias de expressão e transcrição para duração de sono. Genes associados ao metabolismo e à regulação do sono e dos ritmos circadianos apresentaram influência sobre a duração de sono (81).

Além dos objetivos relacionados ao estudo dos fenótipos, foi possível também a validação da versão em português brasileiro do WHO-5, o qual foi preenchido por 1128 indivíduos que faziam parte deste projeto, possibilitando o uso dessa escala em estudos posteriores (118).

Com o andamento das análises do projeto mencionado, as discussões dos resultados encontrados nos últimos anos levaram a repensar quais aspectos ainda poderiam ser aperfeiçoados para pesquisas futuras. Em um projeto cuja finalidade é a caracterização fenotípica e genotípica dos ritmos biológicos, a falta de dados relacionados à percepção de ritmos circadianos em sintomas de humor foi notada, o que levou à iniciativa da criação do MRhI.

Dessa forma, além do seguimento das análises relacionadas aos aspectos moleculares da regulação dos ritmos circadianos individuais, o presente trabalho optou também pela inclusão de análises que ampliam a avaliação da percepção de ritmos não apenas para comportamentos de sono e vigília, mas também para aspectos afetivos, cognitivos e somáticos dos sintomas de humor. Diante ao exposto, esta tese visa contribuir com o estado da arte, estudando a associação de polimorfismos de genes relacionados ao sistema circadiano com aspectos do sono e da saúde, e a associação da percepção entre ritmos circadianos e sazonais de sintomas de humor com a probabilidade de transtornos psiquiátricos. Os resultados obtidos vêm possibilitando aprofundar o entendimento sobre manifestações genotípicas e fenotípicas relacionadas ao sistema circadiano, e sua associação com aspectos do sono e da saúde.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral:

Analisar a inter-relação de múltiplos níveis envolvidos na regulação do sistema circadiano com desfechos em saúde mental, incluindo desde polimorfismos de genes associados aos genes do relógio até aspectos comportamentais relacionados aos ritmos biológicos.

3.2. Objetivos específicos:

1. Avaliar a associação entre qualidade de sono e sintomas psiquiátricos/cardiometabólicos autorreferidos, incluindo medidas de efeito indireto com padrões de horários de sono;
 - a. Analisar a associação entre os parâmetros de sono (qualidade de sono e horários de sono) e polimorfismos dos genes *AANAT*, *RORA* e *TIMELESS*;
2. Verificar se a associação entre bem-estar psicológico e polimorfismos dos genes *AANAT*, *RORA* e *TIMELESS*, é mediada por horários de sono;
3. Analisar a relação entre risco para distúrbios psiquiátricos e a percepção da variação circadiana e sazonal de sintomas de humor.

4. RESULTADOS

4.1. Artigo 1

Title: Poor sleep quality associates with self-reported psychiatric and cardiometabolic symptoms independently of sleep timing patterns in a large sample of rural and urban workers.

Authors: Felipe Gutiérrez Carvalho ^{1,2}; Ana Maria Delgado Cunha ¹; André Comiran Tonon ^{1,2}; Fernanda dos Santos Pereira ³; Ursula Matte ⁴; Sidia Maria Callegari-Jacques ⁵; Maria Paz Hidalgo ^{1,2}.

Affiliations: ¹ Laboratório de Cronobiologia e Sono HCPA/UFRGS; ² Graduate Program in Psychiatry and Behavioral Sciences UFRGS; ³ Centro de Pesquisa Experimental, Unidade de Análises Moleculares e de Proteínas HCPA; ⁴ Gene Therapy Center, Experimental Research Center HCPA; ⁵ Departamento de Estatística, Instituto de Matemática e Estatística UFRGS.

Submetido em 10/08/2019

Aceito em 23/11/2019

Journal of Sleep Research - <https://doi.org/10.1111/JSR.12969>

SUMMARY

Poor sleep associates with mental and cardiometabolic pathological outcomes. The participation of sleep timing features in the pathways by which this relationship occurs is not clear. This study aims to evaluate the interrelationship between sleep quality and self-reported psychiatric/cardiometabolic symptoms, considering mediation and moderation effects of sleep timing patterns and urban vs rural work environment respectively; and to verify the association between sleep quality and polymorphisms of *AANAT*, *RORA*, and *TIMELESS* genes. An epidemiological survey was performed in a rural area in southern Brazil. 829 subjects were evaluated for sleep quality using the Pittsburgh Sleep Quality Index and sleep timing patterns using the Munich Chronotype Questionnaire. Work characteristics and psychiatric/cardiometabolic symptoms were assessed using a structured self-report questionnaire. Three polymorphisms of *AANAT*, *RORA*, and *TIMELESS* (rs3760138, rs782931, and rs774045 respectively) were genotyped in blood samples. We found statistically significant associations of poor sleep quality with self-reported psychiatric symptoms (B= 0.382; 95% CI 0.289 – 0.476; adjusted *p*-value <0.001) and with self-reported cardiometabolic symptoms (B= 0.079; 95% CI 0.013 – 0.151; adjusted *p*-value= 0.048). The genetic analysis showed that *RORA* GA/AA genotype was associated to poor sleep quality (B= 0.146, 95%CI 0.054 – 0.239; adjusted *p*-value= 0.004). No moderated mediation effects were observed in the conditional analysis. *TIMELESS* polymorphism was not included in the analysis due to the low frequency of risk genotypes. These results yield new insights regarding the interrelationship between sleep characteristics and psychiatric/cardiometabolic self-reported symptoms, taking into account genes related to the biological clocks and melatonin pathways.

Keywords: Biological Rhythms, Circadian Rhythm, Chronobiology, Genetics, *AANAT*, *RORA*.

INTRODUCTION

Poor sleep associates with worse quality of life (Lo & Lee, 2012), correlates with cardiometabolic diseases (Kline et al., 2018; Okubo et al., 2014; Xi et al., 2014), and may predict susceptibility to psychopathological processes (Hertenstein et al., 2019). Psychiatric morbidity is highly prevalent in both developed and middle income regions, standing out among the top ten causes of years lived with disability in most of the countries (Vos et al., 2015). Likewise, cardiometabolic diseases are also of public health concern, as a leading cause of mortality worldwide (Barquera et al., 2015). Scientific research has increasingly indicated relevant influence of sleep behaviors in both of these pathological groups.

Poor sleep occurs due to a variety of different mechanisms. To identify which factors contribute to this alteration, it is important to understand the biological circadian rhythm regulation process. Internal time processes interact with external time clues in many aspects, from the expression and activity of the clock genes observed in molecular and genetic levels, to daily sleep and activity patterns observed in behavioral levels (Etain et al., 2011; Hallam et al., 2005). Our molecular circadian rhythm regulation operates through a complex network of transcriptional-translational feedback loops and is composed by a specific group of specialized genes, the core clock genes. Throughout the circadian period, the transcription of the *PER* and *CRY* genes is indirectly activated by the CLOCK/NPAS transcription factors through interaction with *BMAL1*, and is regulated by the resulting PER and CRY proteins themselves by a negative feedback loop. Subsequently, the PER-CRY proteins are degraded and allow the CLOCK-BMAL1 complex to activate gene transcription again.

In addition, several other genes seem to have relevant roles regulating the expression of the core clock genes, such as *TIMELESS*, (Takahashi et al., 2008), *RORA* (Dardente & Cermakian, 2007), and *AANAT* (Chen & Baler, 2000). The two main enzymes responsible for the conversion of serotonin to its final product melatonin are the Acetylserotonin O-methyltransferase (ASMT) and the Arylalkylamine N-acetyltransferase (AANAT), which, in turn, seem to have their activity also influenced by the circulating pineal melatonin (Axelrod & Weissbach, 1960; Coelho et al., 2015; Coon et al., 1995). The interaction between melatonin and proteasome is necessary to adjust the internal rhythm to the changes in the environmental photoperiod. Furthermore, melatonin is postulated to interfere and regulate the feedback mechanisms described above, especially at night, since

the absence of light is needed to promote its pineal production (Vriend & Reiter, 2015). Thus, environmental characteristics, such as urbanicity and light pollution, also impact circadian rhythms regulation (Beijamini et al., 2016; Pilz et al., 2018).

Sleep timing seems to play a key role in the relationship between poor sleep and health outcomes. Interesting results regarding melatonin beneficial effects on endothelial oxidative stress-related processes (Strohmaier et al., 2018), but adverse on insulin secretion and serum glucose regulation (Tan et al., 2018) suggest a possible circadian system component on cardiometabolic disease development. Apart from being a key component in melatonin synthesis, an experimental study suggests that *AANAT* may also play a role in regulating *BMALI* expression (Chen & Baler, 2000). Thus, the association of mood disorders and sleep characteristics with the polymorphisms rs782931 *RORA*, rs774045 *TIMELESS* (Etain et al., 2014), and rs3760138 *AANAT* (Soria et al., 2010), and the similar activities of *AANAT* and *RORA* on core clock genes expression (Dardente & Cermakian, 2007), possibly indicates an intersection between sleep-wake rhythms molecular and behavioral regulation and mood alterations. Several studies in humans show positive results between polymorphisms of genes involved in biological rhythms regulation and sleep disturbances, with most of the findings centered in the core clock genes. On the other hand, fewer studies with other candidate genes, such as the ones aforementioned, explored their role in sleep alterations, and this is still an important area to be better investigated.

Aims of the study: While the association between poor sleep and negative health outcomes is well established, an in-depth understanding of if sleep timing plays a major role in this relationship is unclear. Thus, this study aims to verify (1) if psychiatric/cardiometabolic self-reported symptoms associate independently with sleep quality and sleep timing, or if there is an indirect effect (mediation) of sleep timing on the relationship between psychiatric/cardiometabolic self-reported symptoms and sleep quality; and (2) if there is an interaction of these variables with rural/urban environment in work activities – a moderated-mediation/conditional model (Hayes, 2013). Additionally, a complementary model in a subsample aims to verify (3) if three polymorphisms of the molecular clocks and melatonin synthesis pathway-related genes (*RORA*, *TIMELESS*, and *AANAT*) associate with sleep quality and sleep timing patterns. The models are depicted in Figure 1.

METHODS

1.1. Participants

The participants were from a rural area of southern Brazil (Vale do Taquari), where most of the residents are of German and Italian descent (Carvalho et al., 2014). As part of a larger epidemiological survey, our initial sample was composed of 6506 participants. Block randomization was executed to balance the same proportion of subjects for early, intermediate, and late chronotypes in the sample, so that extreme and intermediate groups could be compared appropriately, resulting in 1127 participants. The participants with missing/contradictory data were excluded ($n=298$). The moderated-mediation analysis (i.e. conditional analysis) was performed with a total sample of 829 participants (67.7% female; median age of 45, range 18 – 65 years old), 660 with complete data related to psychiatric self-declared symptoms, and 800 to cardiometabolic self-declared symptoms. The complementary analysis included blood samples from 552 participants which proceeded to genetic analysis (65.6% female; median age of 45, range 18–65 years old). Figure 2 shows a flowchart depicting the detailed study protocol.

The three main occupational activities observed were Agriculture (49.6%), Unskilled/Semi-skilled services (36.1%), and Industry (5.8%). Unskilled/Semi-skilled services included mostly General services assistance (155 participants) and Household tasks (140 participants), Sales (30 participants – 4.5%) included Salesman and Businessmen activities, and Skilled services (16 participants – 2.4%) included Teaching, Health care workers, Police officers, and Lawyers. Supplementary occupational data is shown in Table S1 (supplementary materials). It is noteworthy that 633 (77.3%) individuals work 6 or more days/week. Therefore, only working days sleep timing data was used for the analyses. Conditional analysis sample characteristics are shown in Table 1, and genetic analysis sample characteristics are shown in Table S2 (supplementary materials).

The experimental protocol followed international ethical standards (Portaluppi et al., 2010). The Ethics Review Board at Hospital de Clínicas de Porto Alegre approved the study protocol (Project 15-0459 GPPG/HCPA), and all participants gave written informed consent.

1.2. Study design and measurements

This is a cross-sectional study. All the participants were evaluated in their homes by trained interviewers. The psychiatric and cardiometabolic symptoms were measured through a structured self-report questionnaire and BMI data. The Pittsburgh Sleep Quality Index (PSQI) was administered for evaluation of the quality of sleep, and the Munich Chronotype Questionnaire (MCTQ) for assessment of sleep timing patterns. Demographic data and work characteristics, such as if in a rural or urban environment, were also recorded.

1.3. Psychiatric and Cardiometabolic symptoms

The participants were asked to declare “Yes”, “No”, or “Not sure” to current diagnosis or symptoms in the last month from a list of diseases and general symptoms. This form included 10 disease-related items and 12 general signs/symptoms. The psychiatric self-declared symptoms variable was codified as 1 (Yes) to positive answers for depression or anxiety, and as 0 (No) to negative answers in both these items. The cardiometabolic self-declared symptoms variable was considered as 1 (Yes) to positive answers for diabetes, heart disease, or hypertension, or BMI of 30kg/m² or more, and as 0 (No) to negative answers in the same items and BMI of less than 30kg/m². In the present analysis, “Not sure” answers were considered as missing data. Cardiometabolic and Psychiatric total self-reported symptoms are detailed in Table S3 (supplementary materials).

1.4. Sleep Quality

The Pittsburgh Sleep Quality Index (PSQI) is a self-reported questionnaire which evaluates sleep quality over the past month. This instrument is composed of 19 items, assessing 7 different components of sleep: (1) subjective sleep quality, (2) sleep latency, (3) sleep duration, (4) habitual sleep efficiency, (5) sleep disturbances, (6) use of sleeping medication, and (7) daytime function (Buysse et al., 1989). The score of each component was rated from 0 to 3. The global PSQI score ranges from 0 to 21 points and usually is calculated by the sum of these component scores, with global scores greater than 5 points meaning poor sleep quality. To make sure that the association between sleep quality and MCTQ-derived variables were not due to similar data measures, as MCTQ sleep timing parameters were included in a different variable in the conditional analyses, sleep timing-related components from PSQI instrument (components 2, 3, and 4) were suppressed from the PSQI score sum. Thus, the PSQI total score was used as a continuous variable obtained from the sum of components 1, 5, 6, and 7, a methodological approach successfully applied

in previous studies (Pilz et al., 2018). A validated version of PSQI for Brazilian Portuguese was used in this study (Bertolazi et al., 2011).

1.5. MCTQ-derived variables – Sleep timing patterns

The Munich Chronotype Questionnaire (MCTQ) is a self-administered structured questionnaire used to collect information on sleep-wake habits and sunlight exposure separately on free and working days. This questionnaire retrieves information regarding the following sleeping characteristics: bedtime, sleep latency, sleep onset, sleep duration, wake-up time, fully awake time, and the midpoint of sleep (which is calculated by dividing the sleep duration by two and adding the resulting number to the sleep onset time). Since the sample was composed mainly of subjects working six and seven days/week, work-free day variables were not considered for this analysis. The MCTQ-derived variable ‘midpoint of sleep in working days’ was used as the sleep timing measure for all the participants. A Brazilian-Portuguese version of the MCTQ was used (<http://www.euclock.org/>).

1.6. Genotyping

Samples of 5 mL of whole blood were collected in EDTA tubes. DNA was extracted by standard salting out method (S.A.Miller, 1988) and quantified with Nanodrop 1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The concentration of DNA used was 50ng/μL. Three polymorphisms of *AANAT* (rs3760138), *RORA* (rs782931) and *TIMELESS* (rs774045) genes were genotyped with TaqMan SNP genotyping assays (Applied Biosystems, CA, USA; catalog number #4351376, #4351376, and #4351376 respectively) according to the manufacturer protocol for TaqMan allelic discrimination system (StepOne Real-Time PCR Systems, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Reactions were performed in 48-wells plates using 1μL of DNA and the standard protocol of temperature cycling was followed. The genotypes were identified by the analysis of the amplification plot generated by the equipment’s software.

1.7. Statistical analysis

Sample categorical variables were expressed as the number of cases (n) and percentages (%), while continuous variables were expressed as medians (range), or means (95% confidence interval) estimated through bias-corrected and accelerated (BCa) bootstrap technique with 10000 samples. Shapiro-Wilk tests assessed the normality of data. Between-group comparisons of continuous variables were performed by Mann-Whitney U

tests, while Chi-square tests were employed for comparisons of categorical variables. To evaluate moderated mediation effects, two conditional analysis models were performed considering the outcomes psychiatric (Model 1) and cardiometabolic (Model 2) self-reported symptoms. Both the models were adjusted for covariates sex and age. The conditional analysis was carried out as described by Hayes (Hayes, 2013).

In the complementary genetic analysis, genotype distribution was tested for Hardy–Weinberg equilibrium and compared to allele frequencies of a similar population and to a general population according to Genome Aggregation Database – European non-Finnish (N=33,370) and total populations (N=60,706) (Lek et al., 2016). Scores of the PSQI components were dichotomized as 0 to 1 vs 2 to 3 when analyzed in the univariate analysis. Because PSQI total score and Midpoint of sleep values were right-skewed, a generalized linear model (GZLM) with gamma distribution and log link was used to evaluate the association between genotypes and outcomes, adjusting for sex and age. The association was estimated by the adjusted regression coefficient B and respective 95% confidence interval (95% CI). A constant (1) was added to the scores of the outcomes to allow for the observed zero values to be used in a gamma distribution. Although not commonly used in genetic studies, GZLM yield analyses using more adequate statistical modeling of skewed data without the need of previous log-transformations and enable comparisons between estimated averages in the original scale of the dependent variables.

AANAT polymorphism entered the statistical model as a variable with two states: T-carriers (TT or GT genotypes) or GG. The decision was based on a published association of GT/TT genotypes with worse mental health outcomes (Soria et al., 2010), as well as on no suggestion of a dose-effect of the number of alleles on the outcome averages, in our data. As for the *RORA* gene, AA individuals were grouped with GA due to the low frequency of AA.

The significance level was 0.05 in all tests; *p*-values were adjusted for the number of tests made in the polymorphisms analyses. The analyses were performed using IBM Statistical Package for the Social Sciences (SPSS), version 18.

RESULTS

Table 2 shows descriptive data and univariate analysis of demographic and sleep characteristics comparing individuals with and without psychiatric and cardiometabolic self-reported symptoms. Age and sex differed between groups, supporting further adjustments for these variables. Midpoint of sleep, PSQI score, and Work environment differed between individuals with and without cardiometabolic self-reported symptoms, but only PSQI score was different in groups with or without psychiatric self-reported symptoms.

Table 3 describes the conditional analysis models for psychiatric and cardiometabolic self-reported symptoms as the main outcomes. Both the models considered sleep quality as the independent variable, sleep timing as the mediator, and urban vs rural work environment as the moderator. Sleep quality was directly associated with the outcomes in both models (Psychiatric self-reported symptoms: $B = 0.382$, 95%CI 0.289 – 0.476, p -value < 0.001, adjusted p -value < 0.001; Cardiometabolic self-reported symptoms: $B = 0.079$, 95%CI 0.013 – 0.151; p -value = 0.024, adjusted p -value = 0.048). In both models, no conditional effects were observed, with no significant mediation effects through sleep timing (Psychiatric self-reported symptoms: Bootstrap 95% CI -0.021 – 0.022; Cardiometabolic self-reported symptoms: Bootstrap 95% CI -0.010 – 0.025), and no significant moderation effect through Work environment (Psychiatric self-reported symptoms: Interaction between PSQI and Work environment p -value = 0.450; Cardiometabolic self-reported symptoms: Interaction between PSQI and Work environment p -value = 0.641).

The genotype distribution of the sample (Table S2) was in Hardy–Weinberg equilibrium for all polymorphisms (AANAT: $X^2(1) = 2.173$, $p = 0.140$; RORA: $X^2(1) = 0.376$, $p = 0.540$; TIMELESS: $X^2(1) = 0.291$, $p = 0.590$). The allele frequencies of the sample, comparatively to allele frequencies of European non-Finnish and total populations (Lek et al., 2016), are shown in Table S5 (supplementary materials). Table S4 (supplementary materials) shows descriptive data for polymorphism data and univariate analysis of association with sleep quality and sleep timing patterns. We observed association between AANAT polymorphism and Midpoint of sleep only ($p = 0.036$); associations of the other genetic markers and sleep characteristics were not statistically significant. Table S6 (supplementary materials) shows the association analysis between genetic characteristics and PSQI components 1, 5, 6, and 7. We observed statistically

significant association between *AANAT* polymorphism and PSQI C1 (subjective sleep quality), and between *RORA* genotypes and PSQI C7 (day time dysfunction).

Table 4 describes the analyses of association of *AANAT* and *RORA* polymorphisms with sleep quality and sleep timing patterns. *AANAT* GT/TT and *RORA* GA/AA genotypes effects were estimated in separate models using *AANAT* GG and *RORA* GG as reference genotypes respectively, and adjusting for sex and age. We observed a significant association of *RORA* GA/AA genotype with PSQI score (B= 0.146, 95%CI 0.054 – 0.239; p -value= 0.002; adjusted p -value= 0.008). All other associations were not statistically significant (p -value> 0.5)

Figure 3 shows the final statistical diagram, describing the relationship among genetic polymorphisms, sleep characteristics, and psychiatric/cardiometabolic self-declared symptoms. The full lines represent significant associations, and the dashed lines non-significant associations. B values correspond to the statistically significant unstandardized regression coefficients. Sleep quality associates independently with the self-declared symptoms. Midpoint of sleep does not seem to be a mediator in this association, and rural vs urban work environment does not seem to moderate the pathways analyzed. Also, *RORA* A allele associates to poor sleep quality.

DISCUSSION

Main findings

To the best of our knowledge, this is the first study that evaluates conditional effects among psychiatric and cardiometabolic self-declared symptoms, sleep quality, sleep timing, and urban vs rural work environment. Furthermore, this is also the first study with a complimentary analysis of association between sleep parameters and polymorphisms of *AANAT* and *RORA* genes. Our main findings suggest: (I) poor sleep quality is directly and independently correlated with psychiatric and cardiometabolic self-declared symptoms, since no indirect effect through sleep timing patterns in working days is observed in mediation analysis; (II) the association between sleep quality and psychiatric/cardiometabolic self-declared symptoms behaves similarly in both urban and rural workers groups, since no interaction with the work environment is observed in the

moderation analysis; (III) the presence of A allele in rs782931 *RORA* polymorphism is associated with worse sleep quality.

Psychiatric self-reported symptoms

The association between psychiatric self-reported symptoms and sleep quality is an expected finding and replicates similar results recently published (Hertenstein et al., 2019; Tonon et al., 2019). Considering the components included in the PSQI score – subjective sleep quality (1), sleep disturbances (5), use of sleep medication (6), and daytime dysfunction (7), all of them showed significantly higher proportions of psychiatric self-reported symptoms in poor sleep quality (scores 2 and 3) when compared to good sleep quality (scores 0 and 1) groups (Figure S1, supplemental materials). This finding suggests that, even with no time related components (sleep latency, sleep duration, and habitual sleep efficiency), sleep quality still associates to psychiatric morbidity. Taking into account each of the components separately, all of them may behave both as risk factors and as symptoms in a current psychiatric disorder, but because this is a cross-sectional study, no causal inferences are possible.

The conditional analyses performed in this study bring insights regarding the pathways of sleep timing patterns and urban vs rural work environment in the relationship between sleep quality and self-reported psychiatric symptoms (findings I and II). Even though rural and urban work environment groups presented significant sleep timing differences (Figure S2, supplementary materials), implying diverse light exposure and circadian synchronization between these populations, sleep quality associated independently with self-reported psychiatric symptoms, a finding that differs from previous hypotheses (Karatsoreos, 2014). In the path diagram, although no mediation effect of Midpoint of sleep was detected, we could observe that poor sleep quality associates to later sleep timing. It remains uncertain if there is a causal relationship in this finding. Yet, the association was observed in expected ways if compared to the excluded sleep quality components, since later sleep timing patterns in work days predictably correlate to longer sleep latency, shorter sleep duration, and a worse sleep efficacy. The work schedule pattern of this sample, with most of participants working 6 to 7 days/week, creates an uncommon sample characteristic, since there are no free days during the week to most of them. The

small number of participants with fewer working days hinders a deeper evaluation of this phenomenon on the main findings.

Cardiometabolic self-reported symptoms

The results related to cardiometabolic self-reported symptoms show similar findings to the ones in psychiatric morbidity. Sleep quality associates directly and independently with self-declared cardiometabolic symptomatology, replicating previous findings (Kline et al., 2018; Okubo et al., 2014; Xi et al., 2014). Among the PSQI components included to measure the sleep quality score, sleep disturbances and use of sleep medication showed significant higher rates of self-reported symptoms in the poor sleep quality group when compared to good sleep quality (Figure S1, supplemental materials). A previous study showed an extremely high prevalence of Obstructive Sleep Apnea Syndrome (OSAS), reaching 32.9% in a representative sample of the Brazilian population (Tufik et al., 2010). Obese populations present an odds ratio of 10.5 for OSAS in comparison to regular weight (Tufik et al., 2010). Many of the parameters evaluated in the sleep disturbances component are altered in OSAS, and, since $BMI > 30 \text{ kg/m}^2$ was one of the characteristics considered for this outcome, a higher prevalence of OSAS would be a possible explanation for this result.

Regarding the mediation and moderation analysis, differently from recent reviews, the relationship of cardiometabolic self-reported symptoms with sleep timing patterns was not observed in our sample (Crnko et al., 2014). Further research comparing samples with a wider diversity between the number of work and free days would help to clarify the possible influence of work regularity and social jet lag on sleep quality and cardiometabolic self-reported symptoms.

AANAT and RORA polymorphisms

In the analysis of polymorphisms, the observed allele frequencies were similar to those in European non-Finnish population, and different from the global total population (which includes African, Latino, European (Finnish), Ashkenazi Jewish, East Asian, South Asian and Other) according to gnomAD (Table S5, supplementary materials). This finding

is not unexpected and is compatible with reduced admixture in the sample (as it is composed mainly of individuals of Italian and German descent).

Regarding the findings related to the presence of rs782931 *RORA* A allele, the intronic position of the SNP speaks against a direct association of the polymorphism with changes in the transcriptional process of the *RORA* protein. A plausible reason may be its linkage disequilibrium to another determinant etiological SNP. Nevertheless, alternative splice using cryptic splice sites (Kurmangaliyev et al., 2013) or interaction with ncRNA cannot be discarded (Moszyńska et al., 2017). There is a previous study describing the association of different SNPs of *RORA* with sleep disturbances similar to our findings (Kripke et al., 2015). In another previous study, the same SNP is associated with bipolar disorder (BD) and chronotype characteristics, findings that may be related to diminished habitual sleep efficiency (Etain et al., 2014). Such new findings need replication and investigation in further research to better elucidate the possible effect of this polymorphism on sleep disturbances, and its interaction with sex.

The rs3760138 *AANAT* TT genotype is located in the promoter region of the gene, and its role regarding sleep disturbances remains unclear. The lack of association between this SNP and sleep quality or sleep timing patterns suggests that its relationship to depressive symptoms (Soria et al., 2010) may be part of different pathophysiological mechanisms. There are no results in biomedical literature specifically indicating a correlation between this SNP and sleep disorders. However, its association with mood disorders involves pathways common to insomnia and diverse sleep disturbances.

Although previous studies in literature showed relevant associations of SNPs of *TIMELESS* gene with sleep disturbances and interaction with sex differences (Utge et al., 2010), the low frequency of the rs774045 A allele in our sample precluded multivariate statistical procedures and may be also responsible for not observing association with sleep characteristics in our study.

Strengths and weaknesses: Although a correlation with clinical data is expected, the self-reported feature regarding psychiatric and cardiometabolic symptoms is a limitation in this study and should be interpreted with caution. The high frequency of 6 – 7 days/week workers may misrepresent sleep timing patterns and chronodisruption effects from general populations, and this is a possible limitation of this study. On the other hand, this study

reproduces reliable findings regarding the interaction between sleep timing in working days and work environment characteristics. Another possible limitation is that the SNPs were chosen based on previous association studies, without established functional impact on gene function and sleep, however by the time the study design was planned and developed, GWAS results related to chronotypology were not as clear as some recent achievements published (Lane et al., 2017).

Conclusion: This study is a pioneering initiative to understand the relationship between sleep characteristics and self-reported psychiatric/cardiometabolic symptoms, taking into account genes related to the biological clocks and melatonin pathways. In sum, the analyses show that the association between sleep quality and self-reported psychiatric and cardiometabolic symptoms is independent, with no mediation effect by sleep timing, neither moderation by urban or rural work environment; we also observed that the presence of A allele in rs782931 *RORA* polymorphism is associated with worse sleep quality. Our results show new insights regarding the relationship between psychiatric/cardiometabolic symptoms and sleep disturbances associated with polymorphisms in genes related to melatonin pathway and the biological clock.

Acknowledgments: The authors wish to acknowledge Dr. Camila Morelato de Souza for her valuable contributions in this project, and the students Livia Lopez Torres and Juliana Jury Freitas for the assistance in the laboratory procedures.

Disclosure Statement: The project received financial support from the “Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos” (FIPE/HCPA – GPPG 15-0459), “Fundação de Amparo à pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul” (FAPERGS), “Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico” (CNPq), PROBRAL – CAPES/DAAD, and Programa Nacional de Pós-Doutorado (PNPD – CAPES). The funders had no role in study design, data collection, and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. Hidalgo MP has received funding from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). The authors declare that they have no conflicts of interest.

REFERENCES

- Axelrod, J., & Weissbach, H. (1960). Enzymatic O-methylation of N-acetylserotonin to melatonin. *Science*, 131(3409), 1312. <https://doi.org/10.1126/science.131.3409.1312>
- Barquera, S., Pedroza-Tobías, A., Medina, C., Hernández-Barrera, L., Bibbins-Domingo, K., Lozano, R., & Moran, A. E. (2015). Global Overview of the Epidemiology of Atherosclerotic Cardiovascular Disease. *Archives of Medical Research*, 46(5), 328–338. <https://doi.org/10.1016/J.ARCMED.2015.06.006>
- Beijamini, F., Knutson, K. L., Lorenzi-Filho, G., Egan, K. J., Taporoski, T. P., De Paula, L. K. G., ... von Schantz, M. (2016). Timing and quality of sleep in a rural Brazilian family-based cohort, the Baependi Heart Study. *Scientific Reports*, 6, 39283. <https://doi.org/10.1038/srep39283>
- Bertolazi, A. N., Fagondes, S. C., Hoff, L. S., Dartora, E. G., da Silva Miozzo, I. C., de Barba, M. E. F., & Menna Barreto, S. S. (2011). Validation of the Brazilian Portuguese version of the Pittsburgh Sleep Quality Index. *Sleep Medicine*, 12(1), 70–75. <https://doi.org/10.1016/j.sleep.2010.04.020>
- Buysse, D. J., Reynolds, C. F., Monk, T. H., Berman, S. R., & Kupfer, D. J. (1989). The Pittsburgh sleep quality index: A new instrument for psychiatric practice and research. *Psychiatry Research*, 28(2), 193–213. [https://doi.org/10.1016/0165-1781\(89\)90047-4](https://doi.org/10.1016/0165-1781(89)90047-4)
- Carvalho, F. G., Hidalgo, M. P., & Levandovski, R. (2014). Differences in circadian patterns between rural and urban populations: An epidemiological study in countryside. *Chronobiology International*, 31(3), 442–449. <https://doi.org/10.3109/07420528.2013.846350>
- Chen, W., & Baler, R. (2000). The rat arylalkylamine N-acetyltransferase E-box: differential use in a master vs. a slave oscillator. *Brain Research. Molecular Brain Research*, 81(1–2), 43–50. [https://doi.org/10.1016/s0169-328x\(00\)00160-1](https://doi.org/10.1016/s0169-328x(00)00160-1)
- Coelho, L. A., Peres, R., Amaral, F. G., Reiter, R. J., & Cipolla-Neto, J. (2015). Daily differential expression of melatonin-related genes and clock genes in rat cumulus-oocyte complex: Changes after pinealectomy. *Journal of Pineal Research*, 58(4), 490–499. <https://doi.org/10.1111/jpi.12234>
- Coon, S. L., Roseboom, P. H., Baler, R., Weller, J. L., Namboodiri, M. A. A., Koonin, E. V., & Klein, D. C. (1995). Pineal serotonin N-acetyltransferase: Expression cloning and molecular analysis. *Science*, 270(5242), 1681–1683. <https://doi.org/10.1126/science.270.5242.1681>

- Crnko, S., Du Pré, B. C., Sluijter, J. P. G., & Van Laake, L. W. (2019). Circadian rhythms and the molecular clock in cardiovascular biology and disease. *Nature Reviews Cardiology*, 16(7), 437–447. <https://doi.org/10.1038/s41569-019-0167-4>
- Dardente, H., & Cermakian, N. (2007). Molecular circadian rhythms in central and peripheral clocks in mammals. *Chronobiology International*, 24(2), 195–213. <https://doi.org/10.1080/07420520701283693>
- Etain, B., Jamain, S., Milhiet, V., Lajnef, M., Boudebessé, C., Dumaine, A., ... Bellivier, F. (2014). Association between circadian genes, bipolar disorders and chronotypes. *Chronobiology International*, 31(7), 807–814. <https://doi.org/10.3109/07420528.2014.906445>
- Etain, B., Milhiet, V., Bellivier, F., & Leboyer, M. (2011). Genetics of circadian rhythms and mood spectrum disorders. *European Neuropsychopharmacology*, 21(SUPPL.4), S676–S682. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2011.07.007>
- Gamble, K. L., Berry, R., Frank, S. J., & Young, M. E. (2014). Circadian clock control of endocrine factors. *Nature Reviews Endocrinology*, 10, 466. Retrieved from <https://doi.org/10.1038/nrendo.2014.78>
- Hallam, K. T., Olver, J. S., & Norman, T. R. (2005). Effect of sodium valproate on nocturnal melatonin sensitivity to light in healthy volunteers. *Neuropsychopharmacology*, 30(7), 1400–1404. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300739>
- Hayes, A. F. (2013). Introduction to mediation, moderation, and conditional process analysis: A regression-based approach. *Introduction to mediation, moderation, and conditional process analysis: A regression-based approach*. New York, NY, US: Guilford Press.
- Hertenstein, E., Feige, B., Gmeiner, T., Kienzler, C., Spiegelhalder, K., Johann, A., ... Baglioni, C. (2019). Insomnia as a predictor of mental disorders: A systematic review and meta-analysis. *Sleep Medicine Reviews*, 43, 96–105. <https://doi.org/10.1016/j.smrv.2018.10.006>
- Karatsoreos, I. N. (2014). Links between Circadian Rhythms and Psychiatric Disease. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 8(MAY). <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2014.00162>
- Kline, C. E., Hall, M. H., Buysse, D. J., Earnest, C. P., & Church, T. S. (2018). Poor Sleep Quality is Associated with Insulin Resistance in Postmenopausal Women with and Without Metabolic Syndrome. *Metabolic Syndrome and Related Disorders*, 16(4), 183–189. <https://doi.org/10.1089/met.2018.0013>

- Kripke, D. F., Kline, L. E., Nievergelt, C. M., Murray, S. S., Shadan, F. F., Dawson, A., ... Hahn, E. K. (2015). Genetic variants associated with sleep disorders. *Sleep Medicine*, 16(2), 217–224. <https://doi.org/10.1016/j.sleep.2014.11.003>
- Kurmangaliyev, Y. Z., Sutormin, R. A., Naumenko, S. A., Bazykin, G. A., & Gelfand, M. S. (2013). Functional implications of splicing polymorphisms in the human genome. *Hum Mol Genet*, 22(17), 3449–3459. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddt200>
- Lane, J. M., Liang, J., Vlasac, I., Anderson, S. G., Bechtold, D. A., Bowden, J., ... Saxena, R. (2017). Genome-wide association analyses of sleep disturbance traits identify new loci and highlight shared genetics with neuropsychiatric and metabolic traits. *Nature Genetics*, 49(2), 274–281. <https://doi.org/10.1038/ng.3749>
- Lek, M., Karczewski, K. J., Minikel, E. V, Samocha, K. E., Banks, E., Fennell, T., ... Exome Aggregation Consortium. (2016). Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature*, 536(7616), 285–291. <https://doi.org/10.1038/nature19057>
- Lo, C. M. H., & Lee, P. H. (2012). Prevalence and impacts of poor sleep on quality of life and associated factors of good sleepers in a sample of older Chinese adults. *Health and Quality of Life Outcomes*, 10, 72. <https://doi.org/10.1186/1477-7525-10-72>
- Moszyńska, A., Gebert, M., Collawn, J. F., & Bartoszewski, R. (2017). SNPs in microRNA target sites and their potential role in human disease. *Open Biology*, 7(4), 170019. <https://doi.org/10.1098/rsob.170019>
- Okubo, N., Matsuzaka, M., Takahashi, I., Sawada, K., Sato, S., Akimoto, N., ... Nakaji, S. (2014). Relationship between self-reported sleep quality and metabolic syndrome in general population. *BMC Public Health*, 14(1), 562. <https://doi.org/10.1186/1471-2458-14-562>
- Pilz, L. K., Keller, L. K., Lenssen, D., & Roenneberg, T. (2018). Time to rethink sleep quality: PSQI scores reflect sleep quality on workdays. *Sleep*, 41(5). <https://doi.org/10.1093/sleep/zsy029>
- Pilz, L. K., Levandovski, R., Oliveira, M. A. B., Hidalgo, M. P., & Roenneberg, T. (2018). Sleep and light exposure across different levels of urbanisation in Brazilian communities. *Scientific Reports*, 8(1), 11389. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29494-4>
- Portaluppi, F., Smolensky, M. H., & Touitou, Y. (2010). Ethics and methods for biological rhythm research on animals and human beings. *Chronobiology International*, 27(9–10), 1911–1929. <https://doi.org/10.3109/07420528.2010.516381>

Romo-Nava, F., Buijs, F. N., Valdes-Tovar, M., Benitez-King, G., Basualdo, M., Perusquia, M., ... Buijs, R. M. (2017). Olanzapine-induced early cardiovascular effects are mediated by the biological clock and prevented by melatonin. *Journal of Pineal Research*, 62(4). <https://doi.org/10.1111/jpi.12402>

S.A.Miller, D. D. D. and H. F. P. (1988). A simple salting out procedure for extractin DNA from humam nnucleated cells. *Nucleic Acids Research*, 15(3), 1215.

Soria, V., Martínez-Amorós, È., Escaramís, G., Valero, J., Crespo, J. M., Gutiérrez-Zotes, A., ... Urretavizcaya, M. (2010). Resequencing and association analysis of arylalkylamine N-acetyltransferase (AANAT) gene and its contribution to major depression susceptibility. *Journal of Pineal Research*, 49(1), 35–44. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2010.00763.x>

Strohmaier, S., Devore, E. E., Zhang, Y., & Schernhammer, E. S. (2018). A Review of Data of Findings on Night Shift Work and the Development of DM and CVD Events: a Synthesis of the Proposed Molecular Mechanisms. *Current Diabetes Reports*, 18(12), 132. <https://doi.org/10.1007/s11892-018-1102-5>

Takahashi, J. S., Hong, H.-K. K., Ko, C. H., & McDearmon, E. L. (2008). The Genetics of Mammalian Circadian Order and Disorder: Implications for Physiology and Disease. *Nature Reviews. Genetics*, 9(10), 764–775. <https://doi.org/10.1038/nrg2430>

Tan, X., van Egmond, L., Chapman, C. D., Cedernaes, J., & Benedict, C. (2018). Aiding sleep in type 2 diabetes: therapeutic considerations. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*, 6(1), 60–68. [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(17\)30233-4](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(17)30233-4)

Tonon, A. C., Carissimi, A., Schmitt, R. L., de Lima, L. S., Pereira, F. dos S., Hidalgo, M. P., ... Hidalgo, M. P. (2019). How do stress, sleep quality, and chronotype associate with clinically significant depressive symptoms? A study of young male military recruits in compulsory service. *Brazilian Journal of Psychiatry, (AHEAD)*. <https://doi.org/10.1590/1516-4446-2018-0286>

Tufik, S., Santos-Silva, R., Taddei, J. A., & Bittencourt, L. R. A. (2010). Obstructive sleep apnea syndrome in the Sao Paulo Epidemiologic Sleep Study. *Sleep Medicine*, 11(5), 441–446. <https://doi.org/10.1016/j.sleep.2009.10.005>

Utge, S. J., Soronen, P., Loukola, A., Kronholm, E., Ollila, H. M., Pirkola, S., ... Paunio, T. (2010). Systematic analysis of circadian genes in a population-based sample reveals association of TIMELESS with depression and sleep disturbance. *PLoS ONE*, 5(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009259>

Vos, T., Barber, R. M., Bell, B., Bertozzi-Villa, A., Biryukov, S., Bolliger, I., ... Murray, C. J. L. (2015). Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 301 acute and chronic diseases and injuries in 188 countries, 1990-2013: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *The Lancet*, 386(9995), 743–800. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)60692-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)60692-4)

Vriend, J., & Reiter, R. J. (2015). Melatonin feedback on clock genes: A theory involving the proteasome. *Journal of Pineal Research*, 58(1), 1–11. <https://doi.org/10.1111/jpi.12189>

Xi, B., He, D., Zhang, M., Xue, J., & Zhou, D. (2014). Short sleep duration predicts risk of metabolic syndrome: A systematic review and meta-analysis. *Sleep Medicine Reviews*, 18(4), 293–297. <https://doi.org/10.1016/j.smrv.2013.06.001>

FIGURES

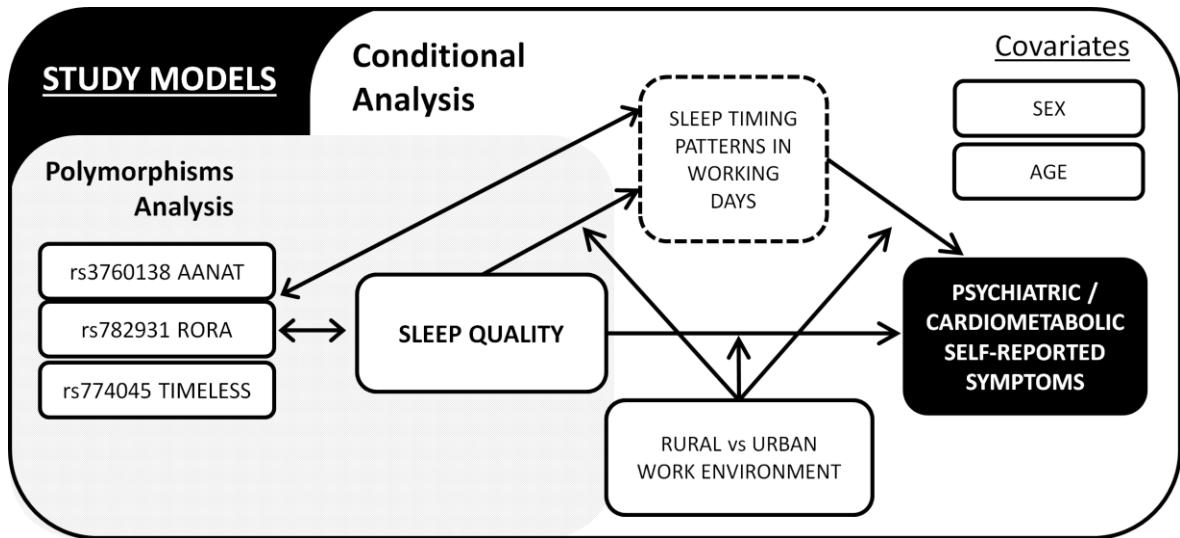


Figure 1 - Models of the study analysis.

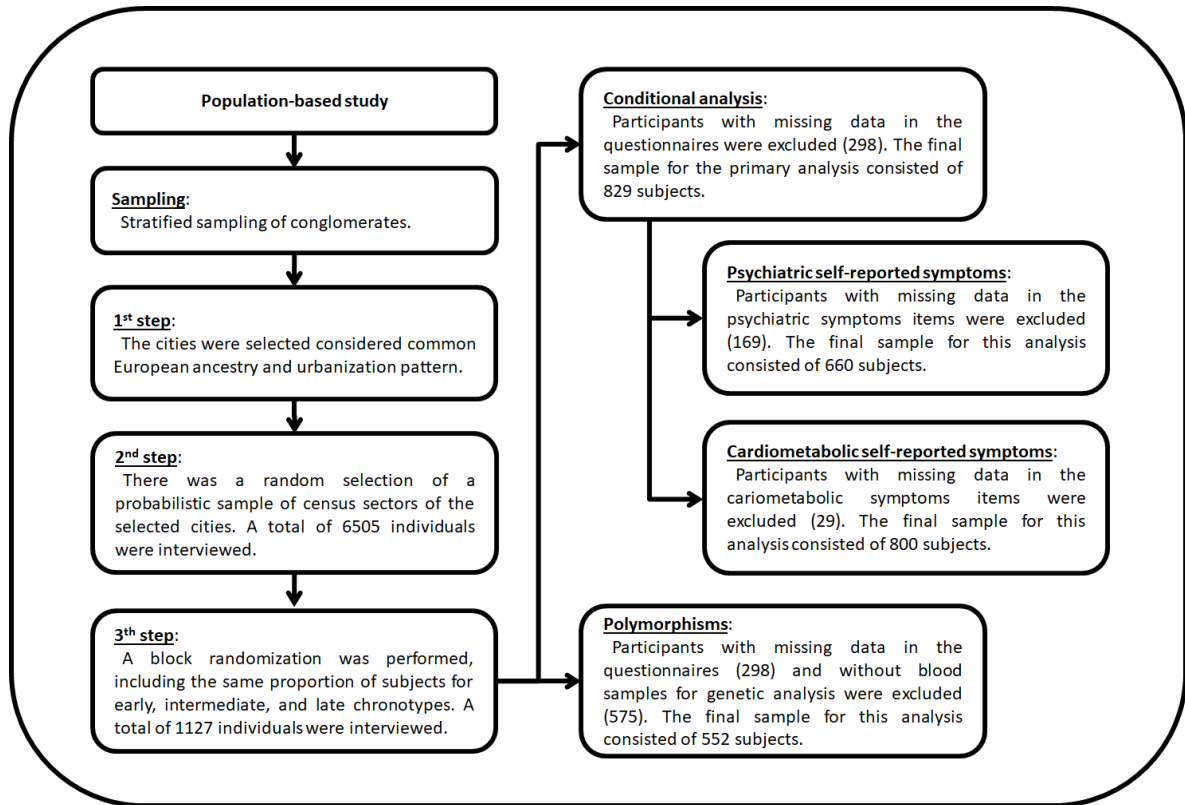


Figure 2 - Flowchart of the study protocol.

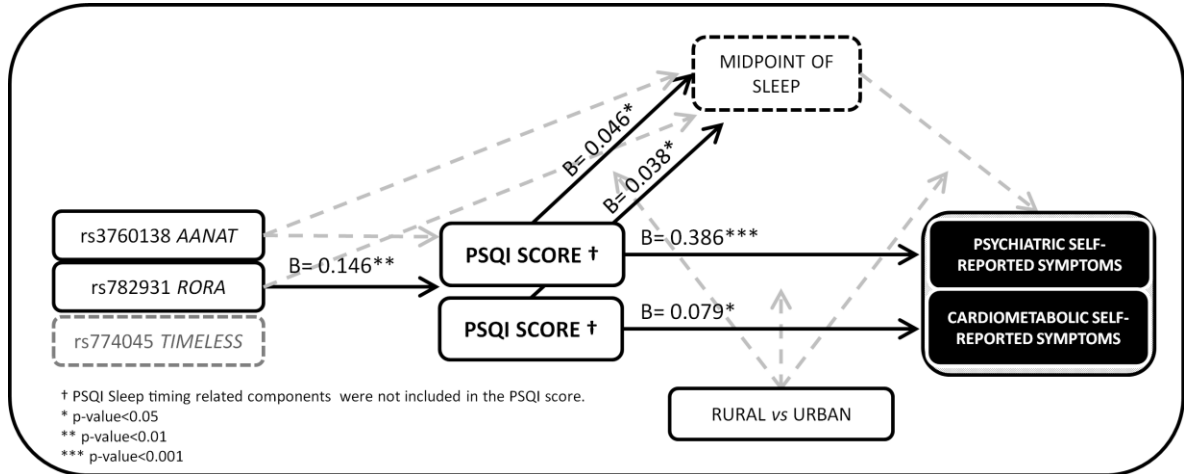


Figure 3 - Final statistical diagram. Full lines represent significant associations; dashed lines represent non-significant associations; B values correspond to statistically significant unstandardized regression coefficients.

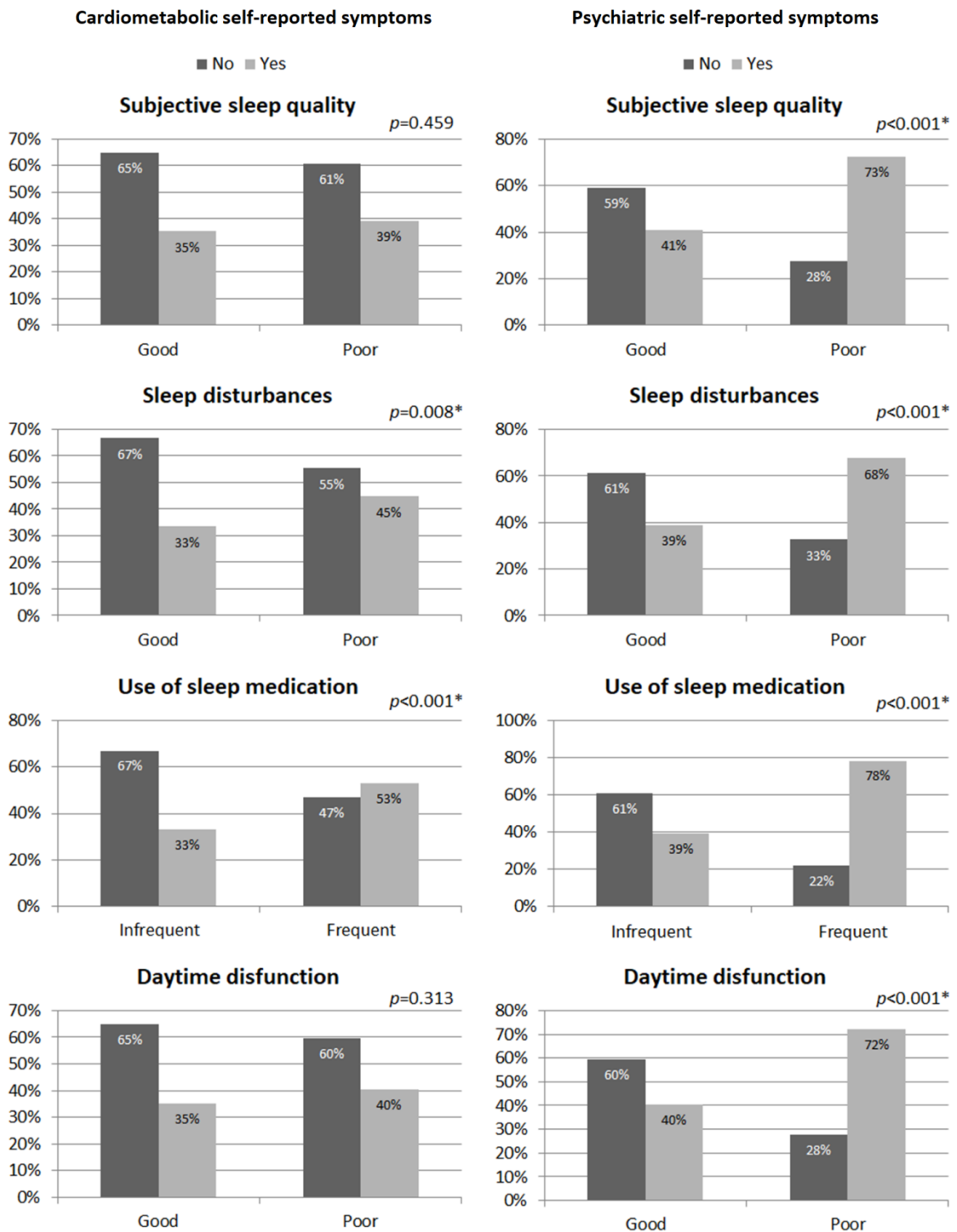


Figure S1 - Bivariate analysis between good and poor sleep quality for each of the PSQI components in Cardiometabolic self-reported symptoms and Psychiatric self-reported symptoms.

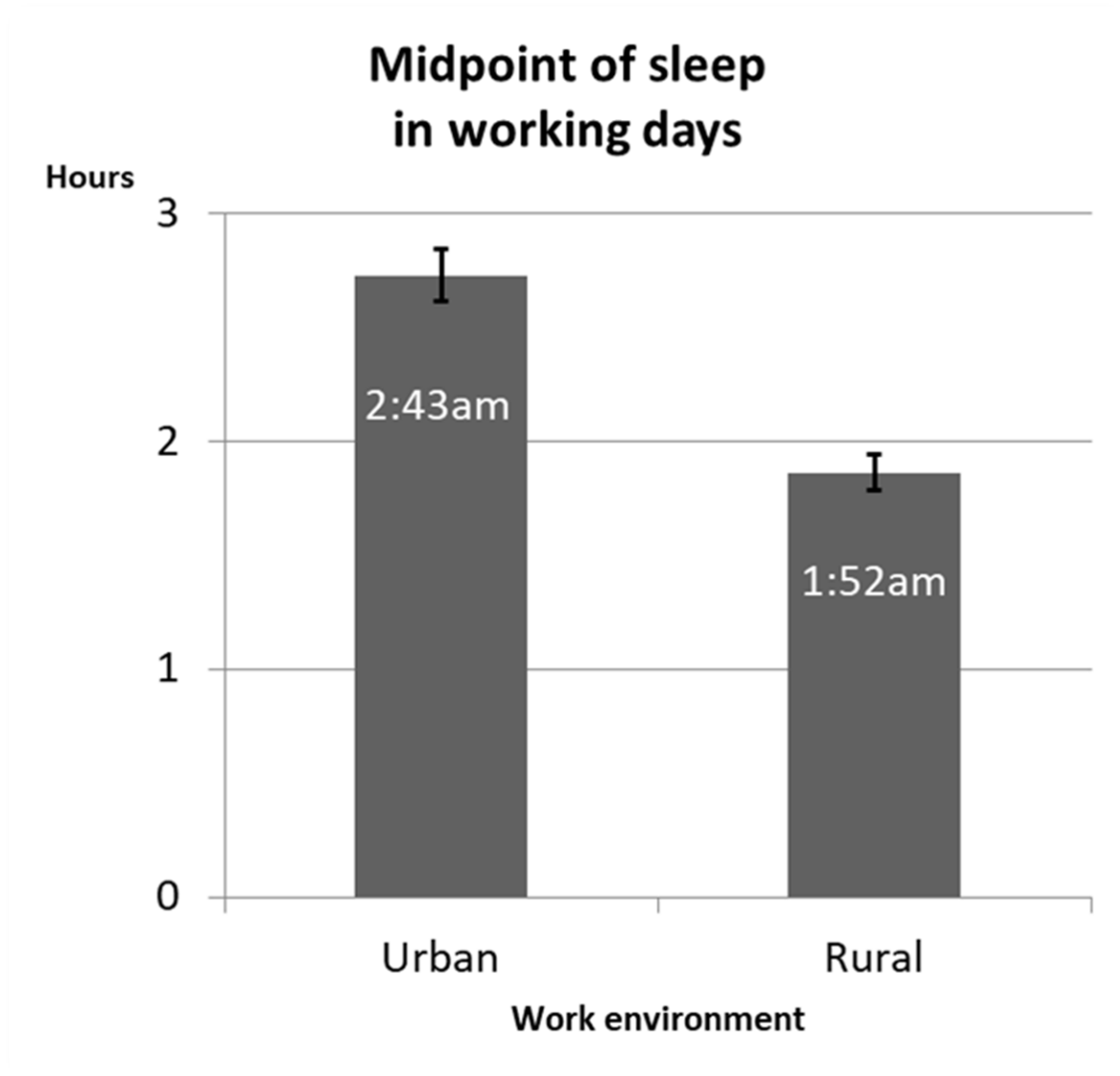


Figure S2 - Sleep timing differences between urban and rural work environment groups (N= 829).

TABLES

Table 1 - Descriptive demographic data (N= 829).

Sex	
	Men 268 (32.3%)
	Women 561 (67.7%)
Age	45 (18 - 65)
Midpoint of sleep	2:05am (11:50pm - 10:15am)
PSQI score†	1 (0 - 11)
Work environment	
	Rural 411 (49.6%)
	Urban 418 (50.4%)
Psychiatric self-reported symptoms	
	Declared Yes 292 (35.2%)
	Declared No 368 (44.4%)
	Not declared 169 (20.4%)
Cardiometabolic self-reported symptoms	
	Declared Yes 285 (34.4%)
	Declared No 515 (62.1%)
	Not declared 29 (3.5%)

Quantitative data: n (%) or median (range)

†PSQI sleep timing related components 2, 3, and 4 were not included in the PSQI score.

Table 2 - Comparison between individuals with and without psychiatric or cardiometabolic self-reported symptoms.

	Psychiatric self-reported symptoms (N=660)			Cardiometabolic self-reported symptoms (N=800)		
	Declared Yes	Declared No	<i>p-value</i>	Declared Yes	Declared No	<i>p-value</i>
	N (%) or Mean (95%CI)			N (%) or Mean (95%CI)		
Sex			<0.001			0.389
Men	65 (22.3%)	144 (39.1%)		97 (34%)	160 (31.1%)	
Women	227 (77.7%)	224 (60.9%)		188 (66%)	355 (68.9%)	
Age	42.80 (41.39 to 44.21)		0.410	48.71 (47.27 to 50.14)		<0.001
Midpoint of sleep	2:22am	2:15am	0.116	2:05am	2:25am	<0.001
	(2:14am to 2:30am)	(2:08am to 2:21am)		(1:58am to 2:12am)	(2:18am - 2:32am)	
PSQI score†	3.20 (2.90 to 3.50)	1.66 (1.51 to 1.82)	<0.001	2.75 (2.44 to 3.06)	2.11 (1.91 to 2.30)	<0.001
Work environment			0.101			<0.001
Rural	132 (45.2%)	190 (51.6%)		166 (58.2%)	230 (44.7%)	
Urban	160 (54.8%)	178 (48.4%)		119 (41.8%)	285 (55.3%)	

Mean (95%CI) data estimated through BCa bootstrap technique with 10000 samples.

Univariate analysis: Sex and Work environment - Chi-square; Age, Midpoint of sleep and PSQI score - Mann-Whitney.

†PSQI sleep timing related components 2, 3, and 4 were not included in the PSQI score.

Table 3 - Conditional direct and indirect effects of sleep quality on Psychiatric and Cardiometabolic self-reported symptoms according to Urban vs Rural work environment.

Model	Moderator	IV effect		IV effect <i>p</i> -value	Conditional effect <i>p</i> -value
		B	95% CI		
Outcome:	Total effect		0.382	0.289 to 0.476	<0.001
Psychiatric self-reported symptoms N= 660 R ² McFadden = 0.118*	Conditional direct effect	Urban	0.351	0.229 to 0.472	<0.001
		Rural	0.423	0.278 to 0.568	<0.001
	Conditional indirect effect	Urban	0.000	-0.011 to 0.008	
		Rural	0.001	-0.020 to 0.021	
Outcome:	Total effect		0.079	0.013 to 0.151	0.024
Cardiometabolic self-reported symptoms N= 800 R ² McFadden = 0.097*	Conditional direct effect	Urban	0.096	0.000 to 0.191	0.050
		Rural	0.063	-0.036 to 0.162	0.212
	Conditional indirect effect	Urban	-0.004	-0.021 to 0.001	
		Rural	0.001	-0.012 to 0.016	

Both the models included PSQI score† as Independent Variable (IV), Midpoint time of sleep in working days as Mediator, and Urban vs Rural work environment as Moderator;

†PSQI sleep timing related components 2, 3, and 4 were not included in the PSQI score;

Sex and Age were included as covariates in both models;

IV effect B and 95% CI: Independent Variable unstandardized coefficient (B) and 95% Confidence Interval;

IV effect *p*-value: Independent Variable *p*-value;

Conditional effect *p*-value: Independent Variable and Moderator interaction variable *p*-value;

NS: statistically nonsignificant, since the 95% CI includes zero.

**p*<0.0001

Table 4 - Association between Sleep parameters (PSQI score† and sleep timing) and AANAT and RORA polymorphisms: results of four separate multivariate analyses.

Outcome	Gene	Genotypes	B	95%CI	p-value	Adj. p-value
PSQI score†	AANAT	GT/TT	-0.021	-0.130 to 0.088	0.704	1.000
	RORA	GA/AA	0.146	0.054 to 0.239	0.002	0.008
Midpoint time of sleep	AANAT	GT/TT	-0.013	-0.070 to 0.045	0.669	1.000
	RORA	GA/AA	-0.015	-0.064 to 0.034	0.544	1.000

Sex and Age entered as covariates in all four analyses.

†PSQI sleep timing related components 2, 3, and 4 were not included in the PSQI score.

Table S1 - Occupational characteristics among Total sample, Psychiatric, and Cardiometabolic self-reported symptoms samples.

	Total (N=829)		Psychiatric self- reported symptoms sample (N=660)		Cardiometabolic self- reported symptoms sample (N=800)	
	N	(%)	N	(%)	N	(%)
Agriculture	411	(49.6)	322	(48.8)	396	(49.5)
Industry	48	(5.8)	36	(5.5)	46	(5.8)
Sales	33	(4.0)	30	(4.5)	31	(3.9)
Skilled services	26	(3.1)	16	(2.4)	25	(3.1)
Unskilled or semi- skilled services	299	(36.1)	245	(37.1)	291	(36.4)
Unemployed	12	(1.4)	11	(1.7)	11	(1.4)

Table S2 - Descriptives of the genetic analysis subsample (N=552).

Gene	Genotype	n (%) or median (range)
<i>AANAT</i>	GG	128 (23.2%)
	GT	263 (47.6%)
	TT	161 (29.2%)
<i>RORA</i>	GG	231 (41.8%)
	GA	247 (44.7%)
	AA	74 (13.4%)
<i>TIMELESS</i>	GG	486 (88%)
	GA	62 (11.2%)
	AA	4 (0.7%)
Sex	Men	190 (34.4%)
	Women	362 (65.6%)
Age		45 (18 - 65)
Midpoint of sleep		2:12am (11:50pm - 10:15am)
PSQI score [†]		1 (0 - 11)
PSQI components	score	
Subjective sleep quality (C1)	0 - 1	499 (90.4%)
	2 - 3	53 (9.6%)
Sleep disturbances (C5)	0 - 1	449 (81.3%)
	2 - 3	103 (18.7%)
Use of sleeping medication (C6)	0 - 1	476 (86.2%)
	2 - 3	76 (13.8%)
Daytime disfunction (C7)	0 - 1	509 (92.2%)
	2 - 3	43 (7.8%)

[†]PSQI sleep timing related components 2, 3, and 4 were not included in the PSQI score.

Table S3 - Cardiometabolic and Psychiatric self-reported symptoms characteristics (N=829).

	Declared		Total	Missing /
	yes	(%)		Not declared
Obesity	152	(18.3)	826	3
Hypertension	188	(22.7)	819	10
Heart disease	42	(5.1)	821	8
Diabetes	25	(3.0)	814	15
Depression	106	(12.8)	811	18
Anxiety	279	(33.7)	677	152
Cardiometabolic self-reported symptoms			800	29
1 symptom	202	(24.4)		
2 symptoms	67	(8.1)		
3 symptoms	14	(1.7)		
4 symptoms	2	(0.2)		
Psychiatric self-reported symptoms			660	169
1 symptom	226	(27.3)		
2 symptoms	66	(8.0)		

Table S4 - Association analysis between gene polymorphisms and sleep parameters (N=552).

Gene	Genotype	PSQI score [†]		Midpoint of sleep		Pairwise comparisons**	PSQI score [†]	Midpoint of sleep
		Mean	(95%CI)	Mean	(95%CI)		<i>p-value</i>	<i>p-value</i>
<i>AANAT</i>							0.315	0.036*
	GG	2.406	(2.064 to 2.769)	2:16am	(2:05am to 2:26am)	GG vs GT	-	0.903
	GT	2.125	(1.909 to 2.350)	2:24am	(2:17am to 2:32am)	GG vs TT	-	0.647
	TT	2.571	(2.218 to 2.941)	2:08am	(1:59am to 2:17am)	GT vs TT	-	0.030*
<i>RORA</i>							0.055	0.726
	GG	2.047	(1.819 to 2.291)	2:19am	(2:10am to 2:28am)	GG vs GA	-	-
	GA	2.481	(2.213 to 2.767)	2:17am	(2:10am to 2:25am)	GG vs AA	-	-
	AA	2.635	(2.176 to 3.110)	2:14am	(2:00am to 2:29am)	GA vs AA	-	-
<i>TIMELESS</i>							0.705	0.702
	GG	2.358	(2.172 to 2.548)	2:17am	(2:12am to 2:23am)	GG vs GA	-	-
	GA	2.048	(1.640 to 2.491)	2:15am	(2:00am to 2:31am)	GG vs AA	-	-
	AA	2.000	(1.333 to 2.667)	2:45am	(1:28am to 4:00am)	GA vs AA	-	-

[†]PSQI sleep timing related components 2, 3, and 4 were not included in the PSQI score.

Mean (95%CI) data estimated by BCa bootstrap technique with 10000 samples.

**p*-value < 0.05 adjusted for multiple comparisons.

** Pairwise comparisons for cases in which there was statistically significant difference among genotypes.

Table S5 – Allele frequency of the minor variant nucleotide of the genes in our sample, in European (non Finnish) population (N=33,370), and in total population (N=60,706) (Lek et al., 2016).

SNP	Gene	Variant (1/2)	AF in this sample	AF in gnomAD European (non Finnish)	p-value (Sample vs European non Finnish)	AF in gnomAD (Total)	p-value (Sample vs total population)
rs3760138	<i>AANAT</i>	T/G	52.60%	53.60%	0.549	45.20%	<0.001
rs782931	<i>RORA</i>	A/G	35.10%	35.50%	0.805	45.80%	<0.001
rs774045	<i>TIMELESS</i>	A/G	6.40%	5.20%	0.089	5.80%	0.430

SNP: Single Nucleotide Polymorphism; Variant 1 and 2: minor and major allele nucleotides respectively; AF: Allele Frequency of variant 1. Chi-squared test was performed.

Table S6 - Association between *AANAT*, *RORA* and *TIMELESS* polymorphisms and PSQI Components† (N=552).

Gene	Genotype	PSQI C1		PSQI C5		PSQI C6		PSQI C7	
		score= 0 - 1	score= 2 - 3	score= 0 - 1	score= 2 - 3	score= 0 - 1	score= 2 - 3	score= 0 - 1	score= 2 - 3
<i>AANAT</i>	GG	113 (22.6%)	15 (28.3%)	94 (20.9%)	34 (33%)	111 (23.3%)	17 (22.4%)	117 (23%)	11 (25.6%)
	GT	248 (49.7%)	15 (28.3%)	222 (49.4%)	41 (39.8%)	231 (48.5%)	32 (42.1%)	247 (48.5%)	16 (37.2%)
	TT	138 (27.7%)	23 (43.4%)	133 (29.6%)	28 (27.2%)	134 (28.2%)	27 (35.5%)	145 (28.5%)	16 (37.2%)
<i>RORA</i>	GG	217 (43.5%)	14 (26.4%)	194 (43.2%)	37 (35.9%)	202 (42.4%)	29 (38.2%)	223 (43.8%)	8 (18.6%)
	GA	217 (43.5%)	30 (56.6%)	197 (43.9%)	50 (48.5%)	210 (44.1%)	37 (48.7%)	222 (43.6%)	25 (58.1%)
	AA	65 (13%)	9 (17%)	58 (12.9%)	16 (15.5%)	64 (13.4%)	10 (13.2%)	64 (12.6%)	10 (23.3%)
<i>TIMELESS</i>	GG	437 (87.6%)	49 (92.5%)	396 (88.2%)	90 (87.4%)	417 (87.6%)	69 (90.8%)	446 (87.6%)	40 (93%)
	GA	58 (11.6%)	4 (7.5%)	50 (11.1%)	12 (11.7%)	55 (11.6%)	7 (9.2%)	59 (11.6%)	3 (7%)
	AA	4 (0.8%)	0 (0%)	3 (0.7%)	1 (1%)	4 (0.8%)	0 (0%)	4 (0.8%)	0 (0%)

PSQI C1: Subjective sleep quality; PSQI C5: Sleep disturbances; PSQI C6: Use of sleeping medication; PSQI C7: Daytime disfunction.

†PSQI sleep timing related components 2, 3, and 4 were not included in the analysis due to the correlation to Midpoint of sleep in working days.

Descriptives: n (%); Univariate analysis: Chi-squared.

bold: indicate statistically significant differences between scores 0-1 and 2-3 after p-value correction for multiple testing.

4.2. Artigo 2

Title: A moderated mediation analysis of polymorphisms of clock-related genes and psychological well-being in a Brazilian rural population.

Authors: Felipe Gutiérrez Carvalho^{1,2}, André Comiran Tonon^{1,2}, Ana Maria Delgado Cunha¹, Fernanda dos Santos Pereira³, Ursula Matte⁴, Sidia Maria Callegari Jacques⁵, Maria Paz Loayza Hidalgo^{1,2}.

Affiliations: ¹ Laboratório de Cronobiologia e Sono HCPA/UFRGS; ² Graduate Program in Psychiatry and Behavioral Sciences UFRGS; ³ Centro de Pesquisa Experimental, Unidade de Análises Moleculares e de Proteínas HCPA; ⁴ Gene Therapy Center, Experimental Research Center HCPA; ⁵ Departamento de Estatística, Instituto de Matemática e Estatística UFRGS.

ABSTRACT

Background: Research regarding the relationship between mood disturbances and individual circadian rhythms aspects, such as chronodisruptive measures and clock-related genes polymorphisms has shown promising results. This study aims to analyze the association between psychological well-being and polymorphisms of *AANAT*, *RORA*, and *TIMELESS* genes, and to understand if this association could be mediated by the interaction between sleep timing on working days and alarm clock need. Methods: 560 subjects from a predominantly rural region in southern Brazil were evaluated for psychological well-being and sleep timing measures on working days, including data regarding alarm clock need. Three polymorphisms of *AANAT*, *RORA* and *TIMELESS* genes (rs3760138, rs782931, and rs774045 respectively) were genotyped in blood samples. Results: In the multivariate generalized linear model, we found no significant associations of worse psychological well-being scores with *AANAT* TT genotype (adjusted $p= 0.088$) and *RORA* AA genotype (adjusted $p= 0.094$). Polymorphisms were not associated with sleep timing measures in mediation analysis, and the interactions with alarm clock need were not significant in the final model. Conclusions: The psychological well-being mild differences in *AANAT* and *RORA* genotypes were not maintained after multiple testing corrections. Some of the characteristics of this sample, such as work schedule aspects and its mostly rural environment may have contributed to sleep timing differences. Although the results regarding the analyzed genes remain inconclusive, the study of clock-related and melatonin synthesis pathway genes polymorphisms seem a promising area to be explored.

KEYWORDS: AANAT, Circadian Rhythm, Chronobiology, Genetics, RORA, Sleep.

1. INTRODUCTION

Subjective well-being evaluation has been successfully used in several clinical settings, as a measure of treatment response in clinical trials involving the use of medications and psychotherapy interventions, and also as a useful screening tool for Depression. In a recent systematic review using the 5-Item World Health Organization Well-Being Index, for all 18 studies analyzed, using cut-off values of 50% of the total score, the sensitivity value for Major depression diagnosis was 0.86, and a specificity value was 0.81 (Topp et al., 2015). MD is a chronic disorder associated with functional impairment in several domains, such as work, social interaction and family life (Hammer-Helmich et al., 2018; Kupfer et al., 2012). Its etiopathogenesis is multifactorial, comprising genetic and environmental factors (Sullivan et al., 2000). Recent theories highlight that some of these factors are intimately related to biological rhythms. The misalignment of such circadian clocks in a chronodisruptive daily schedules seems to play an essential role in processes involved in the development and destabilization of affective symptoms (Edgar and Mcclung, 2013; Mcclung, 2011).

Indeed, altered sleep/wake cycles or diurnal mood variations are part of the clinical hallmarks found in MD. Besides, some of the therapies used in affective disorders change the patterns of some circadian parameters even at molecular levels (Hallam et al., 2005; Padiath et al., 2004). In the last decade, several analyses identified associations between affective disorders and genes involved in the regulation of biological rhythms (Boudebessé et al., 2014; Etain et al., 2011). Specifically, regarding the association with depressive mood, the genes described in the scientific literature include *AANAT* (Soria et al., 2010a), *RORA* (Terracciano et al., 2010), and *TIMELESS* (Dmitrzak-Weglarz et al., 2015; Utge et al., 2010).

The mechanism by which clock genes manage the internal rhythm involves a composite network of transcriptional-translational feedback loops (TTFLs). The *CLOCK* and the *BMAL1* (also called *ARNTL*) heterodimerized proteins bind to promoter regions that activate transcription of the *PER* and *CRY* genes. The heterodimers formed by *PER/CRY* proteins have a negative feedback effect on their transcription by indirect pathways, repressing the *CLOCK-BMAL1* activity. Auxiliary TTFLs which regulate this main process involve *REV-ERBs* and *RORs* on one side (specifically over *BMAL1* expression), and *E4BP4/NFIL3* through *DBP* activity on the other side. Although *TIM*

(*TIMELESS*) gene is one of the main components of the *Drosophila melanogaster* molecular clock, its role in the mammalian circadian system remains unclear. Still, it seems it exerts a regulatory activity over *CRY* expression (Barnes et al., 2013; Engelen et al., 2013). Although this process is intrinsic in every nucleated cell of our bodies, the suprachiasmatic nucleus (SCN) executes the primary role in the regulation of the biological circadian rhythms, acting as the central pacemaker of the mammalian organism. In turn, melatonin is secreted by the pineal gland in a circadian manner, as influenced by the SCN activity, and also performs an essential function as it spreads the period information to other parts of the body (Vriend and Reiter, 2015). *AANAT* gene is responsible for the transcription of a crucial enzyme which participates in the melatonin synthesis pathway, the Aralkylamine N-acetyltransferase (Claustrat and Leston, 2015).

The link between mood and circadian behavioral patterns is yet not fully understood. Studies have shown that individual sleep/wake patterns are in part genetically determined (Klei et al., 2005; Mansour et al., 2006). However, few studies have been performed with methodological approaches to identify an intermediate phenotype effect of sleep timing characteristics in the relationship between circadian genes and mood disorders, showing associations of specific single nucleotide polymorphisms (SNPs) of *TIMELESS* and *CLOCK* genes with eveningness, and specific SNPs of *TIMELESS* and *RORA* genes with chronotype languidness and rigidity respectively (Etain et al., 2014; Lee et al., 2010). In terms of theoretical background, the inter-relationship between clock genes associated with mood disorders and genes involved in the melatonin pathway is an important issue to be explored since the nocturnal melatonin release seems to have a crucial role by communicating central and peripheral circadian timing. Nevertheless, analyses of indirect effects of sleep timing patterns on the relationship between polymorphisms of clock genes/melatonin pathway genes and mood disorders still lack in biomedical literature.

AIMS: (I) To analyze the association between psychological well-being and polymorphisms of the genes *AANAT*, *RORA*, and *TIMELESS*, and (II) to understand if this association is mediated by sleep timing patterns on working days interaction with alarm clock need, as a measure of sleep-wake timing patterns adaptation to daily schedules (Figure 1).

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Participants

This study was part of an epidemiological survey performed in a rural area (Vale do Taquari) in southern Brazil, where most of the population is composed of Caucasians of German and Italian descent (Carvalho et al., 2014). Details in regards to family ancestry are shown in Table S1. From an initial sample of 6,506 participants, a procedure called block randomization was performed which included the same proportion of subjects for early, intermediate, and late chronotypes, to have a more significant number of individuals with more extreme chronotypes, so that extreme and intermediate groups could be compared appropriately. From 1,127 subjects successfully re-interviewed, 560 participants with blood samples for genetic analysis were included (65.5% female; median age of 45, range 18–65 years old). A flowchart depicting the study protocol is shown in Figure 2.

The occupational data showed that 126 (22.5%) individuals worked up to 5 days/week, and 434 (77.5%) worked 6 to 7 days/week. Since there is a special interest to measure the relationship between internal and social rhythms, only data regarding sleep parameters in working days were included for the present analysis. As a way to measure imbalance between individual and work schedule rhythm, alarm clock need was used as an interaction variable. The sample characteristics are shown in Table 1.

The experimental protocol followed international ethical standards (Portaluppi et al., 2010), and the studies were performed according to the principles outlined by the Helsinki Declaration. The Ethics Committee at Hospital de Clínicas de Porto Alegre approved the study protocol (Project 15-0459 GPPG/HCPA), and all participants gave written informed consent.

2.2. Study design and measurements

In this cross-sectional study, trained researchers interviewed the participants in their homes. WHO-5 was administered for the evaluation of study groups based on depression risk. Work parameters, such as workdays per week and occupation characteristics were also evaluated. Sleep timing information (collected through The Munich Chronotype Questionnaire – MCTQ) and demographic data from a previous interview were included in the analysis.

2.3. Psychological well-being and risk for depression

Psychological well-being is highly correlated with depressive symptoms, and its evaluation is a brief and useful tool for assessing risk for depression (Bech, 2004, Topp et al., 2015). The WHO-5 assesses psychological well-being patterns in the last two weeks with five simple questions. The score is rated on a six-point Likert scale, from 0 to 5, which generates a raw score ranging from 0 to 25. Since measures regarding well-being and quality of life are conventionally presented as a percentage scale from 0 (absence of psychological well-being) to 100 (maximal psychological well-being), it is recommended to multiply the raw score by 4. For MD diagnosis, a cut-off value of 50% or less of the total score shows a sensitivity value of 0.86 and a specificity value of 0.81 (Topp et al., 2015). These values reach an acceptable level of quality as a screening method (sensitivity + specificity > 1.5) (Power et al., 2013). A Brazilian Portuguese validation study suggests a cut-off of 19/20 (76-80% equivalent) (De Souza and Hidalgo, 2012). In this study, to reach a better statistical power, the total score of the instrument was used as a continuous variable.

2.4. Sleep timing and alarm clock need

The Munich Chronotype Questionnaire (MCTQ) is a structured and self-administered instrument that collects information on sleep-wake habits and sunlight exposure on free and working days separately. The following information was obtained regarding sleeping patterns: bedtime, sleep latency, sleep duration, wake-up time, and fully awake time. The main sleep parameter used was the midpoint of sleep, which is calculated by dividing the sleep duration by two and adding the resulting number to the sleep onset time. MCTQ assesses actual sleep times separately for work and work-free days. In our sample specifically, the majority of the participants worked seven days/week (371 subjects, 66.3% of the sample). Thus, as a measure of the imbalance between individual and work-related rhythms, an interaction variable between sleep timing patterns on working days and alarm clock need was used in the analysis. A Brazilian-Portuguese version of the MCTQ was used (<http://www.euclock.org/>).

2.5. Genotyping

Samples of 5ml of whole blood were collected in EDTA tubes. DNA was extracted by standard salting out method (S.A.Miller, 1988) and quantified with Nanodrop 1000

spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), setting a concentration of DNA of 50ng/uL. The SNPs rs3760138 (*AANAT*), rs782931 (*RORA*), and rs774045 (*TIMELESS*) genes were genotyped with TaqMan SNP genotyping assays (Applied Biosystems, CA, USA; catalog number #4351376, #4351376, and #4351376 respectively) according to the manufacturer protocol for TaqMan allelic discrimination system (StepOne Real-Time PCR Systems, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Reactions were performed in 48-wells plates using 1uL of DNA. The standard protocol of StepOne for temperature cycling was followed – 60°C for 30 sec, 95°C for 10 min, 95°C for 15 sec and 60°C for 60 sec (40 cycles); 60°C for 30sec (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The genotypes of the samples were identified by the analysis of the amplification plot generated by the equipment's software.

2.6. Statistical analysis

Genotype distribution was tested for Hardy–Weinberg equilibrium and compared to allele frequencies of European non-Finnish (N=33,370) and total populations (N=60,706) - according to Genome Aggregation Database (Lek et al., 2016) (similar data previously published in Carvalho et al., 2019). Shapiro-Wilk tests assessed the normality of data. Sample demographics were expressed as medians (range), or the number of cases (n) and percentages. Mann Whitney test was used for bivariate between-group comparisons of continuous variables; the chi-square test was employed for comparisons of categorical variables. Figures presenting means with 95% confidence interval were estimated through bias-corrected and accelerated (BCa) bootstrap technique with 1000 samples.

Since the WHO-5 score presented a left-skewed distribution, a subtraction of the maximum value plus 1 was used to enable statistical procedures. A generalized linear model (GZLM) with gamma distribution and log link was employed to evaluate the effects of genotypes on transformed WHO-5 scores adjusting for sex, age and midsleep time in working days. Model parameters, such as the Likelihood Ratio Chi-square and the analysis of model residuals are shown in Supplementary files. As a recessive genetic model was more suitable to the data, *AANAT* and *RORA* genotypes entered the model as *AANAT* TT (yes/no) and *RORA* AA (yes/no). A quadratic term was added for age and midsleep time, which entered the model as age+age², and midsleep+midsleep² respectively. The potential mediation effect of the midpoint of sleep in working days on the association between genotypes and risk of depression was tested first through GZLM with gamma distribution

and log link using the midpoint of sleep as the dependent variable, with further procedures using PROCESS macro for SPSS depending on the results (Hayes, 2013).

The software IBM Statistical Package for the Social Sciences (SPSS), version 18 was used for statistical procedures. The significance level was set to 0.05 (5%) in all tests. Power calculations showed 85% power of detecting a difference of 1.5 units in Who-5 scores, considering samples of 150 individuals with the risk genotype and 400 individuals without the risk genotype, and assuming SD equal to 4.5 units in both samples.

3. RESULTS

The genotype distribution of the genes (Table S1) was in Hardy–Weinberg equilibrium (*AANAT*: $X^2(1) = 2.10$, $p = 0.147$; *RORA*: $X^2(1) = 0.19$, $p = 0.664$; *TIMELESS*: $X^2(1) = 1.37$, $p = 0.240$). The allele frequencies are shown in Table S2, comparatively to allele frequencies of European non-Finnish and total global populations data from the Genome Aggregation Database (Lek et al., 2016) (data previously published in Carvalho et al., 2019).

Table 2 shows descriptive data and bivariate analysis of demographic and clinical characteristics comparing low and high risk for depression groups (cut-off 19/20 points). Of notice are the differences between groups in age and sex, which consequently entered in the multivariate analyses as covariates. Figure 3 shows Midsleep time on working days and WHO-5 between-group differences in relation to alarm clock need, and *AANAT* and *RORA* polymorphisms.

Table 3 shows the separate analyses between psychological well-being and *AANAT* and *RORA* polymorphisms in a multivariate model adjusted for age, sex and midsleep time in working days. An association between *AANAT* TT genotype and worse psychological well-being scores is observed when compared to TG+GG genotype, but this association is not maintained after the correction for multiple hypotheses ($p = 0.044$, adjusted $p = 0.088$). Likewise, in the comparison between the two *RORA* genotypes, the AA genotype shows similar results ($p = 0.047$, adjusted $p = 0.094$). The interaction variable between the quadratic term of sleep timing patterns and alarm clock need was not significant (*AANAT* model: alarm clock*squared sleep timing p -value= 0.416; alarm clock*sleep timing p -value= 0.451; *RORA* model: alarm clock*squared sleep timing p -value= 0.503; alarm clock*sleep timing p -value= 0.421), and was excluded from the final model. *TIMELESS* polymorphism was excluded from the analysis due to the small number of individuals with the AA genotype. The differences of WHO-5 mean scores evaluated in these analyses are shown in Figure 3.

In regards to the mediation analysis, the GZLM procedure showed no association between the polymorphisms and sleep timing (rs3760138 *AANAT* TT: $p = 0.211$, adjusted $p = 0.422$; rs782931 *RORA* AA: $p = 0.674$, adjusted $p = 1.000$). The interaction variable between alarm clock need and sleep timing patterns was not significant (*AANAT* model:

alarm clock*sleep timing p-value= 0.840; *RORA* model: alarm clock*sleep timing p-value= 0.703), and was excluded from the final model. Therefore, no further procedures were executed, and the mediation effects of sleep timing on the association between psychological well-being and the two polymorphisms studied were not observed.

4. DISCUSSION

To our knowledge, this is the first study with a representative sample that evaluates the association of polymorphisms of *AANAT* and *RORA* genes with psychological well-being adjusting for age and sex, and analyzing moderated-mediation effects through sleep timing on working days interaction with alarm clock need as a possible measure of sleep-wake timing patterns adaptation to daily work schedules. Our main findings suggest that: (I) both rs3760138 *AANAT* TT and rs782931 *RORA* AA genotypes show a marginal association with psychological well-being, which is lost after correction for multiple hypotheses; (II) the relationship between the genotypes and psychological well-being is not mediated by sleep timing in working days; (III) the interaction between sleep timing on working days and alarm clock need could not detect adaptation differences regarding unbalanced sleep-wake timing patterns and daily work schedules.

The observed allele frequencies were similar to those in the European non-Finnish population according to gnomAD (Table S2). This finding corresponds to the data presented in Table S1, indicating a reduced admixture in the sample. Thus, the replication of association findings of other European populations would not be unexpected (Etain et al., 2014; Soria et al., 2010a).

The rs3760138 *AANAT* SNP is located in the promoter region of the gene. The more plausible reason for a possible connection between this gene and depression is that there is no direct association of this specific locus to depression susceptibility, but instead, it may be in linkage disequilibrium with a tagged putative etiological variant. Results in biomedical literature are controversial (Kripke et al., 2011; Soria et al., 2010a), and our findings could not replicate the same results as described by one previous study, which has found a positive association between the presence of T allele in rs3760138 *AANAT* and MD (Soria et al., 2010a).

Regarding the findings related to rs782931 *RORA* SNP, its intronic position discard a direct association of the polymorphism to possible changes in the transcriptional process of the *RORA* protein. Again, one possible explanation may be its linkage disequilibrium to another determinant etiological SNP. An interaction with ncRNA (Moszyńska et al., 2017) or an alternative splice using cryptic splice sites (Kurmangaliyev et al., 2013) also cannot be discarded. There is a previous study describing the association of G allele in rs782931

RORA with bipolar disorder (BD) (Etain et al., 2014). However, we did not find previous studies showing an association of this SNP to the risk of MD. There is evidence of the association between another SNP (rs12912233) of the same gene with the depressive trait, which may be associated with a higher risk of developing MD (Terracciano et al., 2010).

Previous studies in literature showed an association between MD and different SNPs of *TIMELESS* genes (Dmitrzak-Weglarz et al., 2015), including positive interactions with sex (Utge et al., 2010). But in our sample, the low frequency of rs774045 *TIMELESS* AA genotypes precluded multivariate statistical procedures or analyses in sex strata, thus we could not replicate previous studies of the association between this polymorphism with mood disorders (Etain et al., 2014).

In the analysis of a potential mediation effect of midsleep time in working days, we observed no association of genes polymorphisms with sleep timing, and indirect effects of sleeping patterns on the relationship between circadian genes and risk of depression could not be found. Both the *RORA* and *TIMELESS* SNPs used in this analysis were related to sleep/wake patterns in a previous study (Etain et al., 2014), but these findings could not be replicated in this sample. Also, the interaction variable considering daily use of an alarm clock to be able to wake up in time for work activities could not identify signs of imbalance between work schedule-related and individual sleep timing patterns.

Limitations: Sleep/wake patterns in rural workers may misrepresent patterns in urban samples, as differences are expected between these two populations. These characteristics may have influenced moderated-mediation analysis. It is noteworthy that SNPs were chosen based on previous association studies, without established functional impact on gene function and Major Depression. Also, by the time the study design was planned, GWAS results related to MD and sleep characteristics were not as clear as some recent achievements published (Wray et al., 2018, Lane et al., 2016).

Conclusions: This study represents one step to understanding the relationship between biological clocks and affective disturbances, and brings important results to help the scientific community to better understand the relationship between circadian regulation and mood disorders. In sum, the analyses show no association of psychological well-being with *AANAT* and *RORA* risk genotypes. Further research is necessary to better elucidate possible correlations between molecular biological rhythms and affective disturbances.

Acknowledgments: The authors wish to acknowledge Dr. Camila Morelato de Souza for the participation at the beginning of this project, and the students Livia Lopez Torres and Juliana Jury Freitas for the assistance in the laboratory procedures.

Financial support: The project received financial support from the “Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos” (FIPE/HCPA – GPPG 15-0459), “Fundação de Amparo à pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul” (FAPERGS), “Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico” (CNPq), PROBRAL – CAPES/DAAD, and Programa Nacional de Pós-Doutorado (PNPD – CAPES).

Conflict of interest: The funders had no role in study design, data collection, and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. Hidalgo MP has received funding from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). There were no other conflicts of interest.

REFERENCES

- Bech, P., 2004. Measuring the dimension of psychological general well-being by the WHO-5. *Qual. Life Newsl.* 32, 15–16. <https://doi.org/10.1002/elps.201470094>
- Boudebese, C., Etain, B., Goldstein, T., Milhiet, V., Germain, A., Henry, C., Kupfer, D., Leboyer, M., 2014. Sleep and Circadian Profiles of Bipolar Disorder: From Chronobiology to Novel Therapeutic Strategies. *Curr. Psychiatry Rev.* 10, 235–247. <https://doi.org/10.2174/1573400510666140620002502>
- Carvalho, F.G., Hidalgo, M.P., Levandovski, R., 2014. Differences in circadian patterns between rural and urban populations: An epidemiological study in countryside. *Chronobiol. Int.* 31, 442–449. <https://doi.org/10.3109/07420528.2013.846350>
- Claustrat, B., Leston, J., 2015. Melatonin: Physiological effects in humans. *Neurochirurgie* 61, 77–84. <https://doi.org/10.1016/j.neuchi.2015.03.002>
- De Souza, C.M., Hidalgo, M.P.L., 2015. The midpoint of sleep on working days: A measure for chronodisruption and its association to individuals' well-being. *Chronobiol. Int.* 32, 341–348. <https://doi.org/10.3109/07420528.2014.979941>
- De Souza, C.M., Hidalgo, M.P.L., 2012. World Health Organization 5-item well-being index: Validation of the Brazilian Portuguese version. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* 262, 239–244. <https://doi.org/10.1007/s00406-011-0255-x>
- Dmitrzak-Weglarz, M.P.M.P., Pawlak, J.M.J.M., Maciukiewicz, M., Moczko, J., Wilkosc, M., Leszczynska-Rodziewicz, A., Zaremba, D., Hauser, J., 2015. Clock gene variants differentiate mood disorders. *Mol. Biol. Rep.* 42, 277–288. <https://doi.org/10.1007/s11033-014-3770-9>
- Edgar, N., McClung, C.A., 2013. Major depressive disorder: A loss of circadian synchrony? *BioEssays* 35, 940–944. <https://doi.org/10.1002/bies.201300086>
- Etain, B., Jamain, S., Milhiet, V., Lajnef, M., Boudebese, C., Dumaine, A., Mathieu, F., Gombert, A., Ledudal, K., Gard, S., Kahn, J.P., Henry, C., Boland, A., Zelenika, D., Lechner, D., Lathrop, M., Leboyer, M., Bellivier, F., 2014. Association between circadian genes, bipolar disorders and chronotypes. *Chronobiol. Int.* 31, 807–814. <https://doi.org/10.3109/07420528.2014.906445>
- Etain, B., Milhiet, V., Bellivier, F., Leboyer, M., 2011. Genetics of circadian rhythms and mood spectrum disorders. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 21, S676–S682. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2011.07.007>
- Gałecka, E.E., Szemraj, J., Florkowski, A., Gałecki, P., Bieńkiewicz, M., Karbownik-Lewińska, M., Lewiński, A., 2011. Single nucleotide polymorphisms and mRNA expression for melatonin MT2 receptor in depression. *Psychiatry Res.* 189, 472–474. <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2011.01.021>
- Gałecki, P., Szemraj, J., Bartosz, G., Bieńkiewicz, M., Gałecka, E., Florkowski, A., Lewiński, A., Karbownik-Lewińska, M., 2010. Single-nucleotide polymorphisms and mRNA expression for melatonin synthesis rate-limiting enzyme in recurrent depressive disorder. *J. Pineal Res.* 48, 311–317. <https://doi.org/10.1111/j.1600->

079X.2010.00754.x

- Hallam, K.T., Olver, J.S., Norman, T.R., 2005. Effect of sodium valproate on nocturnal melatonin sensitivity to light in healthy volunteers. *Neuropsychopharmacology* 30, 1400–1404. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300739>
- Hammer-Helmich, L., Haro, J.M., Jönsson, B., Melac, A.T., Di Nicola, S., Chollet, J., Milea, D., Rive, B., Saragoussi, D., 2018. Functional impairment in patients with major depressive disorder: The 2-year PERFORM study. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* 14, 239–249. <https://doi.org/10.2147/NDT.S146098>
- Hayes, A. F., 2013. Introduction to mediation, moderation, and conditional process analysis: A regression-based approach. Introduction to mediation, moderation, and conditional process analysis: A regression-based approach. New York, NY, US: Guilford Press.
- Hua, P., Liu, W., Chen, D., Zhao, Y., Chen, L., Zhang, N., Wang, C., Guo, S., Wang, L., Xiao, H., Kuo, S.-H., 2014. Cry1 and Tef gene polymorphisms are associated with major depressive disorder in the Chinese population. *J. Affect. Disord.* 157. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2013.11.019>
- Klei, L., Reitz, P., Miller, M., Wood, J., Maendel, S., Gross, D., Waldner, T., Eaton, J., Monk, T.H., Nimgaonkar, V.L., 2005. Heritability of morningness-eveningness and self-report sleep measures in a family-based sample of 521 hutterites. *Chronobiol. Int.* 22, 1041–1054. <https://doi.org/10.1080/07420520500397959>
- Kripke, D.F., Nievergelt, C.M., Joo, E.J., Shekhtman, T., Kelsoe, J.R., 2009. Circadian polymorphisms associated with affective disorders. *J. Circadian Rhythms* 7. <https://doi.org/10.1186/1740-3391-7-2>
- Kripke, D.F., Nievergelt, C.M., Tranah, G.J., Murray, S.S., McCarthy, M.J., Rex, K.M., Parimi, N., Kelsoe, J.R., 2011. Polymorphisms in melatonin synthesis pathways: Possible influences on depression. *J. Circadian Rhythms* 9, 8. <https://doi.org/10.1186/1740-3391-9-8>
- Kupfer, D.J., Frank, E., Phillips, M.L., 2012. Major depressive disorder: New clinical, neurobiological, and treatment perspectives. *Lancet* 379, 1045–1055. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60602-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60602-8)
- Kurmangaliyev, Y.Z., Sutormin, R.A., Naumenko, S.A., Bazykin, G.A., Gelfand, M.S., 2013. Functional implications of splicing polymorphisms in the human genome. *Hum Mol Genet* 22, 3449–3459. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddt200>
- Lavebratt, C., Sjöholm, L.K., Soronen, P., Paunio, T., Vawter, M.P., Bunney, W.E., Adolfsson, R., Forsell, Y., Wu, J.C., Kelsoe, J.R., Partonen, T., Schalling, M., 2010. CRY2 is associated with depression. *PLoS One* 5, e9407. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009407>
- Lee, K.Y.K.Y., Song, J.Y.J.Y., Kim, S.H.S.C.S.H.C., Kim, S.H.S.C.S.H.C., Joo, E.-J.E.-J., Ahn, Y.M.Y.M., Kim, Y.S.Y.S., 2010. Association between CLOCK 3111T/C and preferred circadian phase in Korean patients with bipolar disorder. *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry* 34, 1196–1201. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2010.06.010>

- Lek, M., Karczewski, K.J., Minikel, E. V, Samocha, K.E., Banks, E., Fennell, T., O'Donnell-Luria, A.H., Ware, J.S., Hill, A.J., Cummings, B.B., Tukiainen, T., Birnbaum, D.P., Kosmicki, J.A., Duncan, L.E., Estrada, K., Zhao, F., Zou, J., Pierce-Hoffman, E., Berghout, J., Cooper, D.N., Deflaux, N., DePristo, M., Do, R., Flannick, J., Fromer, M., Gauthier, L., Goldstein, J., Gupta, N., Howrigan, D., Kiezun, A., Kurki, M.I., Moonshine, A.L., Natarajan, P., Orozco, L., Peloso, G.M., Poplin, R., Rivas, M.A., Ruano-Rubio, V., Rose, S.A., Ruderfer, D.M., Shakir, K., Stenson, P.D., Stevens, C., Thomas, B.P., Tiao, G., Tusie-Luna, M.T., Weisburd, B., Won, H.-H., Yu, D., Altshuler, D.M., Ardissino, D., Boehnke, M., Danesh, J., Donnelly, S., Elosua, R., Florez, J.C., Gabriel, S.B., Getz, G., Glatt, S.J., Hultman, C.M., Kathiresan, S., Laakso, M., McCarroll, S., McCarthy, M.I., McGovern, D., McPherson, R., Neale, B.M., Palotie, A., Purcell, S.M., Saleheen, D., Scharf, J.M., Sklar, P., Sullivan, P.F., Tuomilehto, J., Tsuang, M.T., Watkins, H.C., Wilson, J.G., Daly, M.J., MacArthur, D.G., Exome Aggregation Consortium, 2016. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature* 536, 285–91. <https://doi.org/10.1038/nature19057>
- Mansour, H.A., Wood, J., Logue, T., Chowdari, K. V., Dayal, M., Kupfer, D.J., Monk, T.H., Devlin, B., Nimgaonkar, V.L., 2006. Association study of eight circadian genes with bipolar I disorder, schizoaffective disorder and schizophrenia. *Genes, Brain Behav.* 5, 150–157. <https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2005.00147.x>
- Mcclung, C.A., 2011. Circadian rhythms and mood regulation: Insights from pre-clinical models. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 21. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2011.07.008>
- Moszyńska, A., Gebert, M., Collawn, J.F., Bartoszewski, R., 2017. SNPs in microRNA target sites and their potential role in human disease. *Open Biol.* 7, 170019. <https://doi.org/10.1098/rsob.170019>
- Padiath, Q.S., Paranjpe, D., Jain, S., Sharma, V.K., 2004. Glycogen Synthase Kinase 3 β as a Likely Target for the Action of Lithium on Circadian Clocks. *Chronobiol. Int.* 21, 43–55. <https://doi.org/10.1081/CBI-120027981>
- Portaluppi, F., Smolensky, M.H., Touitou, Y., 2010. Ethics and methods for biological rhythm research on animals and human beings. *Chronobiol. Int.* 27, 1911–1929. <https://doi.org/10.3109/07420528.2010.516381>
- S.A.Miller, D.D.D. and H.F.P., 1988. A simple salting out procedure for extractin DNA from humam nnucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 15, 1215.
- Soria, V., Martínez-Amorós, È., Escaramís, G., Valero, J., Crespo, J.M., Gutiérrez-Zotes, A., Bayés, M., Martorell, L., Vilella, E., Estivill, X., Menchón, J.M., Gratacòs, M., Urretavizcaya, M., 2010a. Resequencing and association analysis of arylalkylamine N-acetyltransferase (AANAT) gene and its contribution to major depression susceptibility. *J. Pineal Res.* 49, 35–44. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2010.00763.x>
- Soria, V., Martínez-Amorós, È., Escaramís, G., Valero, J., Pérez-Egea, R., García, C., Gutiérrez-Zotes, A., Puigdemont, D., Bayés, M., Crespo, J.M., Martorell, L., Vilella, E., Labad, A., Vallejo, J., Pérez, V., Menchón, J.M., Estivill, X., Gratacòs, M., Urretavizcaya, M., 2010b. Differential association of circadian genes with mood

- disorders: CRY1 and NPAS2 are associated with unipolar major depression and clock and VIP with bipolar disorder. *Neuropsychopharmacology* 35, 1279–1289. <https://doi.org/10.1038/npp.2009.230>
- Sullivan, P.F., Neale, M.C., Kendler, K.S., 2000. Genetic epidemiology of major depression: Review and meta-analysis. *Am. J. Psychiatry* 157, 1552–1562. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.157.10.1552>
- Takahashi, J.S., Hong, H.-K.K., Ko, C.H., McDearmon, E.L., 2008. The Genetics of Mammalian Circadian Order and Disorder: Implications for Physiology and Disease. *Nat. Rev. Genet.* 9, 764–775. <https://doi.org/10.1038/nrg2430>
- Terracciano, A., Tanaka, T., Sutin, A.R., Sanna, S., Deiana, B., Lai, S., Uda, M., Schlessinger, D., Abecasis, G.R., Ferrucci, L., Costa, P.T., 2010. Genome-wide association scan of trait depression. *Biol. Psychiatry* 68, 811–817. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2010.06.030>
- Topp, C.W., Østergaard, S.D., Søndergaard, S., Bech, P., 2015. The WHO-5 Well-Being Index: A Systematic Review of the Literature. *Psychother. Psychosom.* 84, 167–176. <https://doi.org/10.1159/000376585>
- Utge, S.J., Soronen, P., Loukola, A., Kronholm, E., Ollila, H.M., Pirkola, S., Porkka-Heiskanen, T., Partonen, T., Paunio, T., 2010. Systematic analysis of circadian genes in a population-based sample reveals association of TIMELESS with depression and sleep disturbance. *PLoS One* 5. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009259>
- Vriend, J., Reiter, R.J., 2015. Melatonin feedback on clock genes: A theory involving the proteasome. *J. Pineal Res.* 58, 1–11. <https://doi.org/10.1111/jpi.12189>

FIGURES

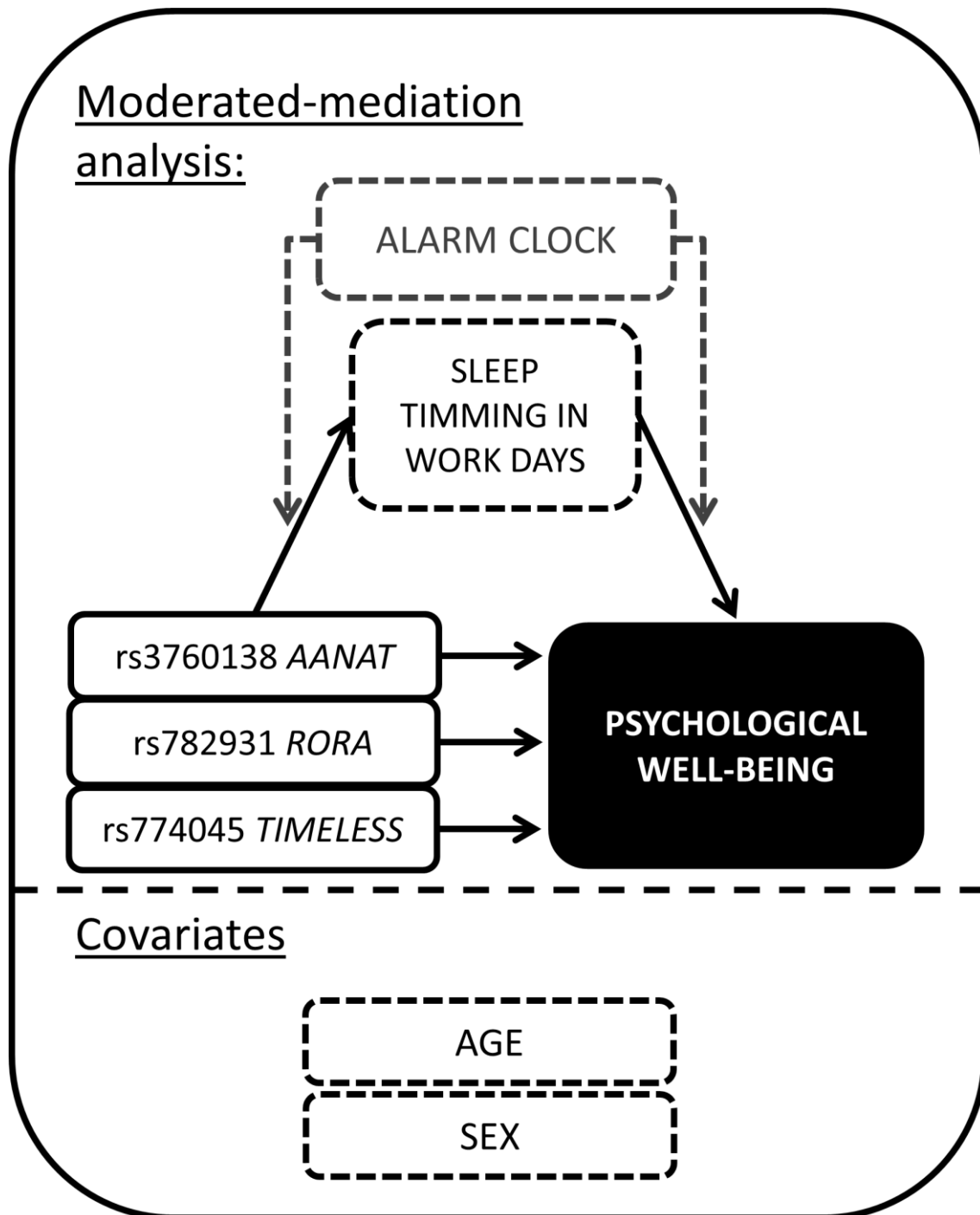


Figure 1 – Model of the study analysis.

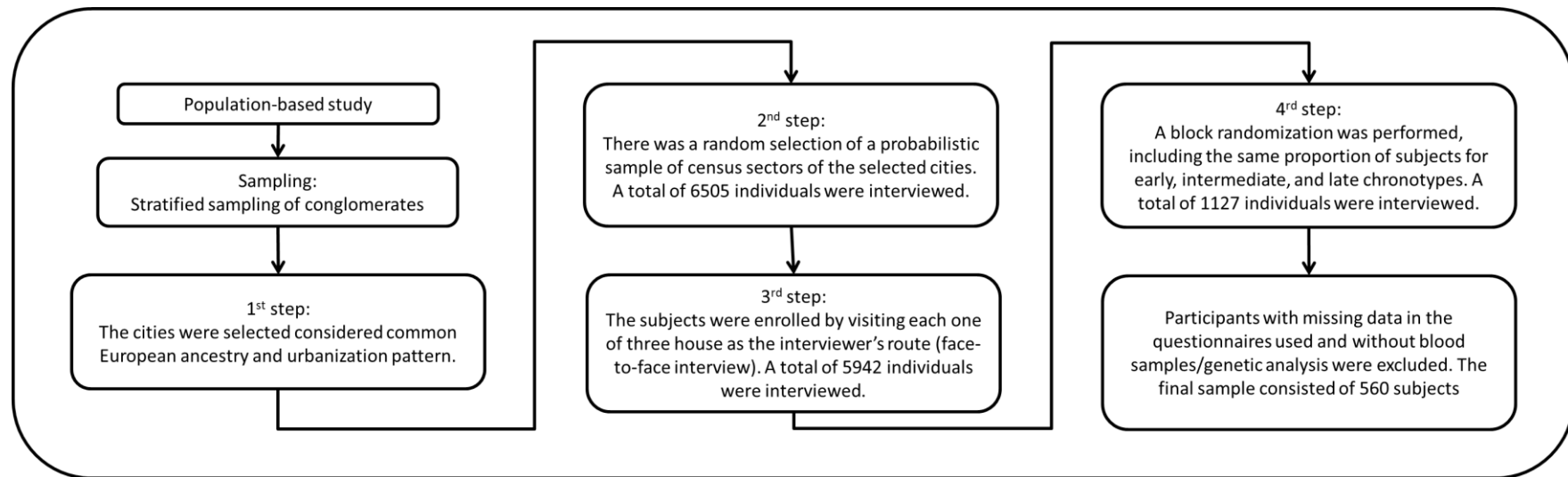


Figure 2 – Flowchart of the study protocol.

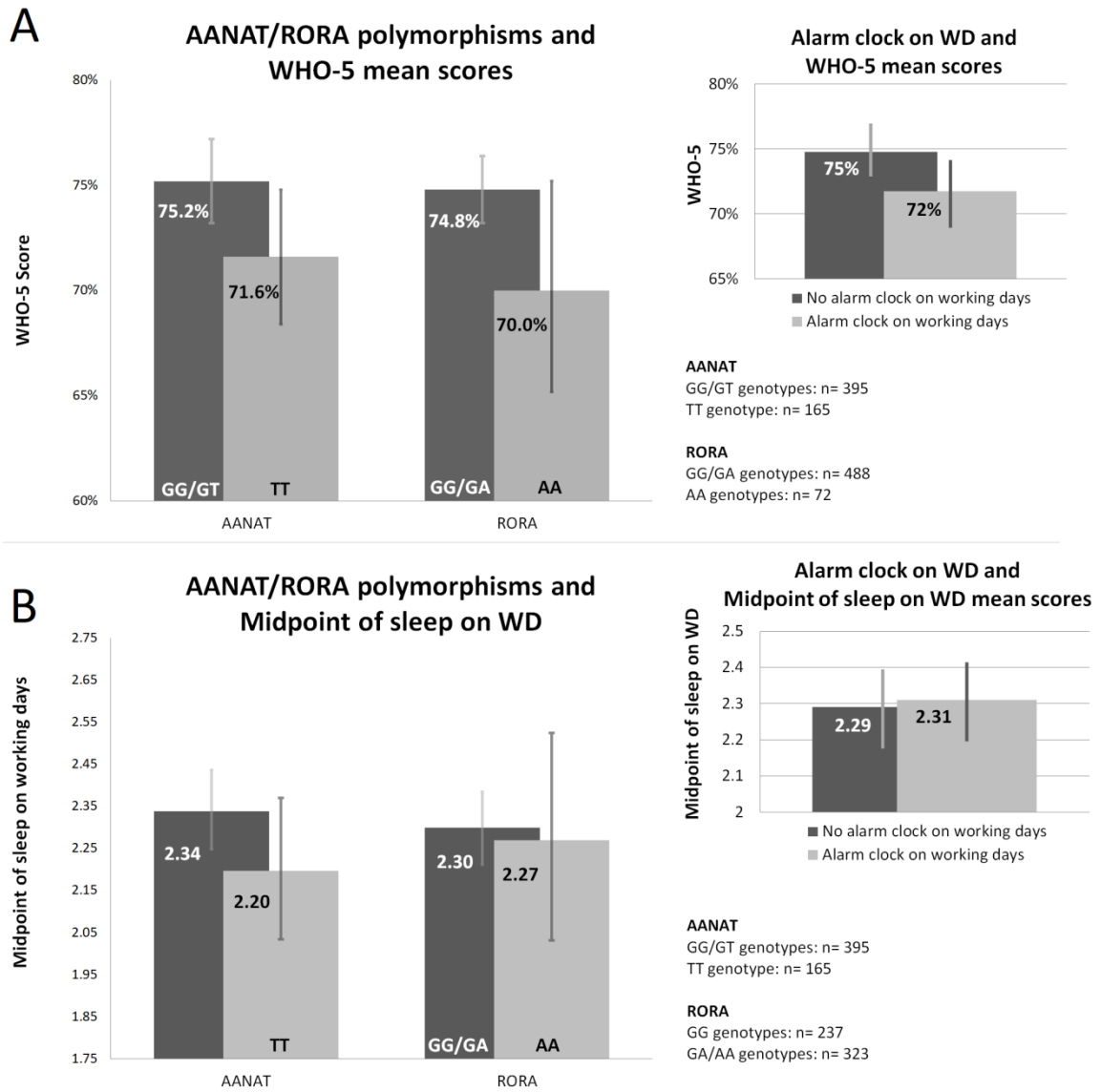
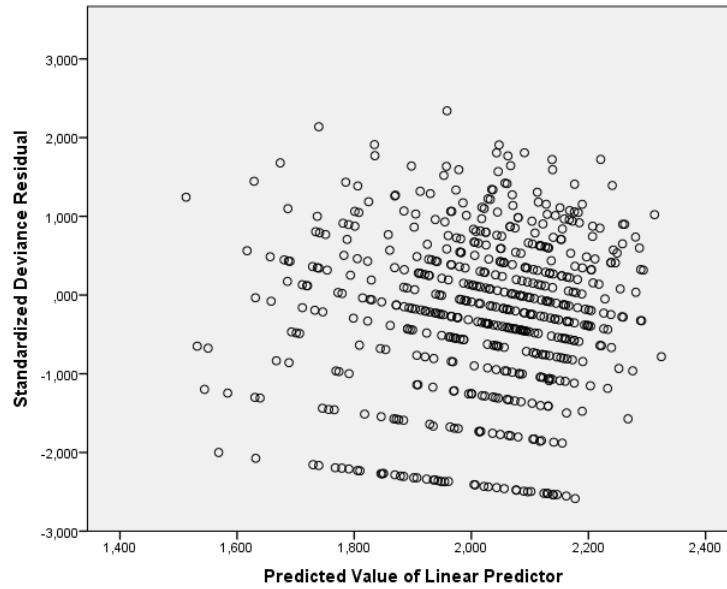


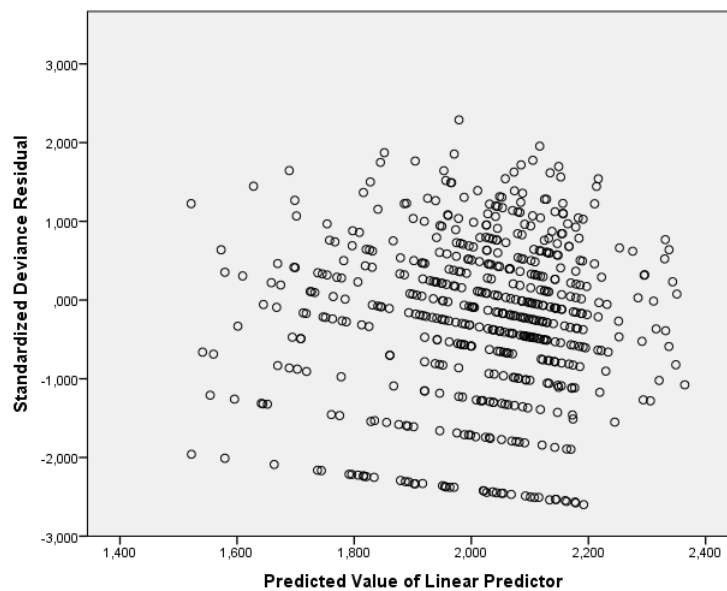
Figure 3 – A. *AANAT* and *RORA* polymorphisms genotypes and WHO-5 mean scores (percentage); Alarm clock on working days and WHO-5 mean scores (percentage). B. *AANAT* and *RORA* polymorphisms genotypes and Midpoint of sleep on working days mean scores; Alarm clock on working days and midpoint of sleep on working days mean scores.

Supplementary File 1 – GZLM parameters and analysis of model residuals.**AANAT Model**

Likelihood Ratio Chi-square= 31,609	Df= 7	p -value< 0.001
-------------------------------------	-------	-------------------

**RORA Model**

Likelihood Ratio Chi-square= 31,599	Df= 7	p -value< 0.001
-------------------------------------	-------	-------------------



TABLES

Table 1 – Sample characteristics (N=560).

	n (%) or median (range)
Sex	
Male	193 (34.5%)
Female	367 (65.5%)
Age	45 (18–65)
Sleep-wake patterns on working days	
Sleep onset time	10:40pm (7:00pm–3:00am)
Sleep end time	6:00am (2:00am–12:00)
Sleep duration	7h55min (3h30min–11h10min)
Midpoint of sleep	2:15am (11:45pm–7:15am)
Alarm clock on working days	225 (40.2%)
Work schedule (days of work / week)	
Up to 5 days/week	126 (22.5%)
6 or more days/week	434 (77.5%)
Work occupation	
Farmer	238 (42.5%)
Unskilled/Semi-skilled worker	193 (34.5%)
Retired †	49 (8.8%)
Manufacturing worker	30 (5.4%)
Others‡	50 (8.9%)

† Formally retired, but with informal working activities declared.
‡ Students, teachers, health professionals, retail workers, police officers, business executives, housemaids.

Table 2 – Demographic, genetic and clinical characteristics of the sample (N = 560).

		Low risk for depression ‡ (n= 253†)	High risk for depression ‡ (n= 307†)	<i>p</i>
Sex	Male	100 (39.5%)	93 (30.3%)	0.022
	Female	153 (60.5%)	214 (69.7%)	
Age		48 (19–65)	42 (18–65)	<0.001
Midsleep time on working days		2:05am (11:50pm–5:42am)	2:17am (11:45pm–7:15am)	0.004
Alarm clock on working days		95 (37.5%)	130 (42.3%)	0.249
rs3760138AANAT	TT	67 (26.5%)	98 (31.9%)	0.160
	GT/GG	186 (73.5%)	209 (68.1%)	
rs782931RORA	AA	26 (10.3%)	46 (15%)	0.098
	AG/GG	227 (89.7%)	261 (85%)	
rs774045TIMELESS	AA	1 (0.4%)	3 (1.0%)	0.413
	AG/GG	251 (99.6%)	301 (99.0%)	
WHO-5 score		22 (20–25)	16 (3–19)	

Data are expressed as frequencies n (%) and median (range).

† In the rs774045 *TIMELESS* analysis, there were missing data from 1 participant from the low risk for depression group and 3 from the high risk for depression group.

‡ Low risk: WHO-5 score 20 or more; High risk: WHO-5 score < 20.

Table 3 – Circadian gene polymorphisms and psychological well-being: mean±SE of WHO-5 score adjusted for age, sex alarm clock use and midsleep time on working days, obtained in the *AANAT* and *RORA* genotypes (N=560).

SNP	Gene	Variant (1/2)	Genotype	Mean±SE	<i>p</i>	Adjusted <i>p</i>
rs3760138	<i>AANAT</i>	T/G	TT	17.9 ± 0.41	0.044	0.088
			TG+GG	18.8 ± 0.24	-	-
rs782931	<i>RORA</i>	A/G	AA	17.5 ± 0.65	0.047	0.094
			AG+GG	18.7 ± 0.22	-	-

SNP: Single Nucleotide Polymorphism; Variant 1 and 2: minor and major allele nucleotides respectively; Mean±SE: WHO-5 scores mean adjusted for sex, age and midsleep time ± Standard Error; *p-value* for the comparison with reference genotypes; adjusted *p-value* after correction for multiple comparisons.

Table S1 – Grandparents ancestry among the sample (N= 2245*).

	N	(valid %)
German	1772	(84.1)
Italian	196	(9.3)
Brazilian	98	(4.7)
Polish	9	(0.4)
Portuguese	10	(0.5)
Spanish	6	(0.3)
Austrian	2	(0.1)
Dutch	5	(0.2)
French	4	(0.2)
Turkish	2	(0.1)
Ukrainian	2	(0.1)
Unknown (missing)	139	

*Mild imbalance between unknown (missing) data and multiple ancestries referred (e.g. German AND Italian).

Table S2 – Genotype distribution in a Brazilian sample of 560* mostly euro descendant rural workers (Carvalho et al., 2019).

SNP	Gene	Genotype	n (%)
rs3760138	<i>AANAT</i>	GG	133 (23.8%)
		GT	262 (46.8%)
		TT	165 (29.5%)
rs782931	<i>RORA</i>	GG	237 (42.3%)
		AG	251 (44.8%)
		AA	72 (12.9%)
rs774045	<i>TIMELESS</i> †	GG	488 (87.8%)
		AG	64 (11.5%)
		AA	4 (0.7%)

SNP: Single Nucleotide Polymorphism

† In the rs774045 *TIMELESS* analysis, there were missing data from 1 participant from the low risk for depression group and 3 from the high risk for depression group.

* Data previously published (Carvalho et al., 2019), with mild differences regarding the number of participants which completed the questionnaires used in this analysis.

Table S3 – Allele frequency of the minor variant nucleotides of the genes comparatively in a mostly euro descendant Brazilian sample (N=560 ‡) (Carvalho et al., 2019)*, in European (non Finnish) population (N=33,370), and in total population (N=60,706) (Lek et al., 2016).

SNP	Gene	Variant (1/2)	AF in this sample	AF in gnomAD European (non Finnish)	AF in gnomAD (Total)
rs3760138	<i>AANAT</i>	T/G	52.8%	53.6%	45.2%
rs782931	<i>RORA</i>	A/G	35.3%	35.5%	45.8%
rs774045	<i>TIMELESS</i>	A/G	6.5%	5.2%	5.8%

SNP: Single Nucleotide Polymorphism; Variant 1 and 2: minor and major allele nucleotides respectively; AF: Allele Frequency.

‡ TIMELESS analysis, N= 556.

* Data previously published (Carvalho et al., 2019), with mild differences regarding the number of participants which completed the questionnaires used in this analysis.

4.3. Artigo 3

Title: Self-Perceived Seasonal Variation and Daily Peak of Mood Symptoms are associated with Risk of Psychiatric Conditions.

Authors: Felipe Gutiérrez Carvalho^{1,2,5}, Melissa A. B. Oliveira^{1,2}, Salina Mathur³, Kristina Epifano³, Maria Paz Hidalgo^{1,2}, Benicio N. Frey^{4,5}.

Affiliations: 1 – Laboratório de Cronobiologia e Sono do Hospital de Clínicas de Porto Alegre HCPA/UFRGS; 2 – Graduate Program in Psychiatry and Behavioral Sciences, UFRGS; 3 – Department of Psychology, Neuroscience & Behaviour, McMaster University; 4 – Mood Disorders Program and Women’s Health Concerns Clinic, St. Joseph’s Healthcare; 5 – Department of Psychiatry and Behavioural Neurosciences, McMaster University.

ABSTRACT

Studies on disruption of circadian rhythmicity show strong evidence linking this phenomenon to depressive symptoms and lower levels of well-being, while the seasonality may also be considered a sign of severe mood symptomatology being associated with a higher risk of suicide. Our group recently developed the Mood Rhythm Instrument (MRhI), a self-reported questionnaire that explores the presence of daily peaks of different symptoms related to mood. Previous studies using MRhI show a relationship between self-perceived daily peaks (DP) of mood behaviors and risk of psychiatric condition. This study aims to verify if the complimentary evaluation of self-reported seasonal variation (SV) of mood behaviors improves the identification of risk of psychiatric conditions. A total of 402 participants answered the MRhI and a seasonal variation assessment of the same MRhI items as complementary data. The Self-Reporting Questionnaire-20 (SRQ-20) was used for screening of psychiatric conditions, and the Reduced Morningness-Eveningness Questionnaire (rMEQ) for chronotype evaluation. Our main findings suggest that (I) daily and seasonal perception of variation among MRhI affective component items (such as sadness, anxiety, and pessimism) correlate in a complementary manner to risk of psychiatric conditions; (II) the association between perceived DP and SV status behaves differently in low and high-risk groups of psychiatric condition. According to previous studies, SCN's neuronal network activity and melatonin pathways are responsible for the regulation of both circadian and seasonal processes. Thus, this finding suggests a possible misalignment between these regulation processes, resulting in a different association between perceived DP and SV of mood symptoms, depending on the risk of psychiatric morbidity. An instrument with the same characteristics of MRhI related to seasonal variance in a follow-up design and extending samples from different regions would promote a deeper understanding of how these findings relate to psychiatric symptoms.

KEYWORDS: Seasonality, Circadian rhythms, Mood, Affective, Psychiatric Condition.

INTRODUCTION

Disturbances in one biological rhythms are correlated with general pathological processes. In relation to mental health, the disruption of circadian rhythmicity and the variation of seasonal patterns are associated with mood disorders (Mondin et al., 2017; Winthorst et al., 2017). Although the understanding linking both circadian and seasonal regulation systems share similar structures (Coomans, Ramkisoensing, & Meijer, 2015), the connection between biological rhythms and psychiatric conditions is not yet fully understood.

Planet Earth's rotation and translation movements are responsible for daily and seasonal fluctuations in photoperiod, light intensity, and temperature. In order to anticipate the rhythmic environmental changes, biological timing adaptation in humans tends to fit in the same patterns. Human consciousness is surely the most perceived daily rhythmic behavior, through the sleep/wake cycle. However, several other functions in our body operate in a rhythmic manner, such as body temperature, hormone secretion (e.g. cortisol and melatonin), and even in intracellular gene expression and protein synthesis processes. This regulatory system is mainly influenced by the activity of the suprachiasmatic nucleus (SCN), our core pacemaker, which receives environmental photic information from the retina and promotes the synchronization between the individual and the environmental rhythms during the 24 hours of light-dark periods. The SCN projects through several structures, being indirectly responsible for the sympathetic stimulation of the pineal gland. This gland is responsible for the synthesis of melatonin in the central nervous system using serotonin as its substrate. Melatonin is secreted into the bloodstream, signaling the changes between dark and light periods to peripheral tissues (Rosenwasser & Turek, 2015). The SCN's neuronal network is also associated with seasonal variations of physiologic and behavioral patterns in mammals. The mechanisms related to the seasonal regulation in molecular and hormonal levels are still not fully understood. Recent findings show that melatonin and thyroid hormones, mainly T3 and the beta unit of TSH, participate in this process, which may be considered as a circannual clock (Wood and Loudon, 2018).

The influence of the circadian system activity upon important regulatory features, such as monoaminergic and glutamatergic transmission, Hypothalamic-pituitary-adrenal axis function, metabolism regulation, and immune response may mediate its connection to mood disturbances (Ketchesin, Becker-Krail, & McClung, 2018). Studies analyzing chronodisruption, defined as a relevant disturbance of the circadian organization of biological

rhythms (Erren & Reiter, 2009), show strong evidence linking this phenomenon to depressive symptoms and lower levels of well-being (De Souza & Hidalgo, 2015; Levandovski et al., 2011). Infradian rhythmicity, rhythms longer than the circadian period (e.g. seasonal variations), also affects important regulatory systems, such as the immune response (Dopico et al., 2015; Pierre, Schlesinger, & Androulakis, 2016). Aside from a specific nosologic diagnosis (Seasonal Affective Disorder), seasonality in mood symptoms may also be considered a sign of severity (Winthorst et al., 2017), and is associated with a higher risk of suicide (Bahk, Han, & Lee, 2014).

Research methodology for behavioral rhythms measurement mainly focuses on the evaluation of rest and activity cycles through objective and subjective parameters. Regarding subjective measures, many existing instruments give a reliable estimation of individual chronotypes, such as the Morningness-Eveningness Questionnaire (MEQ) (Horne & Ostberg, 1976). Still, there is a lack of instruments that can evaluate the rhythms of different components of human behavior properly. Our group recently developed the Mood Rhythm Instrument (MRhI), a self-reported questionnaire that explores the presence of daily peaks of different behavioral components related to mood, such as somatic, cognitive, and affective symptoms (De Souza et al., 2016). Preceding results have shown significant alterations of mood daily peaks perception in high risk of psychiatric conditions groups (Pilz et al., 2018).

In sum, daily and seasonal rhythms regulation systems seem to share similar pathways in mammalian physiology, and previous studies using MRhI show a relationship between self-perceived daily peaks (DP) of mood behaviors and risk of psychiatric condition. Thus, this study aims to verify if the complimentary evaluation of self-reported seasonal variation (SV) of mood behaviors improves the identification of risk of psychiatric conditions (Figure 1).

METHODS

Participants

From an initial sample of 402 subjects, 47 were excluded due to missing data (36 related to SRQ-20 items, 2 missing rMEQ scores, 7 missing seasonal data items, and 2 missing data related to age). The study sample was composed by 355 participants (72.7% females, median age 20 years old, range 18-60) living at Hamilton-ON, Canada. Data collection was conducted between January 2016 and September 2018. The recruitment process was carried out by poster advertisements at McMaster University and St. Joseph's Healthcare Hamilton campuses, and by an online research recruitment tool within the Department of Psychology, Neuroscience & Behaviour at McMaster University. General information of the participants is shown in Table 1.

Procedures

Mood Rhythm Instrument (MRhI): The MRhI is composed of 15 items referring to different aspects of mood in the last 15 days. It assesses the timing of the daily peak for 3 main components constituted by the following items: somatic component - alertness, sleepiness, appetite, sexual arousal, irritability, and motivation to exercise; cognitive component - problem solving, concentration, memory, motivation to talk to friends, and energy; affective component - self-esteem, anxiety, sadness, and pessimism (Oliveira et al., 2019 unpublished). Each item provides a categorical (presence or absence of a daily peak) and a continuous variable (peak time in a 24h period). A seasonal variation assessment of the same items was performed as complementary data (absence of item seasonal variation, item perception increase during the winter season, or item perception decrease during winter season).

Reduced Morningness-Eveningness Questionnaire (rMEQ): The rMEQ questionnaire provides a self-evaluation of chronotype, a unidimensional construct, and offers a classification which varies from evening to morning types. The questionnaire presents 5 questions relative to the time or period of the day when each individual feels more inclined to perform daily activities and to sleep. The total score ranges from 4 to 25, meaning evening types will score from 4 to 11 points; neither types from 12 to 17 points, and morning types from 18 to 25 points (Adan & Almirall, 1991).

Self-Reporting Questionnaire (SRQ-20): Risk for psychiatric conditions was measured through the SRQ-20. This is a self-reported instrument with 20 items in a yes or no answer format, and the total score varies from 0 to 20. It is a useful screening method and it is widely used in several countries. Cut off values of 7/8 are in accordance to SRQ-20 English versions used in UK samples (Upadhyaya, Creed, & Upadhyaya, 1990), meaning low risk for psychiatric conditions when the score is 7 or less, and high risk when the score is 8 or more.

Statistical Analysis

The SRQ-20 continuous score was used in specific descriptive and bivariate analysis for comparison of groups. The normality of the SRQ-20 continuous variable was evaluated by the Shapiro-Wilk test, presenting a right skewed non-normal distribution. Bivariate analyses used Chi-square test (χ^2), Mann-Whitney U test and Kruskal Wallis with Dunn-Bonferroni pairwise adjustment. To get a preliminary understanding regarding the relationship between all daily peak (DP) and seasonal variation (SV) items, Latent Class Analysis (LCA) models with a number of subclasses varying from two to four were designed. The models were evaluated for fit, parsimony and interpretability of the observed variables. The parameters used were entropy, Akaike Information Criterion (AIC), Bayesian Information Criterion (BIC), sample size Adjusted Bayesian Information Criteria (aBIC), and Lo-Mendel-Rubin Likelihood ratio test (LMR LRT) (Finch & Bolin, 2017). Lower AIC and aBIC values suggested better fitting for the 4 latent classes solution, but LMR LRT p-value indicated nonsignificant improvement compared to the 3 classes solution (Table S1). SRQ-20 categorical variable was included in the models as a covariate, and a logistic regression was executed to evaluate the odds ratio between the risk of psychiatric condition and the 3 latent classes. Latent Class 2 (which presented the lower risk of psychiatric condition) was considered the reference group to facilitate interpretation.

In order to evaluate each of the MRhI DP components together with SV data, a daily peak and seasonal variation score variable (DPSV) for each of the items was created. Most of the items presented statistically significant difference between “extreme” groups (DP=0 and SV=0 vs DP=1 and SV=1), and no detectable difference between “intermediate” groups (DP=1 and SV=0 vs DP=0 and SV=1) in the bivariate evaluation in regards to SRQ-20 continuous score (results available in supplementary files, Table S2). Thus, the DPSV scores groups were more suitable to be arranged as DPSV0= no daily peak/seasonal variation perceived; DPSV1= daily peak or seasonal variation perceived; DPSV2= both daily peak and

seasonal variation perceived. The DPSV components scores were calculated as the sum of the specific items for each component (Cognitive, Somatic, and Affective). A Poisson model was used to estimate the prevalence ratios (PR) and respective 95% confidence intervals (CI95%) of each of the DPSV items separately by components, and a final model adjusting for sex, age and chronotype was performed with the DPSV components scores. PASW Statistics Version 18 (SPSS Inc., Chicago, IL) and Mplus version 6.12 were used for statistical analyses. Statistical significance was accepted at $p < 0.05$.

Ethical aspects

The procedures of the study were executed only after the written informed consent of the participants. The study was approved by the Hamilton Integrated Research Ethics Board and was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki.

RESULTS

The LCA probability scale for DP and SV clarifies the relationship between the risk of psychiatric condition, and perceived daily and seasonal variations in a person-centered clustering of the MRhI items (Figure 2 and Table S3). Three different patterns of response were observed: Latent Class 1 - Strong perceived daily and seasonal variation, which included perceived DP and SV of alertness, appetite, irritability, motivation to exercise, concentration, talk to friends, energy, self-esteem, anxiety, sadness, and pessimism, DP of problem solving, and SV of sleepiness; Latent Class 2 - Weak perceived daily variation, which included only DP of sleepiness and concentration; and Latent Class 3 - Intermediate perception of mostly daily variation, which included perceived DP and SV of sleepiness, motivation to exercise, and energy, and DP of alertness, appetite, irritability, problem solving, and concentration. Table 2 shows the logistic regression results considering SRQ-20 as the dependent variable and the latent classes as independent variables. Setting the Latent Class 2 (Weak perceived daily variation) as the reference group, since it presented the lowest values of SRQ-20 (lower risk of psychiatric condition), the Latent Class 1 (Strong perceived daily and seasonal variation) showed an OR of 14.92 (p -value < 0.001); Latent Class 3 (Intermediate perception of mostly daily variation) OR was not statistically significant (p -value = 0.327).

In an item by item approach, the bivariate analysis between DP and SV data for each MRhI item comparatively between low and high risk of psychiatry condition groups showed significant results Table 3. Perceived DP associated to perceived SV in sleepiness, self-esteem, sexual arousal, irritability, anxiety, sadness, and talking to friends in the low risk group, but this association was not maintained in the high-risk group; in the opposite direction, memory perceived DP was not associated with perceived SV in the low risk group, but showed association in the high-risk group. Appetite, pessimism, and energy kept DP and SV association in both groups. Alertness, Sleepiness, Concentration, and Exercise DP and SV were not associated in any of the low and high risk groups.

The bivariate analysis between SRQ-20 continuous score and DP and SV data of each of the MRhI items showed that the items were not suitable for a linear design with 4 categories. Sleepiness, sexual arousal, and energy showed no differences between groups. All the other items were redeemable to 3 categories transformed variable (DPSV score transformation, as described in Methods). Details of the pairwise comparisons between SRQ-20 continuous score and the 4 categories of DP and SV data are shown in Table S2. Figure 3

shows pairwise comparisons between the DPSV score groups and the median values of SRQ-20 scores for each item. Problem-solving, Memory, Talking to friends, Anxiety, Sadness, and Pessimism DPSV2 groups presented median values above the threshold for risk of psychiatric condition; Irritability and Self-esteem DPSV2 groups showed borderline median values; Alertness, Sleepiness, Appetite, Sexual arousal, Motivation to exercise, Concentration, and Energy presented DPSV median scores below the SRQ-20 threshold.

The final model including the DPSV scores for each component adjusted for sex, age and chronotype is shown in Table 4. The results emphasize the association between risk of psychiatric condition and DPSV Affective score (PR= 1.226, $p < 0.001$), Female sex (PR= 1.506, $p = 0.039$), and lower ages (PR= 0.925, $p = 0.012$). Table S5 shows the multivariate analysis between DPSV scores and risk of psychiatric condition for each the MRhI items separately by its components (Somatic, Cognitive, and Affective). In the Somatic component, both the Irritability DPSV groups associated to higher risk of psychiatric condition (DPSV2: PR= 3.578, $p < 0.001$; DPSV1: PR= 3.387, $p < 0.001$), and both Motivation to exercise DPSV groups conferred lower risk of psychiatric condition (DPSV2: PR= 0.482, $p < 0.001$; DPSV1: PR= 0.668, $p = 0.040$). In the cognitive component, both Talking to friends DPSV groups conferred higher risk of psychiatric condition (DPSV2: PR= 3.148, $p < 0.001$; DPSV1: PR= 2.249, $p = 0.001$). In the affective component, higher risk for psychiatric condition was associated to Anxiety DPSV2 group (PR= 1.738, $p = 0.039$), Pessimism DPSV1 group (PR= 1.475, $p = 0.031$), and both Sadness DPSV groups (DPSV2: PR= 2.293, $p = 0.004$; DPSV1: PR= 1.873, $p = 0.026$).

DISCUSSION

This study is an initial observational approach to better understand the relationship between two well-known relevant factors for mental health outcomes: circadian variation and seasonality. Our main findings suggest that (I) daily and seasonal perception of variation among MRhI affective component items correlate in a complementary manner to risk of psychiatric conditions; (II) the association between perceived DP and SV status behaves differently in low and high risk groups of psychiatric condition.

The LCA results highlight interesting findings in a person-centered clustering of the MRhI items (Figure 2 and Table S3). There is a clear distinction in items clustering among the 3 Latent Classes, from a weak perceived daily variation (Latent Class 2), to an intermediate perception of mostly daily variation (Latent Class 3), and, finally, to a strong perceived daily and seasonal variation (Latent Class 1). The higher OR found in the Latent Class 1 group may be explained by two main characteristics: (A) the presence of perceived DP and SV in affective component items, which is not observed in latent classes 2 and 3; (B) a higher frequency of perceived SV in all the items when compared to latent classes 2 and 3. The characteristic (A) is supported by our results in the final multivariate model (Table 4). The characteristic (B) supports preceding studies which point seasonality as a sign of the severity of mood symptomatology (Bahk et al., 2014; Winthorst et al., 2017).

The comparison of the association between DP and SV separately in the low and high risk of psychiatric disorder groups Table 3 introduces an understanding of the relationship among these factors. According to previous studies, SCN's neuronal network activity and melatonin pathways are responsible for the regulation of both circadian and seasonal processes (Coomans et al., 2015). Thus, this finding suggests a possible misalignment between these regulation processes, resulting in a different association between perceived DP and SV of mood symptoms, depending on the risk of psychiatric morbidity. Considering the 3 MRhI components, affective component items were proportionally more likely to present a change from an association between DP and SV values in low risk of psychiatric condition group to an absent association in high risk group (indicated in bold): 75% of the affective items *vs* 50% of the somatic items *vs* 40% of the cognitive items.

One interesting question sparked by these analyses would be to determine if any worse perceptive characteristics exist (i.e, if DP perception is worse than SV perception in specific

items for mental health outcomes). The complete analysis between risk of psychiatric condition and DP and SV perception (Table S2) clarifies the answer, and explains the clustering of DPSV score variable in 3 instead of 4 groups. None of the items presented differences among all 4 combinations of DP and SV data (Table S2). On the other hand, the analysis with the merged variable of the intermediate groups (DP=1 and SV=0, DP=0 and SV=1) showed better discrimination among the DPSV groups. This finding speaks against a linear concept of severity between SRQ-20 scores and DP and SV perception, since there are no differences between intermediate groups. Moreover, we can observe that several items presented a statistically significant difference between DPSV2 and DPSV1 groups, and only 3 of the 15 items presented no statistically significant difference between DPSV2 and DPSV0 in relation to SRQ-20 scores (i.e., Sleepiness, Sexual arousal, and Exercise). Although there was no general conclusion of a stronger contribution of DP or SV perception to risk of psychiatric condition in the bivariate analysis, the LCA results indicates a stronger influence of seasonality on worse mental health outcomes (Figure 2 and Table S3).

The behavior of the associations observed above was clarified in the multivariate analysis for each MRhI component (Table S5). In the affective component, 3 of 4 higher DPSV items scores showed an association to a higher risk of psychiatric condition - sadness in both DPSV groups, pessimism in DPSV1 group, and anxiety in DPSV2 group. A stronger correlation of the affective component to risk of psychiatric outcome agrees with the results shown in Table 3. Although we could not find similar results related to this specific finding in the literature, a higher general perception in negative affective emotions (such as sadness, anxiety, and pessimism) is expected in groups with a higher risk of psychiatric condition. In turn, this could also explain a higher perceived rhythmicity related to these emotions in the high risk of psychiatric conditions group. A clear cumulative effect of DPSV value over risk of psychiatric condition could be observed in the sadness item (Table S5 and Figure 3).

In the somatic component, irritability was associated with higher risk of psychiatric condition in both DPSV1 and DPSV2 groups, while motivation to exercise was associated with lower risk. Interestingly, the association of motivation to exercise between DP and SV showed no differences in the risk of psychiatric condition groups (Table 3), the bivariate analysis also did not show a clear correlation between its DPSV score and SRQ-20 score (Figure 3). One possible explanation for the phenomenon observed may be that perceived DP and SV in motivation to exercise associates better mental health in people who are used to practice physical exercises in a daily or seasonal pattern, compared to people who are not.

This hypothesis is in accordance with studies that reinforce the positive effects of physical exercise on mental health (Zschucke, Gaudlitz, & Ströhle, 2013).

In the cognitive component, motivation to talk to friends was associated with a higher risk of psychiatric conditions in both DPSV score groups. This item has a clear social interaction characteristic, and the finding may reflect the detection of avoidant behavior traits, which are more prevalent in depressive states (Kupferberg, Bicks, & Hasler, 2016).

The final model (Table 4), which is controlled by age, sex and chronotype, confirms the correlation between affective component DPSV score and risk of psychiatric condition. Interestingly, the usual association between evening chronotypes and worse psychiatric outcomes (De Souza & Hidalgo, 2015; Levandovski et al., 2011) were not replicated in this study. A possible explanation for this result is that the presence of DPSV component scores in the model may provide a better explanation of the association between behavioral rhythms and psychiatric morbidity than just the chronotype characteristic. Also, as most of the sample was composed of young participants, and as late chronotypes are more prevalent in this age group, the sample may have overestimated this chronotype, impairing its comparison to earlier rhythms.

Limitations: Since this was a cross-sectional study, causal inferences cannot be considered in our results. The low variance in age among the participants also may impair the validity of these results to younger or older age groups.

CONCLUSION

In sum, our findings show that seasonal variation is an important parameter to be measured in a similar method as the daily peak of mood behaviors and symptoms. Both these parameters correlate in a complementary manner to risk of psychiatric conditions, and an instrument with the same characteristics of MRhI related to seasonal variance in a follow-up design would promote a deeper understanding of how these findings relate to psychiatric symptoms. Future research should also consider extending samples from different regions, since seasonal external characteristics experience influences from a variety of factors, such as latitude, altitude, continentality and topography.

ORCID ID – Benicio N. Frey: <https://orcid.org/0000-0001-8267-943X>

REFERENCES

- Adan, A., & Almirall, H. (1991). Horne & Östberg morningness-eveningness questionnaire: A reduced scale. *Personality and Individual Differences*, 12(3), 241–253. [https://doi.org/10.1016/0191-8869\(91\)90110-W](https://doi.org/10.1016/0191-8869(91)90110-W)
- Bahk, Y.-C., Han, E., & Lee, S.-H. (2014). Biological rhythm differences and suicidal ideation in patients with major depressive disorder. *Journal of Affective Disorders*, 168, 294–297. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jad.2014.07.001>
- Coomans, C. P., Ramkisoensing, A., & Meijer, J. H. (2015). The suprachiasmatic nuclei as a seasonal clock. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 37, 29–42. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2014.11.002>
- De Souza, C. M., Carissimi, A., Costa, D., Francisco, A. P., Medeiros, M. S., Ilgenfritz, C. A., ... Hidalgo, M. P. (2016). The mood rhythm instrument: Development and preliminary report. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, 38(2), 148–153. <https://doi.org/10.1590/1516-4446-2015-1763>
- De Souza, C. M., & Hidalgo, M. P. L. (2015). The midpoint of sleep on working days: A measure for chronodisruption and its association to individuals' well-being. *Chronobiology International*, 32(3), 341–348. <https://doi.org/10.3109/07420528.2014.979941>
- Dopico, X. C., Evangelou, M., Ferreira, R. C., Guo, H., Pekalski, M. L., Smyth, D. J., ... Todd, J. A. (2015). Widespread seasonal gene expression reveals annual differences in human immunity and physiology. *Nature Communications*, 6, 7000. <https://doi.org/10.1038/ncomms8000>
- Erren, T. C., & Reiter, R. J. (2009). Defining chronodisruption. *Journal of Pineal Research*, 46(3), 245–247. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2009.00665.x>
- Finch, W. H., & Bolin, J. E. (2017). *Multilevel modeling using Mplus*. (C. and Hall, Ed.), *Multilevel Modeling Using Mplus*. New York: CRC. <https://doi.org/10.1201/9781315165882>
- Horne, J. A., & Ostberg, O. (1976). A self-assessment questionnaire to determine morningness-eveningness in human circadian rhythms. *International Journal of Chronobiology*, 4(2), 97–110.
- Ketchesin, K. D., Becker-Krail, D., & McClung, C. A. (2018). Mood-related central and peripheral clocks. *European Journal of Neuroscience*, 0(0). <https://doi.org/10.1111/ejn.14253>
- Kupferberg, A., Bicks, L., & Hasler, G. (2016). Social functioning in major depressive disorder. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 69, 313–332. <https://doi.org/10.1016/J.NEUBIOREV.2016.07.002>
- Levandovski, R., Dantas, G., Fernandes, L. C., Caumo, W., Torres, I., Roenneberg, T., ... Allebrandt, K. V. (2011). Depression scores associate with chronotype and social jetlag in a rural population. *Chronobiology International*, 28(9), 771–778.

<https://doi.org/10.3109/07420528.2011.602445>

- Mondin, T. C., Cardoso, T. de A., Souza, L. D. de M., Jansen, K., da Silva Magalhães, P. V., Kapczinski, F., & da Silva, R. A. (2017). Mood disorders and biological rhythms in young adults: A large population-based study. *Journal of Psychiatric Research*, 84, 98–104. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2016.09.030>
- Pierre, K., Schlesinger, N., & Androulakis, I. P. (2016). The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in modulating seasonal changes in immunity. *Physiological Genomics*, 48(10), 719–738. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00006.2016>
- Pilz, L. K., Carissimi, A., Oliveira, M. A. B., Francisco, A. P., Fabris, R. C., Medeiros, M. S., ... Hidalgo, M. P. (2018). Rhythmicity of Mood Symptoms in Individuals at Risk for Psychiatric Disorders. *Scientific Reports*, 8(1), 11402. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29348-z>
- Rosenwasser, A. M., & Turek, F. W. (2015). Neurobiology of Circadian Rhythm Regulation. *Sleep Medicine Clinics*, 10(4), 403–412. <https://doi.org/10.1016/J.JSMC.2015.08.003>
- Upadhyaya, A., Creed, F., & Upadhyaya, M. (1990). Psychiatric morbidity among mothers attending well-baby clinic: a cross-cultural comparison. *Acta Psychiatrica Scandinavica*, 81(2), 148–151. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0447.1990.tb06469.x>
- Winthorst, W. H., Roest, A. M., Bos, E. H., Meesters, Y., Penninx, B. W. J. H., Nolen, W. A., & de Jonge, P. (2017). Seasonal affective disorder and non-seasonal affective disorders: Results from the NESDA study. *BJPsych Open*, 3(4), 196–203. <https://doi.org/10.1192/bjpo.bp.116.004960>
- Zschucke, E., Gaudlitz, K., & Ströhle, A. (2013). Exercise and physical activity in mental disorders: clinical and experimental evidence. *Journal of Preventive Medicine and Public Health = Yebang Uihakhoe Chi*, 46 Suppl 1(Suppl 1), S12–S21. <https://doi.org/10.3961/jpmph.2013.46.S.S12>

FIGURES AND TABLES

Figure 1 – Hypothesis and Models of the study analysis.

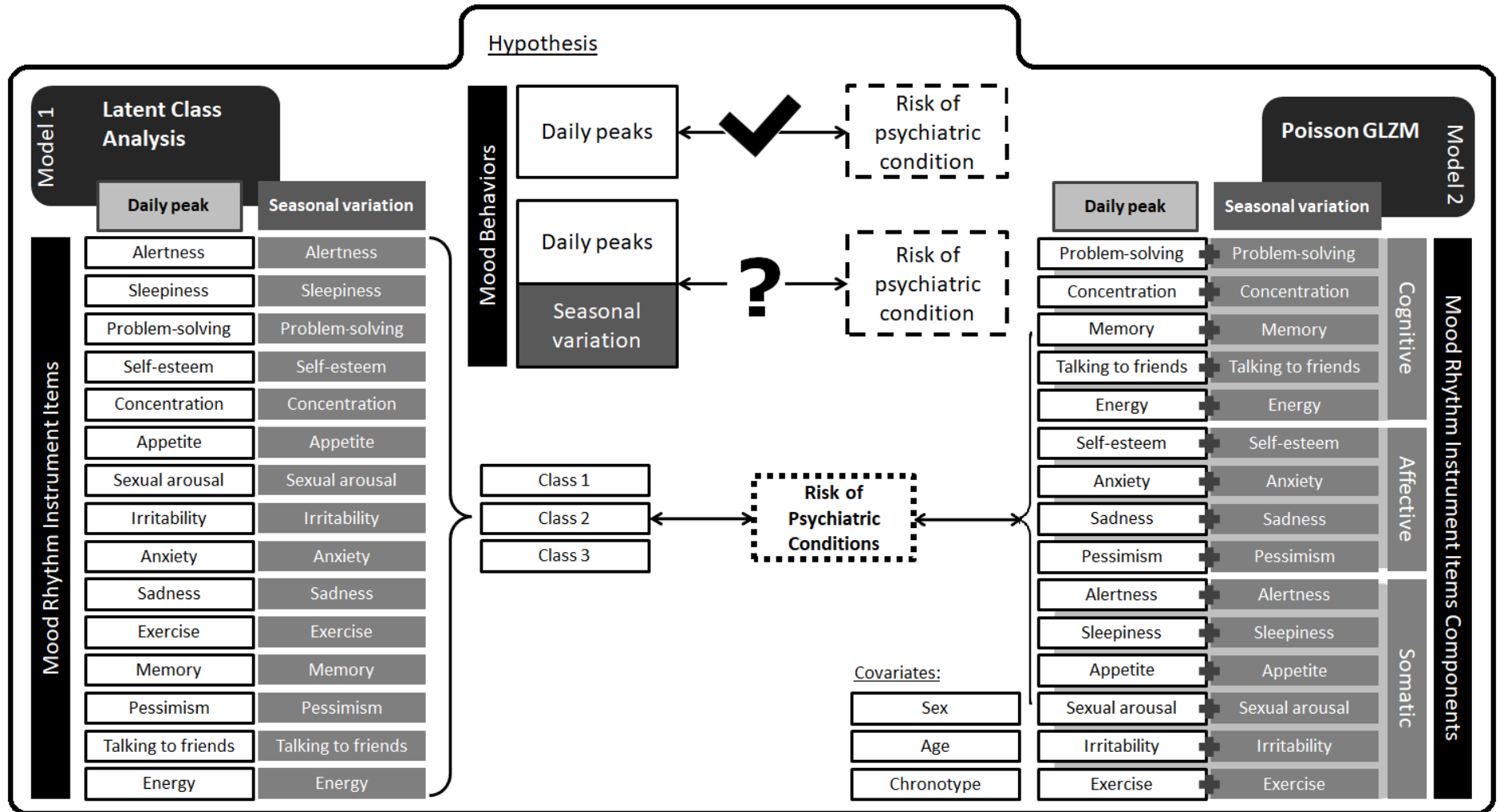


Figure 2 – Probability scale for DP and SV in significant MRHI Items for the three latent classes solution.

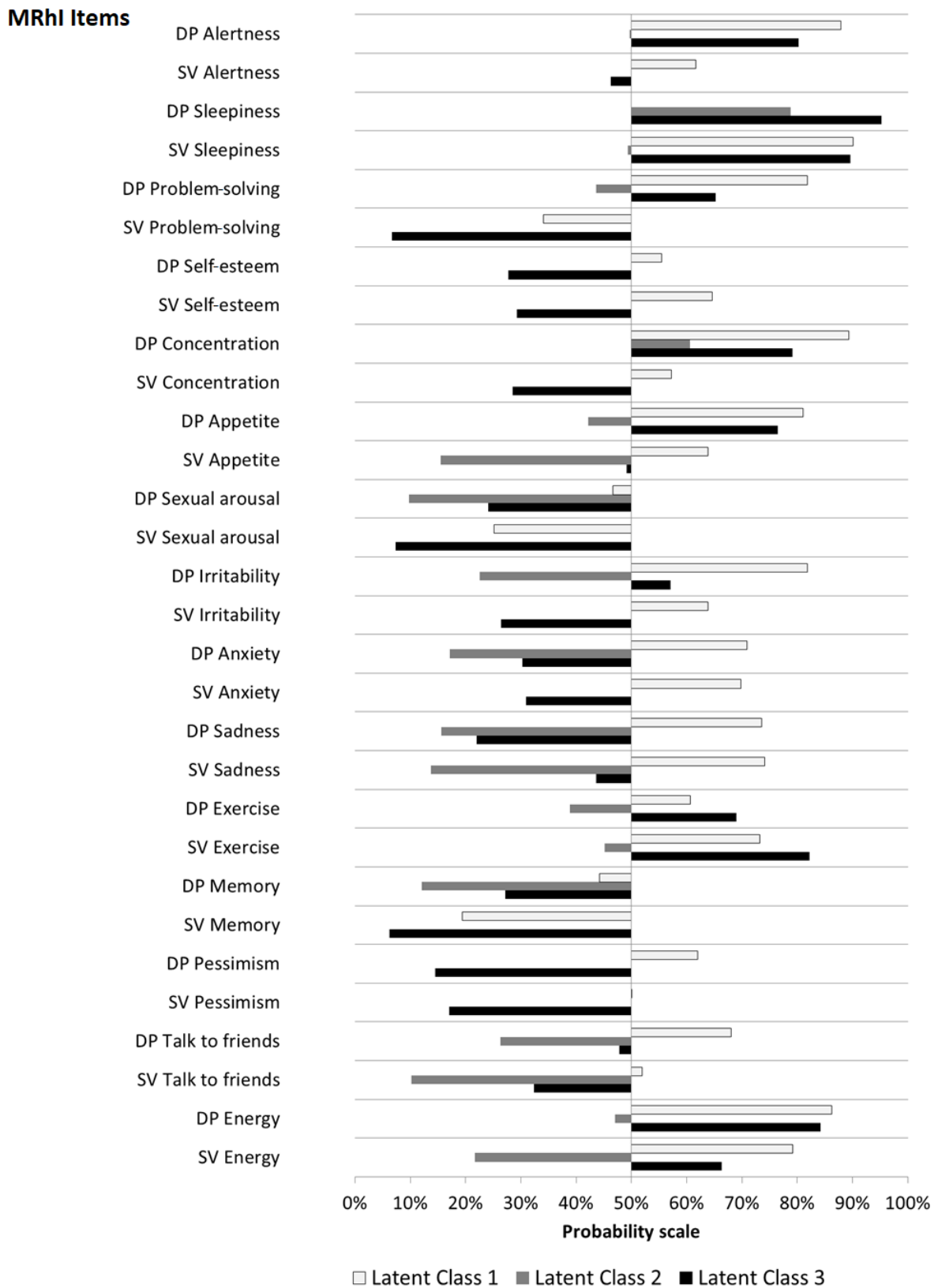


Figure 3 – Univariate analysis between the DPSV groups and SRQ-20 scores. Pairwise comparisons between the DPSV variable groups for each of the MRHI items. Dotted line: threshold for risk of psychiatric condition (7 or less, 8 or more); † Statistically significant difference between groups, but no statistical difference after Dunn-bonferroni correction; ‡ No statistically significant difference between groups; * Statistically significant difference in pairwise comparisons (adjusted $p < 0.05$).

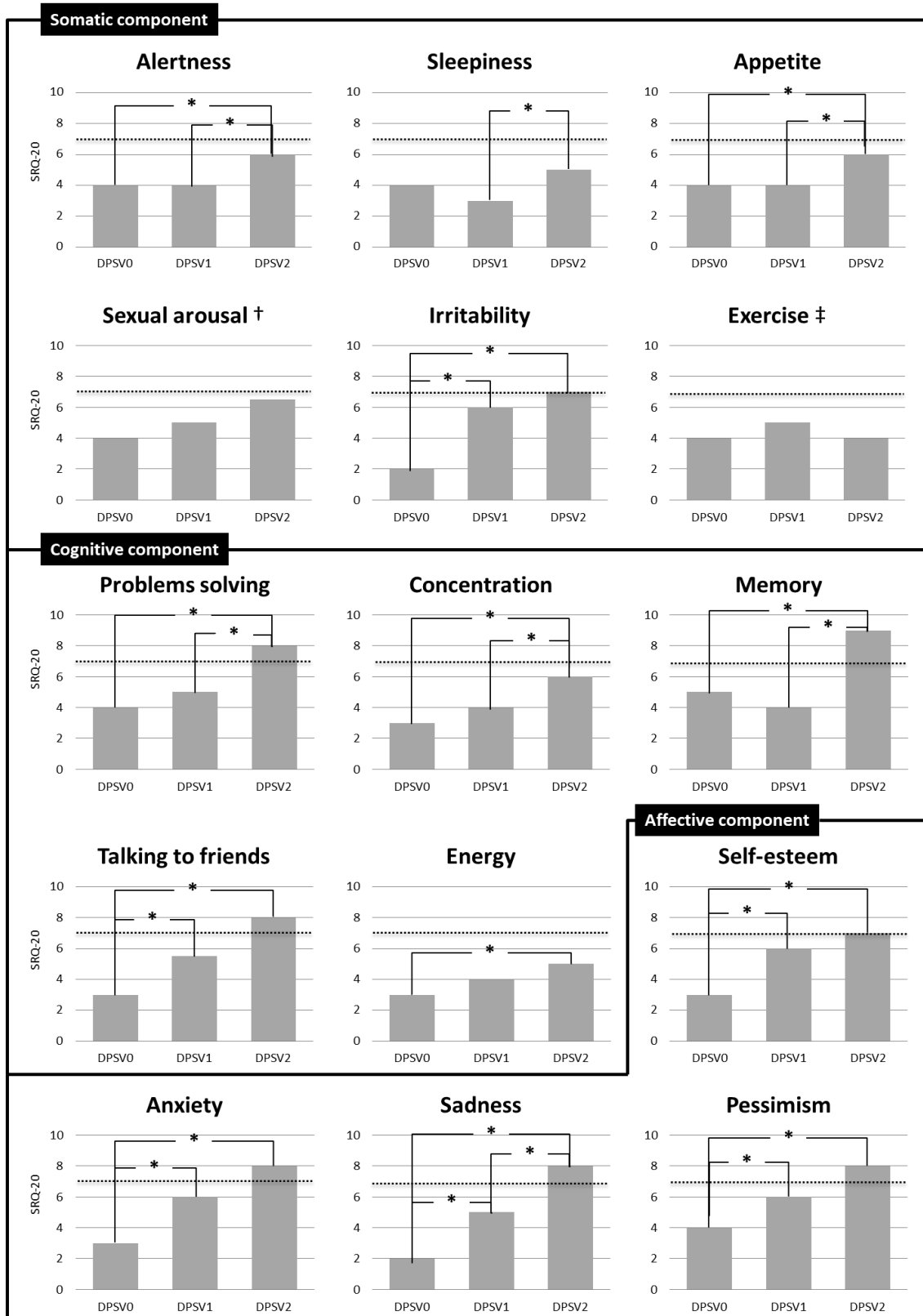


Table 1 – Descriptive data of the sample (N= 355).

		n(%) or median (range)	
Sex			
	Men		97 (27.3)
	Women		258 (72.7)
Age			20 (18-60)
Chronotype			
	Morning type		52 (14.6)
	Intermediate type		186 (52.4)
	Evening type		117 (33.0)
Alertness	DP	274 (77.2)	SV 153 (43.1)
Sleepiness	DP	333 (93.8)	SV 291 (82.0)
Problem-solving	DP	239 (67.3)	SV 56 (15.8)
Self-esteem	DP	123 (34.6)	SV 135 (38.0)
Concentration	DP	282 (79.4)	SV 124 (34.9)
Appetite	DP	254 (71.5)	SV 171 (48.2)
Sexual arousal	DP	106 (29.9)	SV 45 (12.7)
Irritability	DP	212 (59.7)	SV 127 (35.8)
Anxiety	DP	153 (43.1)	SV 144 (40.6)
Sadness	DP	143 (40.3)	SV 175 (49.3)
Motivation to Exercise	DP	213 (60.0)	SV 254 (71.5)
Memory	DP	109 (30.7)	SV 37 (10.4)
Pessimism	DP	109 (30.7)	SV 95 (26.8)
Talking to friends	DP	182 (51.3)	SV 126 (35.5)
Energy	DP	276 (77.7)	SV 222 (62.5)
SRQ-20 score			5 (0-20)

DP: Daily peak; SV: Seasonal variation.

Table 2 – Logistic regression between high risk of psychiatric condition (SRQ-20 score > 7 points) and the latent classes.

	Estimate	S.E.	OR	95% CI	p-value
Latent Class 1	2.703	0.515	14.924	5.441 - 40.935	<0.001
Latent Class 3	0.576	0.588	1.779	0.562 - 5.629	0.327
Latent Class 2	<i>(Reference)</i>		1.000		

S.E.: Standard error; OR: Odds ratio; 95% Confidence interval.

Latent class 2 was used as reference.

Table 3 – Results of the bivariate analysis between DP and SV items separately in low and high risk of psychiatric condition groups.

	Low Risk (n= 243)				High Risk (n= 112)			
	DP	SV	χ^2	Adj. <i>p</i>	DP	SV	χ^2	Adj. <i>p</i>
	n (%)				n (%)			
Alertness	184 (75.7)	89 (36.6)	4.21	0.08	90 (80.4)	64 (57.1)	0.57	0.90
Sleepiness†	223 (91.8)	191 (78.6)	14.63	<0.01*	110 (98.2)	100 (89.3)	3.29	0.41
Problem-solving	160 (65.8)	26 (10.7)	1.59	0.41	79 (70.5)	30 (26.8)	0.74	0.78
Self-esteem	74 (30.5)	75 (30.9)	6.06	0.03*	49(43.8)	60 (53.6)	0.45	1.00
Concentration	193 (79.4)	69 (28.4)	2.18	0.28	89 (79.5)	55 (49.1)	2.38	0.25
Appetite	170 (70.0)	104 (42.8)	11.99	<0.01*	84 (75.0)	67 (59.8)	9.03	0.01*
Sexual arousal	66 (27.2)	25 (10.3)	11.72	<0.01*	40 (35.7)	20 (17.9)	2.16	0.28
Irritability	121 (49.8)	75 (30.9)	21.40	<0.01*	91 (81.3)	52 (46.4)	0.13	1.00
Anxiety	81 (33.3)	81 (33.3)	18.75	<0.01*	72 (64.3)	63 (56.3)	1.94	0.33
Sadness	72 (29.6)	101 (41.6)	21.00	<0.01*	71 (63.4)	74 (66.1)	1.64	0.40
Motivation to Exercise	156 (64.2)	173 (71.2)	0.08	1.00	57 (50.9)	81 (72.3)	0.11	1.00
Memory†	74 (30.5)	16 (6.6)	1.43	0.53	35 (31.3)	21 (18.8)	8.07	0.01*
Pessimism	54 (22.2)	51 (21.0)	26.82	<0.01*	55 (49.1)	44 (39.3)	6.12	0.03*
Talking to friends	107 (44.0)	67 (27.6)	9.22	0.04*	75 (67.0)	59 (52.7)	0.36	1.00
Energy	187 (77.0)	142 (58.4)	13.13	<0.01*	75 (67.0)	80 (71.4)	5.26	0.04*

Low Risk: SRQ-20 = 7 or less; High Risk: SRQ-20 = 8 or more; DP: Daily peak; SV: Seasonal variation; χ^2 : Pearson chi-square.

Chi-square test: All the variables, except Sleepiness and Memory.

† Fisher's exact test - Sleepiness: both groups; Memory: Low Risk group.

Bonferroni correction for 2 tests was applied for all the items (adjusted $p = p\text{-value} \times 2$).

Change of correlation between low and high risk groups is indicated in **bold**.

* $p < 0.05$

Table 4 – Multivariate analysis between MRhI DPSV component scores and Risk of psychiatric condition adjusted by Sex, Age and Chronotype.

	PR	95%CI	<i>p</i>
DPSV Affective *	1.22	1.14 - 1.31	<0.001
DPSV Cognitive	1.06	0.98 - 1.15	0.13
DPSV Somatic	1.00	0.93 - 1.07	0.99
Sex *	1.51	1.02 - 2.23	0.04
Age *	0.93	0.87 - 0.98	0.01
Evening Chronotype ‡	1.62	0.91 - 2.90	0.10
Intermediate Chronotype ‡	1.29	0.73 - 2.28	0.38

PR: Prevalence ratio; 95%CI: PR 95% Confidence interval; MRhI: Mood Rhythms Instrument; DPSV: Compound variable including Daily peak and Seasonal variation; Risk of psychiatric condition: Low risk - SRQ-20 score of 7 or less; high risk - SRQ-20 score of 8 or more.

‡ Morning chronotype was used as the reference level of comparison due to the lower values in SRQ-20 score.

* $p < 0.05$

Table S1 – LCA model fit evaluation information.

	1 Class	2 Classes	3 Classes	4 Classes
AIC	13124.44	11798.44	11641.857	11535.671
BIC	13248.348	12038.511	12005.836	12023.558
aBIC	13146.83	11841.82	11707.627	11623.831
Entropy		0.841	0.828	0.857
LMR LRT		917.77	219.415	169.285
		p< 0.001	p=0.030	p=0.339
N (for each class)	C1= 355	C1= 206 C2= 149	C1= 134 C2= 73 C3= 148	C1= 142 C2= 28 C3= 73 C4= 112

AIC: Akaike Information Criterion; BIC: Bayesian Information Criterion; aBIC: sample size Adjusted Bayesian Information Criteria; LMR LRT: Lo-Mendel-Rubin Likelihood ratio test.

Bold: Chosen model of 3 Latent classes due to better fit of parameters.

Table S2 – Pairwise comparison between groups according to DP and SV status in relation to SRQ-20 scores.

	Groups of comparison			<i>Adj. p</i>		Groups of comparison			<i>Adj. p</i>
Alertness	DP0 SV0	DP0 SV1		0.436	Irritability	DP0 SV0	DP0 SV1		<0.001
	DP0 SV0	DP1 SV0		0.019		DP0 SV0	DP1 SV0		0.027
	DP0 SV0	DP1 SV1		<0.001		DP0 SV0	DP1 SV1		<0.001
	DP0 SV1	DP1 SV0		0.294		DP0 SV1	DP1 SV0		1.000
	DP0 SV1	DP1 SV1		0.012		DP0 SV1	DP1 SV1		1.000
	DP1 SV0	DP1 SV1		1.000		DP1 SV0	DP1 SV1		0.427
Sleepiness	DP0 SV0	DP0 SV1		1.000	Anxiety	DP0 SV0	DP0 SV1		<0.001
	DP0 SV0	DP1 SV0		1.000		DP0 SV0	DP1 SV0		0.001
	DP0 SV0	DP1 SV1		0.358		DP0 SV0	DP1 SV1		<0.001
	DP0 SV1	DP1 SV0		1.000		DP0 SV1	DP1 SV0		1.000
	DP0 SV1	DP1 SV1		0.054		DP0 SV1	DP1 SV1		1.000
	DP1 SV0	DP1 SV1		0.096		DP1 SV0	DP1 SV1		0.134
Problem-solving	DP0 SV0	DP0 SV1		1.000	Sadness	DP0 SV0	DP0 SV1		<0.001
	DP0 SV0	DP1 SV0		0.017		DP0 SV0	DP1 SV0		0.002
	DP0 SV0	DP1 SV1		0.001		DP0 SV0	DP1 SV1		<0.001
	DP0 SV1	DP1 SV0		0.036		DP0 SV1	DP1 SV0		0.237
	DP0 SV1	DP1 SV1		0.002		DP0 SV1	DP1 SV1		1.000
	DP1 SV0	DP1 SV1		1.000		DP1 SV0	DP1 SV1		0.001
Self-esteem	DP0 SV0	DP0 SV1		0.027	Memory	DP0 SV0	DP0 SV1		1.000
	DP0 SV0	DP1 SV0		<0.001		DP0 SV0	DP1 SV0		0.438
	DP0 SV0	DP1 SV1		<0.001		DP0 SV0	DP1 SV1		0.034
	DP0 SV1	DP1 SV0		1.000		DP0 SV1	DP1 SV0		0.477
	DP0 SV1	DP1 SV1		0.187		DP0 SV1	DP1 SV1		0.046
	DP1 SV0	DP1 SV1		1.000		DP1 SV0	DP1 SV1		1.000
Concentration	DP0 SV0	DP0 SV1		1.000	Pessimism	DP0 SV0	DP0 SV1		<0.001
	DP0 SV0	DP1 SV0		1.000		DP0 SV0	DP1 SV0		0.038
	DP0 SV0	DP1 SV1		0.007		DP0 SV0	DP1 SV1		<0.001
	DP0 SV1	DP1 SV0		1.000		DP0 SV1	DP1 SV0		0.978
	DP0 SV1	DP1 SV1		<0.001		DP0 SV1	DP1 SV1		1.000
	DP1 SV0	DP1 SV1		1.000		DP1 SV0	DP1 SV1		0.173
Appetite	DP0 SV0	DP0 SV1		1.000	Talking to friends	DP0 SV0	DP0 SV1		<0.001
	DP0 SV0	DP1 SV0		1.000		DP0 SV0	DP1 SV0		0.002
	DP0 SV0	DP1 SV1		0.006		DP0 SV0	DP1 SV1		<0.001
	DP0 SV1	DP1 SV0		1.000		DP0 SV1	DP1 SV0		1.000
	DP0 SV1	DP1 SV1		0.002		DP0 SV1	DP1 SV1		0.304
	DP1 SV0	DP1 SV1		0.507		DP1 SV0	DP1 SV1		0.791
Sexual arousal	DP0 SV0	DP0 SV1		0.434	Energy	DP0 SV0	DP0 SV1		1.000
	DP0 SV0	DP1 SV0		1.000		DP0 SV0	DP1 SV0		0.203
	DP0 SV0	DP1 SV1		0.133		DP0 SV0	DP1 SV1		0.064
	DP0 SV1	DP1 SV0		1.000		DP0 SV1	DP1 SV0		0.154
	DP0 SV1	DP1 SV1		1.000		DP0 SV1	DP1 SV1		0.015
	DP1 SV0	DP1 SV1		1.000		DP1 SV0	DP1 SV1		1.000

DP: Daily peak; SV: Seasonal variation; Motivation to Exercise was not included in the table due to non-statistical significance.

Kruskal-Wallis Test and Dunn-Bonferroni test performed on all variables. Adjusted significance between extremes (DP0 SV0 vs DP1 SV1) indicated in bold. Negative adjusted significance indicated in gray background.

Table S3 – Comparison between overall proportion and the three class solution probability scale for DP and SV in MRhI Items.

	Overall proportion (%)	Three Class Solution (%)		
		Class 1 Strong perceived daily and seasonal variation	Class 2 Weak perceived daily variation	Class 3 Intermediate perception of mostly daily variation
DP Alertness	0.77	0.88	0.50	0.80
DP Sleepiness	0.94	NS	0.79	0.95
DP Problem-solving	0.67	0.82	0.44	0.65
DP Self-esteem	0.35	0.56	NS	0.28
DP Concentration	0.79	0.89	0.61	0.79
DP Appetite	0.72	0.81	0.42	0.77
DP Sexual arousal	0.30	0.47	0.10	0.24
DP Irritability	0.60	0.82	0.23	0.57
DP Anxiety	0.43	0.71	0.17	0.30
DP Sadness	0.40	0.74	0.16	0.22
DP Exercise	0.60	0.61	0.39	0.69
DP Memory	0.31	0.44	0.12	0.27
DP Pessimism	0.31	0.62	NS	0.15
DP Talk to friends	0.51	0.68	0.26	0.48
DP Energy	0.78	0.86	0.47	0.84
SV Alertness	0.43	0.62	NS	0.46
SV Sleepiness	0.82	0.90	0.49	0.90
SV Problem-solving	0.16	0.34	NS	0.07
SV Self-esteem	0.38	0.65	NS	0.29
SV Concentration	0.35	0.57	NS	0.29
SV Appetite	0.48	0.64	0.16	0.49
SV Sexual arousal	0.13	0.25	NS	0.07
SV Irritability	0.36	0.64	NS	0.26
SV Anxiety	0.41	0.70	NS	0.31
SV Sadness	0.49	0.74	0.14	0.44
SV Exercise	0.72	0.73	0.45	0.82
SV Memory	0.10	0.19	NS	0.06
SV Pessimism	0.27	0.50	NS	0.17
SV Talk to friends	0.36	0.52	0.10	0.32
SV Energy	0.63	0.79	0.22	0.66
N=	355	134	73	148

NS: Non significant result in the final probability scale model.

Gray background: Proportion or probability of variation < 0.5.

Table S4 – Multivariate analysis between MRhI items and Risk of psychiatric condition separately by affective, cognitive, and somatic components.

Somatic Component				
	DPSV	PR	95%CI	<i>p</i>
Alertness	2	1.26	0.70 - 2.29	0.44
	1	0.96	0.52 - 1.77	0.89
Sleepiness	2	1.69	0.21 - 13.58	0.62
	1	1.22	0.15 - 10.05	0.85
Appetite	2	1.18	0.78 - 1.80	0.43
	1	0.87	0.57 - 1.33	0.53
Sexual arousal	2	0.93	0.53 - 1.61	0.79
	1	1.18	0.87 - 1.61	0.28
Irritability	2	3.58	1.95 - 6.57	<0.01*
	1	3.39	1.87 - 6.13	<0.01*
Exercise	2	0.48	0.32 - 0.72	<0.01*
	1	0.67	0.45 - 0.98	0.04*

Cognitive Component				
	DPSV	PR	95%CI	<i>P</i>
Problems solving	2	1.35	0.77 - 2.36	0.29
	1	0.99	0.66 - 1.48	0.96
Concentration	2	1.13	0.65 - 1.94	0.67
	1	0.88	0.54 - 1.46	0.63
Memory	2	1.39	0.86 - 2.26	0.18
	1	0.77	0.53 - 1.10	0.14
Talking to friends	2	3.15	1.93 - 5.14	<0.01*
	1	2.25	1.40 - 3.62	<0.01*
Energy	2	1.02	0.59 - 1.75	0.95
	1	0.96	0.54 - 1.69	0.88

Affective Component				
	DPSV	PR	95%CI	<i>p</i>
Self-esteem	2	1.29	0.83 - 2.01	0.26
	1	1.29	0.89 - 1.86	0.18
Anxiety	2	1.74	1.03 - 2.93	0.04*
	1	1.55	0.93 - 2.57	0.09
Sadness	2	2.29	1.29 - 4.06	<0.01*
	1	1.87	1.08 - 3.25	0.03*
Pessimism	2	1.45	0.96 - 2.20	0.08
	1	1.47	1.03 - 2.10	0.03*

PR: Prevalence ratio; 95%CI: PR 95% Confidence interval; DPSV: Compound variable including Daily peak and Seasonal variation, DPSV 0 = No DP and SV perceived (used as the reference value for each item); DPSV 1 = DP or SV perceived; DPSV 2 = DP and SV perceived. Risk of psychiatric condition: Low risk - SRQ-20 score of 7 or less; High risk - SRQ-20 score of 8 or more.

* $p < 0.05$

5. DISCUSSÃO

Os resultados aqui apresentados trazem novos insights sobre a regulação dos ritmos biológicos em relação a desfechos em saúde. As principais contribuições relacionadas aos achados da presente tese são discutidos a seguir:

- A verificação de que a associação entre qualidade de sono e sintomas psiquiátricos e cardiometabólicos autodeclarados independe dos componentes relacionados a horários de sono (Artigo 1).

Isso demonstra uma maior contribuição de aspectos psicológicos do que aspectos propriamente objetivos, como reforçado por estudos que não encontraram correlação entre escores de PSQI e parâmetros objetivos de sono medidos por polissonografia (63,64). Além disso, reforça a hipótese de que questões voltadas à percepção de privação de sono na interrupção de ritmos seja um fator determinante para a sua associação com os desfechos patológicos avaliados (119–121).

A associação de piores níveis de qualidade do sono com sintomas psiquiátricos autorreferidos vai ao encontro dos resultados encontrados na literatura (122,123). Analisando os componentes de qualidade do sono utilizados na análise (qualidade de sono subjetiva, distúrbios de sono, uso de medicações para dormir, e funcionalidade durante o dia), observa-se que todos apresentaram diferenças significativas quanto à presença de sintomas psiquiátricos autorreferidos, ao comparar grupos componente-específicos com boa e com má qualidade de sono (Figura S1 dos materiais suplementares do Artigo 1). As características de três desses componentes são fortemente relacionadas a alterações encontradas em distúrbios psiquiátricos, como o uso de medicações para dormir, e a redução da qualidade subjetiva do sono e da percepção de funcionalidade durante o dia. Embora o achado corrobore com a intersecção entre esses dois elementos, pelo desenho do estudo, não é possível concluir sobre efeitos de causa ou consequência devido ao desenho transversal do projeto. Especificamente quanto ao componente relacionado a distúrbios do sono, os fatores que pontuam para piores desfechos incluem a presença das seguintes características resultando em prejuízo no sono: capacidade de respirar confortavelmente, tosses ou roncos frequentes, alterações na percepção de temperatura corporal, percepção de sonhos desagradáveis, ou dores (62). Embora com diferenças ainda significativas, são notadamente características com aspectos mais objetivos, ou menos relacionados a uma possível intersecção de aspectos psicológicos. Observa-se que, em relação aos sintomas

psiquiátricos autorreferidos, esse parâmetro apresentou a menor diferença entre grupos de boa e de má qualidade de sono quando comparado com os outros componentes (68% em “maus dormidores” vs 39% em “bons dormidores”), o que leva a considerar que não são apenas aspectos psicológicos, mas também que alterações objetivas de sono estão envolvidas nesses resultados.

Em contrapartida, em relação a sintomas cardiometabólicos, observa-se que as diferenças significativas entre grupos de boa e de má qualidade de sono componente-específicos ocorreram apenas no uso de medicações para dormir e nos distúrbios do sono. Comparativamente aos resultados encontrados nos sintomas psiquiátricos autorreferidos, isso é congruente com achados clínicos com menor intersecção de aspectos psicológicos. Um fator possivelmente associado ao componente de distúrbios do sono pode ser a frequência de doenças de sono de alta prevalência, como a Síndrome da Apneia Obstrutiva do Sono (SAOS), que leva a alterações de sono fortemente avaliadas pelo componente de distúrbios do sono, e apresenta uma prevalência de 32,9% em amostras populacionais brasileiras (124). O mesmo estudo demonstrou uma razão de chances aproximadamente 10 vezes maior de SAOS em populações com obesidade, que foi uma das características utilizadas para a consideração de sintomas cardiometabólicos no Artigo 1.

Uma limitação dessa análise se relaciona à natureza do desfecho utilizado – como os desfechos são relacionados a sintomas autorreferidos, e não a quadros sintomáticos avaliados por meio de metodologia validada, os resultados devem ser interpretados com cautela.

- A identificação da associação de piores escores de qualidade de sono com o genótipo GA/AA, comparativamente ao genótipo GG, no polimorfismo rs782931 *RORA* (Artigo 1).

Os achados anteriores quanto ao polimorfismo estudado relacionam o genótipo GG a característica de rigidez de cronotipo (106). Na presente análise, não foram analisadas características de rigidez/frouxidão cronotípica, porém se observam melhores escores de qualidade de sono para o genótipo referido (GG). A posição intrônica do presente polimorfismo não permite considerar mudanças estruturais na proteína ROR alfa, ou alterações transcricionais diretamente causadas por alterações neste SNP. Contudo, a sua posição em desequilíbrio de ligação com partes do genoma responsáveis pela codificação

da proteína poderia sugerir que esse achado é uma observação indireta relacionada a um SNP próximo. Um estudo prévio associando SNP do gene *RORA* em loci diferente do analisado no presente projeto demonstrou alterações no sono relacionadas principalmente a latência inicial de sono e atividade motora elevada (125), o que converge em parte com os nossos resultados em relação à qualidade de sono, porém não com o observado nas análises componente-específicas (Table S6 do Artigo 1). Explicações alternativas relacionadas a uma possível atividade intrônica também devem ser consideradas, como ativação de sítios de corte-junção crípticos (126) ou interação com RNA não codificante (127). Dessa forma, essa análise genética traz achados que podem direcionar pesquisas futuras com o objetivo de esclarecer as rotas entre o gene *RORA* e os aspectos da relação entre a percepção do sono e características do cronotipo.

- Os resultados negativos na associação entre bem-estar psicológico e polimorfismos dos genes *AANAT* e *RORA* (Artigo 2).

Embora tenham sido demonstradas tendências de diferenças antes da correção para múltiplas testagens, as diferenças das médias entre os genótipos leva a considerar efeitos discretos de cada um dos genes avaliados sobre o bem-estar psicológico, assim como sobre o risco de depressão relacionado a esse parâmetro. Ainda assim, correlacionando com os achados anteriormente mencionados, demonstra-se uma diferença no comportamento dos genótipos em relação ao bem-estar psicológico e à percepção de qualidade de sono. Essa diferença reforça que a correlação entre *RORA* e qualidade do sono não se deve a aspectos puramente psicológicos, mas também a questões específicas da percepção do sono, as quais não são captadas em instrumentos de bem-estar psicológico mais amplos, como o WHO-5. Em relação ao gene *AANAT*, o SNP estudado encontra-se na sua região promotora, a qual, da mesma forma que o gene *RORA*, não permite inferências sobre possíveis mudanças estruturais na proteína resultantes do polimorfismo. Já quanto ao gene *TIMELESS*, a frequência reduzida dos polimorfismos escolhidos para a análise não permitiu a sua inclusão nas análises multivariadas. A publicação desses resultados é importante para enriquecer a discussão da comunidade científica sobre esses polimorfismos.

- Os resultados negativos em relação às inter-relações entre características moleculares e comportamentais por meio das análises de mediação e moderação nos artigos 1 e 2.

Esses resultados são importantes ao demonstrar que, pela complexidade de interações possíveis dos mecanismos moleculares de regulação do sistema circadiano (conforme descrito na revisão da literatura), é possivelmente exigido um controle maior sobre as variáveis comportamentais para que se atinja uma melhor avaliação dessa rede de relações. Algumas características da amostra dos estudos 1 e 2 podem ter limitado a detecção de interações relacionadas ao ambiente de trabalho rural vs urbano (Artigo 1), haja vista a pouca variação de características de dias de trabalho (77,3% da amostra com atividades laborativas de 6 a 7 dias/semana). O uso do dado relacionado à necessidade de alarme para acordar como fator de interação com os horários de sono (Artigo 2) não foi capaz de identificar piores níveis de desequilíbrio entre os horários de rotinas de trabalho e os ritmos individuais, o que, pelas características de trabalho da amostra, suscita a questão sobre se tais achados seriam os mesmos em amostras com atividades preponderantemente urbanas. Além disso, uma descrição mais precisa das atividades rurais dos participantes auxiliaria um melhor entendimento desse fator, visto que muitas vezes há um caráter sazonal das atividades rurais, com demandas variáveis em relação ao plantio e à colheita. A ampliação metodológica dessas abordagens, incluindo o uso de métodos objetivos de mensuração dos ritmos comportamentais, seria um passo importante nesse sentido.

- Os resultados demonstrando piores desfechos quanto à probabilidade de distúrbio psiquiátrico em pessoas com maior percepção de ritmos em sintomas de humor, com a nítida amplificação dos escores de maior gravidade em casos com percepção concomitante do pico circadiano e sazonal entre os itens (Artigo 3).

Esse resultado traz novos insights sobre a importância de avaliar essas características em conjunto no contexto clínico. Conforme revisado nos aspectos moleculares e fisiológicos do sistema circadiano, há sinais de que os mecanismos da regulação circadiana e sazonal atuam pela ação interativa entre a melatonina e os THs (8). No contexto clínico, ainda se observa uma separação desses fatores, seja por avaliações da percepção de ritmos apenas circadianos (em geral quando avaliadas queixas de sono), seja de ritmos apenas sazonais (em geral quando investigados quadros sugestivos de SAD ou THB). Os achados da análise bivariada, observando diferenças na associação entre a percepção de DP e SV entre grupos de baixa e alta probabilidade de transtorno psiquiátrico (Table 3 do Artigo 3) são bastante interessantes quando levado em consideração o contexto molecular e fisiológico desse mecanismo. Estudos longitudinais observando o comportamento dessa associação no mesmo indivíduo em momentos de maior e menor

probabilidade de transtorno psiquiátrico poderiam ajudar a esclarecer se de fato são achados que demonstram um desacoplamento na concordância entre a percepção de ritmos diários e sazonais, ou se refletem unicamente a maior percepção de ritmos de sintomas de humor em grupos com maior probabilidade de morbidade mental.

Em relação aos achados fazendo uso da combinação de escores entre DP e SV, a indicação de piores desfechos psiquiátricos em grupos com percepção de ambos os ritmos circadianos e sazonais (grupo DPSV2), como demonstrados na Figura 3 do Artigo 3, traz resultados relevantes ao demonstrar o acréscimo de gravidade que esse grupo representa comparativamente à percepção unicamente circadiana ou sazonal. Em seis dos 15 itens do instrumento, pode-se observar inclusive uma média de escores do SRQ-20 acima do ponto de corte para maior probabilidade de transtorno psiquiátrico, um resultado de impacto considerável em contextos clínicos.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

O presente trabalho vem possibilitando aprofundar o entendimento dos processos envolvidos na regulação do sistema circadiano e sua relação com a saúde. Para se aproximar de uma avaliação completa dos diferentes níveis abordados, foi possível verificar a necessidade de múltiplas frentes de trabalho capazes de executar de forma coordenada as diferentes demandas de coleta e análise na pesquisa molecular e clínica. Ao longo dos últimos anos, pôde-se observar movimentos importantes gerados por achados que vão ao encontro dos resultados deste projeto, os quais chamam a atenção para os efeitos deletérios da cronodisrupção na saúde. Consequência disso, tais achados vêm extrapolando a literatura científica, chegando à mídia convencional com mais e mais discussões sobre perspectivas de mudanças culturais relacionadas a horários de trabalho e de estudo. Atualmente, essas consequências já não são apenas discussões, passando para o plano da prática, com empresas adotando mudanças relacionadas a demandas de horários de trabalho para os empregados, ou mesmo gestores governamentais propondo mudanças nas diretrizes de turnos escolares (128–131).

Além de abordagens preventivas, estudos com considerações clínicas para a relação entre cronobiologia e doenças físicas e mentais tendem a seguir pelo mesmo caminho. Muito se vem discutindo sobre as perspectivas do uso desses conhecimentos para fins diagnósticos e terapêuticos, e como isso pode auxiliar no entendimento de processos etiopatogênicos ainda pouco esclarecidos (132). Os achados do presente trabalho contribuem para esse objetivo, porém, é importante também o fortalecimento da pesquisa em contextos ambulatoriais e hospitalares, envolvendo dados relacionados à regulação dos ritmos circadianos e sazonais. Visando esse objetivo, ao longo do tempo de execução deste trabalho, foi desenvolvido também um projeto de pesquisa complementar (ANEXO I), o qual pretende melhor compreender as variações de ritmos comportamentais de atividade e repouso em pacientes vinculados ao ambulatório de Psiquiatria do Sono. Assim, além de aspectos centrados na percepção de ritmos, a meta é também esclarecer medidas objetivas dos ritmos circadianos, explorando as indicações do uso clínico da actigrafia em contextos de Saúde Mental e Medicina do Sono. Junto a isso, a necessidade de uniformizar os atendimentos desse serviço para fins de pesquisa sem interferência no fluxo assistencial geraram a demanda da elaboração dos Protocolos Assistenciais do Ambulatório POO (ANEXO I.A), os quais foram montados em uma plataforma digital com grande potencial tanto para fins educacionais, na formação de novos profissionais na área, como para fins assistenciais e de pesquisa clínica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Guido ME, Garbarino-Pico E, Contin MA, Valdez DJ, Nieto PS, Verra DM, et al. Inner retinal circadian clocks and non-visual photoreceptors: Novel players in the circadian system. *Prog Neurobiol* [Internet]. 2010 Dec 1 [cited 2020 Feb 7];92(4):484–504. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301008210001486>
2. Khan AG, Hofer SB. Contextual signals in visual cortex. *Curr Opin Neurobiol* [Internet]. 2018 Oct 1 [cited 2020 Feb 7];52:131–8. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959438818300825?via%3Dihub>
3. Patel AD. The Evolutionary Biology of Musical Rhythm: Was Darwin Wrong? *PLoS Biol* [Internet]. 2014 Mar 25;12(3):e1001821–e1001821. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24667562>
4. Hattar S, Liao HW, Takao M, Berson DM, Yau KW. Melanopsin-containing retinal ganglion cells: Architecture, projections, and intrinsic photosensitivity. *Science* (80-) [Internet]. 2002 Feb 8;295(5557):1065–70. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11834834>
5. Ecker JL, Dumitrescu ON, Wong KY, Alam NM, Chen SK, LeGates T, et al. Melanopsin-expressing retinal ganglion-cell photoreceptors: Cellular diversity and role in pattern vision. *Neuron* [Internet]. 2010 Jul 15;67(1):49–60. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20624591>
6. Spitschan M, Jain S, Brainard DH, Aguirre GK. Opponent melanopsin and S-cone signals in the human pupillary light response. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2014/10/13. 2014 Oct 28;111(43):15568–72. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25313040>
7. Patke A, Young MW, Axelrod S. Molecular mechanisms and physiological importance of circadian rhythms. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2020;21(2):67–84. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0179-2>
8. Wood S, Loudon A. The pars tuberalis: The site of the circannual clock in mammals? *Gen Comp Endocrinol* [Internet]. 2018 Mar 1 [cited 2020 Feb

- 7];258:222–35. Available from:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0016648017303507?via%3Dihub>
9. Falchi F, Cinzano P, Duriscoe D, Kyba CCM, Elvidge CD, Baugh K, et al. The new world atlas of artificial night sky brightness. *Sci Adv* [Internet]. 2016 Jun 10;2(6):e1600377–e1600377. Available from:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27386582>
 10. Mistlberger RE, Skene DJ. Nonphotic Entrainment in Humans? *J Biol Rhythms* [Internet]. 2005 Aug 1;20(4):339–52. Available from:
<https://doi.org/10.1177/0748730405277982>
 11. Al-Naggar RA, Anil S. Artificial Light at Night and Cancer: Global Study. *Asian Pac J Cancer Prev* [Internet]. 2016 Oct 1;17(10):4661–4. Available from:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27892680>
 12. Chepesiuk R. Missing the dark: health effects of light pollution. *Environ Health Perspect* [Internet]. 2009 Jan;117(1):A20–7. Available from:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19165374>
 13. Mills PR, Tomkins SC, Schlangen LJM. The effect of high correlated colour temperature office lighting on employee wellbeing and work performance. *J Circadian Rhythms* [Internet]. 2007 Jan 11;5:2. Available from:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17217543>
 14. Pelayo R, Dement W. History of Sleep and Medicine. In: Kryger M, Roth T, Dement W, editors. *Principles and Practice of Sleep Medicine*. Philadelphia; 2017. p. 3–14.
 15. Czeisler CA, Allan JS, Strogatz SH, Ronda JM, Sanchez R, Rios CD, et al. Bright light resets the human circadian pacemaker independent of the timing of the sleep-wake cycle. *Science* (80-) [Internet]. 1986 Aug 8;233(4764):667. Available from:
<http://science.sciencemag.org/content/233/4764/667.abstract>
 16. Reiter RJ. Neuroendocrine effects of light. *Int J Biometereology*. 1991;35(3):169–75.
 17. Reiter RJ. Melatonin: The chemical expression of darkness. *Mol Cell Endocrinol* [Internet]. 1991 Aug 1 [cited 2020 Feb 7];79(1–3):C153–8. Available from:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0303720791900879?via%3Dihub#>

!

18. Kappers JA. The mammalian pineal organ. *J Neurovisc Relat.* 1969;31:140–84.
19. Kappers JA. Survey of the Innervation of the Epiphysis Cerebri and the Accessory Pineal Organs of Vertebrates. *Prog Brain Res* [Internet]. 1965 Jan 1;10(C):87–153. Available from: https://www.unboundmedicine.com/medline/citation/14281635/SURVEY_OF_THE_INNERVATION_OF_THE_EPIPHYSIS_CEREBRI_AND_THE_ACCESSORY_PINEAL_ORGANS_OF_VERTEBRATES_
20. Reiter RJ, Tan D-X, Fuentes-Broto L. Melatonin: A Multitasking Molecule. *Prog Brain Res* [Internet]. 2010 Jan 1 [cited 2020 Feb 7];181:127–51. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0079612308810084?via%3Dihub>
21. Bartness TJ, Powers JB, Hastings MH, Bittman EL, Goldman BD. The timed infusion paradigm for melatonin delivery: what has it taught us about the melatonin signal, its reception, and the photoperiodic control of seasonal responses? *J Pineal Res* [Internet]. 1993 Nov;15(4):161—190. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1600-079x.1993.tb00903.x>
22. Dardente H, Menet JS, Poirel V-J, Streicher D, Gauer F, Vivien-Roels B, et al. Melatonin induces Cry1 expression in the pars tuberalis of the rat. *Mol Brain Res* [Internet]. 2003 Jun 10 [cited 2020 Feb 7];114(2):101–6. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169328X03001347>
23. Dardente H, Klosen P, Pévet P, Masson-Pévet M. MT1 melatonin receptor mRNA expressing cells in the pars tuberalis of the European hamster: Effect of photoperiod. *J Neuroendocrinol* [Internet]. 2003 Aug 1;15(8):778–86. Available from: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2826.2003.01060.x>
24. Johnston JD, Klosen P, Barrett P, Hazlerigg DG. Regulation of MT1 Melatonin Receptor Expression in the Foetal Rat Pituitary. *J Neuroendocrinol* [Internet]. 2006 Jan 1;18(1):50–6. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2005.01389.x>
25. Klosen P, Bienvenu C, Demartean O, Dardente H, Guerrero H, Pévet P, et al. The mt1 Melatonin Receptor and ROR β Receptor Are Co-localized in Specific TSH-immunoreactive Cells in the Pars Tuberalis of the Rat Pituitary. *J Histochem*

- Cytochem [Internet]. 2002 Dec 1;50(12):1647–57. Available from: <https://doi.org/10.1177/002215540205001209>
26. Dardente H, Hazlerigg D, Ebling F. Thyroid Hormone and Seasonal Rhythmicity. *Front Endocrinol (Lausanne)* [Internet]. 2014;5:19. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fendo.2014.00019>
 27. Hazlerigg D, Loudon A. New Insights into Ancient Seasonal Life Timers. *Curr Biol* [Internet]. 2008 Sep 9 [cited 2020 Feb 7];18(17):R795–804. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960982208009469>
 28. Wood S, Loudon A. Clocks for all seasons: unwinding the roles and mechanisms of circadian and interval timers in the hypothalamus and pituitary. *J Endocrinol* [Internet]. 2014;222(2):R39–59. Available from: <https://joe.bioscientifica.com/view/journals/joe/222/2/R39.xml>
 29. Yoshimura T. Thyroid hormone and seasonal regulation of reproduction. *Front Neuroendocrinol* [Internet]. 2013 Aug 1 [cited 2020 Feb 7];34(3):157–66. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0091302213000162?via%3Dihub>
 30. Sullivan PF, Daly MJ, Ripke S, Lewis CM, Lin DY, Wray NR, et al. A mega-Analysis of genome-wide association studies for major depressive disorder. *Mol Psychiatry*. 2013 Apr;18(4):497–511.
 31. Engelen E, Janssens RC, Yagita K, Smits VAJ, van der Horst GTJ, Tamanini F. Mammalian TIMELESS Is Involved in Period Determination and DNA Damage-Dependent Phase Advancing of the Circadian Clock. *PLoS One* [Internet]. 2013 Feb 13;8(2):e56623. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056623>
 32. Kim YH, Marhon SA, Zhang Y, Steger DJ, Won K-J, Lazar MA. Rev-erba dynamically modulates chromatin looping to control circadian gene transcription. *Science* [Internet]. 2018/02/08. 2018 Mar 16;359(6381):1274–7. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29439026>
 33. Yamazaki S, Numano R, Abe M, Hida A, Takahashi R, Ueda M, et al. Resetting Central and Peripheral Circadian Oscillators in Transgenic Rats. *Science* (80-) [Internet]. 2000 Apr 28;288(5466):682 LP – 685. Available from:

- <http://science.sciencemag.org/content/288/5466/682.abstract>
34. Dardente H, Wyse CA, Birnie MJ, Dupré SM, Loudon ASI, Lincoln GA, et al. A molecular switch for photoperiod responsiveness in mammals. *Curr Biol* [Internet]. 2010 Dec 21;20(24):2193–8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.10.048>
 35. Dupré SM, Miedzinska K, Duval C V, Yu L, Goodman RL, Lincoln GA, et al. Identification of *Eya3* and *TAC1* as Long-Day Signals in the Sheep Pituitary. *Curr Biol* [Internet]. 2010 May 11;20(9):829–35. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.02.066>
 36. Masumoto KH, Ukai-Tadenuma M, Kasukawa T, Nagano M, Uno KD, Tsujino K, et al. Acute induction of *Eya3* by late-night light stimulation triggers TSH β expression in photoperiodism. *Curr Biol* [Internet]. 2010 Dec 21;20(24):2199–206. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.11.038>
 37. Bell-Pedersen D, Cassone VM, Earnest DJ, Golden SS, Hardin PE, Thomas TL, et al. Circadian rhythms from multiple oscillators: lessons from diverse organisms. *Nat Rev Genet* [Internet]. 2005;6(7):544–56. Available from: <https://doi.org/10.1038/nrg1633>
 38. Hazlerigg DG, Andersson H, Johnston JD, Lincoln G. Molecular Characterization of the Long-Day Response in the Soay Sheep, a Seasonal Mammal. *Curr Biol* [Internet]. 2004 Feb 17;14(4):334–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.01.057>
 39. Ikegami K, Iigo M, Yoshimura T. Circadian Clock Gene *Per2* Is Not Necessary for the Photoperiodic Response in Mice. *PLoS One* [Internet]. 2013 Mar 7;8(3):e58482. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058482>
 40. Lincoln G, Messenger S, Andersson H, Hazlerigg D. Temporal expression of seven clock genes in the suprachiasmatic nucleus and the pars tuberalis of the sheep: Evidence for an internal coincidence timer. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2002 Oct 15;99(21):13890 LP – 13895. Available from: <http://www.pnas.org/content/99/21/13890.abstract>
 41. Tournier BB, Dardente H, Simonneaux V, Vivien-Roels B, Pévet P, Masson-Pévet

- M, et al. Seasonal variations of clock gene expression in the suprachiasmatic nuclei and pars tuberalis of the European hamster (*Cricetus cricetus*). *Eur J Neurosci* [Internet]. 2007 Mar 1;25(5):1529–36. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05421.x>
42. Yoshimura T, Yasuo S, Watanabe M, Iigo M, Yamamura T, Hirunagi K, et al. Light-induced hormone conversion of T4 to T3 regulates photoperiodic response of gonads in birds. *Nature* [Internet]. 2003;426(6963):178–81. Available from: <https://doi.org/10.1038/nature02117>
43. Ono H, Hoshino Y, Yasuo S, Watanabe M, Nakane Y, Murai A, et al. Involvement of thyrotropin in photoperiodic signal transduction in mice. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2008 Nov 25;105(47):18238 LP – 18242. Available from: <http://www.pnas.org/content/105/47/18238.abstract>
44. Unfried C, Ansari N, Yasuo S, Korf H-W, von Gall C. Impact of Melatonin and Molecular Clockwork Components on the Expression of Thyrotropin β -Chain (Tshb) and the Tsh Receptor in the Mouse Pars Tuberalis. *Endocrinology* [Internet]. 2009 Oct 1;150(10):4653–62. Available from: <https://doi.org/10.1210/en.2009-0609>
45. Yasuo S, Yoshimura T, Ebihara S, Korf H-W. Melatonin Transmits Photoperiodic Signals through the MT1 Melatonin Receptor. *J Neurosci* [Internet]. 2009 Mar 4;29(9):2885 LP – 2889. Available from: <http://www.jneurosci.org/content/29/9/2885.abstract>
46. Korf HW. Signaling pathways to and from the hypophysial pars tuberalis, an important center for the control of seasonal rhythms. *Gen Comp Endocrinol* [Internet]. 2018 Mar 1 [cited 2020 Feb 11];258:236–43. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0016648017302320?via%3Dihub>
47. Wood SH, Christian HC, Miedzinska K, Saer BRC, Johnson M, Paton B, et al. Binary Switching of Calendar Cells in the Pituitary Defines the Phase of the Circannual Cycle in Mammals. *Curr Biol* [Internet]. 2015 Oct 19;25(20):2651–62. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.09.014>
48. Lamia KA, Storch K-F, Weitz CJ. Physiological Significance of a Peripheral Tissue Circadian Clock. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2008;105(39):15172–7. Available from: <http://www.jstor.org/stable/25464379>

49. Marcheva B, Ramsey KM, Buhr ED, Kobayashi Y, Su H, Ko CH, et al. Disruption of the clock components CLOCK and BMAL1 leads to hypoinsulinaemia and diabetes. *Nature* [Internet]. 2010;466(7306):627–31. Available from: <https://doi.org/10.1038/nature09253>
50. Buhr ED, Yoo S-H, Takahashi JS. Temperature as a Universal Resetting Cue for Mammalian Circadian Oscillators. *Science* (80-) [Internet]. 2010 Oct 15;330(6002):379 LP – 385. Available from: <http://science.sciencemag.org/content/330/6002/379.abstract>
51. Monk TH, Petrie SR, Hayes AJ, Kupfer DJ. Regularity of daily life in relation to personality, age, gender, sleep quality and circadian rhythms. *J Sleep Res* [Internet]. 1994 Dec 1;3(4):196–205. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2869.1994.tb00132.x>
52. Schimitt RL, Zanetti T, Mayer M, Koplín C, Guarienti F, Hidalgo MP. Psychometric properties of Social Rhythm Metric in regular shift employees . Vol. 32, *Brazilian Journal of Psychiatry* . scielo ; 2010. p. 47–55.
53. Johnston JD. Physiological responses to food intake throughout the day. *Nutr Res Rev* [Internet]. 2014/03/25. 2014 Jun;27(1):107–18. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24666537>
54. Cirelli C. A Molecular Window on Sleep: Changes in Gene Expression between Sleep and Wakefulness. *Neurosci* [Internet]. 2005 Feb 1;11(1):63–74. Available from: <https://doi.org/10.1177/1073858404270900>
55. Iliff JJ, Wang M, Liao Y, Plogg BA, Peng W, Gundersen GA, et al. A Paravascular Pathway Facilitates CSF Flow Through the Brain Parenchyma and the Clearance of Interstitial Solutes, Including Amyloid β . *Sci Transl Med* [Internet]. 2012 Aug 15;4(147):147ra111. Available from: <http://stm.sciencemag.org/content/4/147/147ra111.abstract>
56. Xie L, Kang H, Xu Q, Chen MJ, Liao Y, Thiyagarajan M, et al. Sleep Drives Metabolite Clearance from the Adult Brain. *Science* (80-) [Internet]. 2013 Oct 18;342(6156):373. Available from: <http://science.sciencemag.org/content/342/6156/373.abstract>

57. Torres-Farfan C, Richter HG, Rojas-García P, Vergara M, Forcelledo ML, Valladares LE, et al. mt1 Melatonin Receptor in the Primate Adrenal Gland: Inhibition of Adrenocorticotropin-Stimulated Cortisol Production by Melatonin. *J Clin Endocrinol Metab* [Internet]. 2003 Jan 1;88(1):450–8. Available from: <https://doi.org/10.1210/jc.2002-021048>
58. Pandi-Perumal SR, Srinivasan V, Maestroni GJM, Cardinali DP, Poeggeler B, Hardeland R. Melatonin. *FEBS J* [Internet]. 2006 Jul 1;273(13):2813–38. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2006.05322.x>
59. Castle-Miller J, Bates DO, Tortonese DJ. Mechanisms regulating angiogenesis underlie seasonal control of pituitary function. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2017 Mar 21;114(12):E2514 LP-E2523. Available from: <http://www.pnas.org/content/114/12/E2514.abstract>
60. Krystal AD, Edinger JD. Measuring sleep quality. *Sleep Med* [Internet]. 2008;9:S10–7. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S138994570870011X>
61. Bertolazi AN, Fagundes SC, Hoff LS, Dartora EG, da Silva Miozzo IC, de Barba MEF, et al. Validation of the Brazilian Portuguese version of the Pittsburgh Sleep Quality Index. *Sleep Med* [Internet]. 2011 Jan 1;12(1):70–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.sleep.2010.04.020>
62. Buysse DJ, Reynolds CF, Monk TH, Berman SR, Kupfer DJ. The Pittsburgh sleep quality index: A new instrument for psychiatric practice and research. *Psychiatry Res* [Internet]. 1989 May 1;28(2):193–213. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/0165-1781\(89\)90047-4](http://dx.doi.org/10.1016/0165-1781(89)90047-4)
63. Buysse DJ, Hall ML, Strollo PJ, Kamarck TW, Owens J, Lee L, et al. Relationships between the Pittsburgh Sleep Quality Index (PSQI), Epworth Sleepiness Scale (ESS), and clinical/polysomnographic measures in a community sample. *J Clin Sleep Med* [Internet]. 2008 Dec 15;4(6):563–71. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19110886>
64. Kaplan KA, Hirshman J, Hernandez B, Stefanick ML, Hoffman AR, Redline S, et al. When a gold standard isn't so golden: Lack of prediction of subjective sleep quality from sleep polysomnography. *Biol Psychol* [Internet]. 2016/11/24. 2017

- Feb;123:37–46. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27889439>
65. Levandovski R, Sasso E, Hidalgo MP. Chronotype: a review of the advances, limits and applicability of the main instruments used in the literature to assess human phenotype . Vol. 35, Trends in Psychiatry and Psychotherapy . scielo ; 2013. p. 3–11.
 66. Roenneberg T, Wirz-Justice A, Mellow M. Life between Clocks: Daily Temporal Patterns of Human Chronotypes. *J Biol Rhythms* [Internet]. 2003 Feb 1;18(1):80–90. Available from: <https://doi.org/10.1177/0748730402239679>
 67. Wittmann M, Dinich J, Mellow M, Roenneberg T. Social Jetlag: Misalignment of Biological and Social Time. *Chronobiol Int* [Internet]. 2006 Jan 1;23(1–2):497–509. Available from: <https://doi.org/10.1080/07420520500545979>
 68. Roenneberg T, Kuehnle T, Juda M, Kantermann T, Allebrandt K, Gordijn M, et al. Epidemiology of the human circadian clock. *Sleep Med Rev*. 2007 Dec;11(6):429–38.
 69. Roenneberg T, Mellow M. The Circadian Clock and Human Health. *Curr Biol* [Internet]. 2016 May 23;26(10):R432–43. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.04.011>
 70. Roenneberg T, Pilz LK, Zerbini G, Winnebeck EC. Chronotype and Social Jetlag: A (Self-) Critical Review. *Biology (Basel)* [Internet]. 2019 Jul 12;8(3):54. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31336976>
 71. Horne JA, Ostberg O. A self-assessment questionnaire to determine morningness-eveningness in human circadian rhythms. *Int J Chronobiol*. 1976;4(2):97–110.
 72. Adan A, Almirall H. Horne & Östberg morningness-eveningness questionnaire: A reduced scale. *Pers Individ Dif* [Internet]. 1991 Jan 1 [cited 2019 Jan 19];12(3):241–53. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/019188699190110W>
 73. de Souza CM, Carissimi A, Costa D, Francisco AP, Medeiros MS, Ilgenfritz CA, et al. The Mood Rhythm Instrument: development and preliminary report . *Rev Bras Psiquiatr* [Internet]. 2016 Jun [cited 2019 May 21];38(2):148–53. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-44462016000200148&lng=en&tlng=en

74. Pilz LK, Carissimi A, Oliveira MAB, Francisco AP, Fabris RC, Medeiros MS, et al. Rhythmicity of Mood Symptoms in Individuals at Risk for Psychiatric Disorders. *Sci Rep* [Internet]. 2018 Dec 30 [cited 2019 May 21];8(1):11402. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30061722>
75. Rosenthal NE, Sack DA, Gillin JC, Lewy AJ, Goodwin FK, Davenport Y, et al. Seasonal Affective Disorder: A Description of the Syndrome and Preliminary Findings With Light Therapy. *Arch Gen Psychiatry* [Internet]. 1984 Jan 1;41(1):72–80. Available from: <https://doi.org/10.1001/archpsyc.1984.01790120076010>
76. Kasper S, Wehr TA, Bartko JJ, Gaist PA, Rosenthal NE. Epidemiological Findings of Seasonal Changes in Mood and Behavior: A Telephone Survey of Montgomery County, Maryland. *Arch Gen Psychiatry* [Internet]. 1989 Sep 1;46(9):823–33. Available from: <https://doi.org/10.1001/archpsyc.1989.01810090065010>
77. Dam H, Jakobsen K, Mellerup E. Prevalence of winter depression in Denmark. *Acta Psychiatr Scand* [Internet]. 1998 Jan 1;97(1):1–4. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0447.1998.tb09954.x>
78. Thun E, Bjorvatn B, Osland T, Steen VM, Sivertsen B, Johansen T, et al. An actigraphic validation study of seven morningness-eveningness inventories. *Eur Psychol*. 2012;17(3):222–30.
79. Santisteban JA, Brown TG, Gruber R. Association between the Munich Chronotype Questionnaire and Wrist Actigraphy. *Sleep Disord* [Internet]. 2018 May 9;2018:5646848. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29862086>
80. Smagula SF, DuPont CM, Miller MA, Krafty RT, Hasler BP, Franzen PL, et al. Rest-activity rhythms characteristics and seasonal changes in seasonal affective disorder. *Chronobiol Int* [Internet]. 2018/07/19. 2018 Oct;35(11):1553–9. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30024782>
81. Allebrandt K V., Teder-Laving M, Cusumano P, Frishman G, Levandovski R, Ruepp A, et al. Identifying pathways modulating sleep duration: From genomics to transcriptomics. *Sci Rep* [Internet]. 2017;7(1):4555. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04027-7>
82. Visscher PM, Wray NR, Zhang Q, Sklar P, McCarthy MI, Brown MA, et al. 10

- Years of GWAS Discovery: Biology, Function, and Translation. *Am J Hum Genet* [Internet]. 2017 Jul 6;101(1):5–22. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28686856>
83. Christensen K, Murray JC. What genome-wide association studies can do for medicine. *N Engl J Med*. 2007 Mar;356(11):1094–7.
 84. Walker WH, Walton JC, DeVries AC, Nelson RJ. Circadian rhythm disruption and mental health. *Transl Psychiatry* [Internet]. 2020;10(1):28. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41398-020-0694-0>
 85. Boudebese C, Etain B, Goldstein T, Milhiet V, Germain A, Henry C, et al. Sleep and Circadian Profiles of Bipolar Disorder: From Chronobiology to Novel Therapeutic Strategies. *Curr Psychiatry Rev* [Internet]. 2014;10(3):235–47. Available from: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1573-4005&volume=10&issue=3&spage=235>
 86. Etain B, Milhiet V, Bellivier F, Leboyer M. Genetics of circadian rhythms and mood spectrum disorders. *Eur Neuropsychopharmacol* [Internet]. 2011;21(SUPPL.4):S676–82. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.euroneuro.2011.07.007>
 87. Soria V, Martínez-Amorós È, Escaramís G, Valero J, Crespo JM, Gutiérrez-Zotes A, et al. Resequencing and association analysis of arylalkylamine N-acetyltransferase (AANAT) gene and its contribution to major depression susceptibility. *J Pineal Res*. 2010;49(1):35–44.
 88. Gałecki P, Szemraj J, Bartosz G, Bieńkiewicz M, Gałecka E, Florkowski A, et al. Single-nucleotide polymorphisms and mRNA expression for melatonin synthesis rate-limiting enzyme in recurrent depressive disorder. *J Pineal Res*. 2010;48(4):311–7.
 89. Gałecka EE, Szemraj J, Florkowski A, Gałecki P, Bieńkiewicz M, Karbownik-Lewińska M, et al. Single nucleotide polymorphisms and mRNA expression for melatonin MT2 receptor in depression. *Psychiatry Res* [Internet]. 2011 Oct 30 [cited 2018 Mar 26];189(3):472–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21353709>

90. Terracciano A, Tanaka T, Sutin AR, Sanna S, Deiana B, Lai S, et al. Genome-wide association scan of trait depression. *Biol Psychiatry*. 2010;68(9):811–7.
91. Dmistrzak-Weglarz MPMP, Pawlak JMJM, Maciukiewicz M, Moczko J, Wilkosc M, Leszczynska-Rodziewicz A, et al. Clock gene variants differentiate mood disorders. *Mol Biol Rep*. 2015;42(1):277–88.
92. Utge SJ, Soronen P, Loukola A, Kronholm E, Ollila HM, Pirkola S, et al. Systematic analysis of circadian genes in a population-based sample reveals association of TIMELESS with depression and sleep disturbance. *PLoS One*. 2010;5(2).
93. Hua P, Liu W, Chen D, Zhao Y, Chen L, Zhang N, et al. Cry1 and Tef gene polymorphisms are associated with major depressive disorder in the Chinese population. *J Affect Disord*. 2014;157.
94. Soria V, Martínez-Amorós È, Escaramís G, Valero J, Pérez-Egea R, García C, et al. Differential association of circadian genes with mood disorders: CRY1 and NPAS2 are associated with unipolar major depression and clock and VIP with bipolar disorder. *Neuropsychopharmacology*. 2010;35(6):1279–89.
95. Lavebratt C, Sjöholm LK, Soronen P, Paunio T, Vawter MP, Bunney WE, et al. CRY2 is associated with depression. Reif A, editor. *PLoS One* [Internet]. 2010 Feb 24;5(2):e9407. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2827563/>
96. Li JZ, Bunney BG, Meng F, Hagenauer MH, Walsh DM, Vawter MP, et al. Circadian patterns of gene expression in the human brain and disruption in major depressive disorder. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2013/05/13. 2013 Jun 11;110(24):9950–5. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23671070>
97. Rusting CL, Larsen RJ. Diurnal Patterns of Unpleasant Mood: Associations with Neuroticism, Depression, and Anxiety. *J Pers* [Internet]. 1998 Feb 1;66(1):85–103. Available from: <https://doi.org/10.1111/1467-6494.00004>
98. Pilz LK, Carissimi A, Francisco AP, Oliveira MAB, Slyepchenko A, Epifano K, et al. Prospective assessment of daily patterns of mood-related symptoms. *Front Psychiatry* [Internet]. 2018 Aug 21 [cited 2019 May 21];9(AUG). Available from:

<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpsy.2018.00370/full>

99. de Souza CM, Hidalgo MPL. The midpoint of sleep on working days: A measure for chronodisruption and its association to individuals' well-being. *Chronobiol Int* [Internet]. 2015 Mar 16;32(3):341–8. Available from: <https://doi.org/10.3109/07420528.2014.979941>
100. Levandovski R, Dantas G, Fernandes LC, Caumo W, Torres I, Roenneberg T, et al. Depression scores associate with chronotype and social jetlag in a rural population. *Chronobiol Int* [Internet]. 2011 Nov 1;28(9):771–8. Available from: <https://doi.org/10.3109/07420528.2011.602445>
101. Lee A, Myung SK, Cho JJ, Jung YJ, Yoon JL, Kim MY. Night Shift Work and Risk of Depression: Meta-analysis of Observational Studies. *J Korean Med Sci* [Internet]. 2017 Jul;32(7):1091–6. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28581264>
102. Tonon AC, Fuchs DFP, Barbosa Gomes W, Levandovski R, Pio de Almeida Fleck M, Hidalgo MPL, et al. Nocturnal motor activity and light exposure: Objective actigraphy-based marks of melancholic and non-melancholic depressive disorder. Brief report. *Psychiatry Res* [Internet]. 2017 Dec [cited 2019 May 21];258:587–90. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016517811730608X>
103. Kalmbach DA, Pillai V, Cheng P, Arnedt JT, Drake CL. Shift work disorder, depression, and anxiety in the transition to rotating shifts: the role of sleep reactivity. *Sleep Med* [Internet]. 2015 Dec 1 [cited 2020 Feb 11];16(12):1532–8. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1389945715019863?via%3Dihub>
104. Jury Freitas J, Bertuol Xavier N, Comiran Tonon A, Carissimi A, Timm Pizutti L, Vieira Ilgenfritz CA, et al. 6-Sulfatoxymelatonin predicts treatment response to fluoxetine in major depressive disorder. *Ther Adv Psychopharmacol* [Internet]. 2019 Dec 27;9:204512531988192. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31908762>
105. 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 [Internet]. 2003 May 1;60(5):497–502. Available from: <https://doi.org/10.1001/archpsyc.60.5.497>
106. Etain B, Jamain S, Milhiet V, Lajnef M, Boudebessé C, Dumaine A, et al. Association between circadian genes, bipolar disorders and chronotypes. *Chronobiol Int*. 2014;31(7):807–14.
 107. Bellivier F, Geoffroy P-A, Etain B, Scott J. Sleep- and circadian rhythm-associated pathways as therapeutic targets in bipolar disorder. *Expert Opin Ther Targets* [Internet]. 2015;19(6):747–63. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1517/14728222.2015.1018822>
 108. Melo MCA, Abreu RLC, Linhares Neto VB, de Bruin PFC, de Bruin VMS. Chronotype and circadian rhythm in bipolar disorder: A systematic review. *Sleep Med Rev* [Internet]. 2017 Aug 1 [cited 2020 Feb 11];34:46–58. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1087079216300594?via%3Dihub>
 109. Katz G, Knobler HY, Laibin Z, Strauss Z, Durst R. Time zone change and major psychiatric morbidity: The results of a 6-year study in Jerusalem. *Compr Psychiatry* [Internet]. 2002 Jan 1 [cited 2020 Feb 11];43(1):37–40. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0010440X0209363X?via%3Dihub>
 110. Malkoff-Schwartz S, Frank E, Anderson BP, Hlastala SA, Luther JF, Sherrill JT, et al. Social rhythm disruption and stressful life events in the onset of bipolar and unipolar episodes. *Psychol Med* [Internet]. 2000/10/17. 2000;30(5):1005–16. Available from: <https://www.cambridge.org/core/article/social-rhythm-disruption-and-stressful-life-events-in-the-onset-of-bipolar-and-unipolar-episodes/DA46CA4BE2A38A962E0ECED3B933431C>
 111. Moon JH, Cho CH, Son GH, Geum D, Chung S, Kim H, et al. Advanced Circadian Phase in Mania and Delayed Circadian Phase in Mixed Mania and Depression Returned to Normal after Treatment of Bipolar Disorder. *EBioMedicine* [Internet]. 2016/08/13. 2016 Sep;11:285–95. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27543154>
 112. Carvalho FG, Hidalgo MP, Levandovski R. Differences in circadian patterns

- between rural and urban populations: An epidemiological study in countryside. *Chronobiol Int*. 2014;31(3):442–9.
113. Carvalho FG, De Souza CM, Loayza Hidalgo MP. Work routines moderate the association between eveningness and poor psychological well-being. *PLoS One*. 2018;13(4).
 114. de Souza CM, Hidalgo MPL. Midpoint of sleep on school days is associated with depression among adolescents. *Chronobiol Int* [Internet]. 2014 Mar 1;31(2):199–205. Available from: <https://doi.org/10.3109/07420528.2013.838575>
 115. Levandovski R, Pfaffenseller B, Carissimi A, Gama CS, Hidalgo MPL. The effect of sunlight exposure on interleukin-6 levels in depressive and non-depressive subjects. *BMC Psychiatry* [Internet]. 2013 Mar 5;13:75. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23497121>
 116. Carissimi A, Dresch F, Martins AC, Levandovski RM, Adan A, Natale V, et al. The influence of school time on sleep patterns of children and adolescents. *Sleep Med*. 2016;
 117. Carissimi A, Martins AC, Dresch F, da Silva LC, Zeni CP, Hidalgo MP. School start time influences melatonin and cortisol levels in children and adolescents – a community-based study. *Chronobiol Int* [Internet]. 2016 Nov 25;33(10):1400–9. Available from: <https://doi.org/10.1080/07420528.2016.1222537>
 118. De Souza CM, Hidalgo MPL. World Health Organization 5-item well-being index: Validation of the Brazilian Portuguese version. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 2012;262(3):239–44.
 119. Pietroiusti A, Neri A, Somma G, Coppeta L, Iavicoli I, Bergamaschi A, et al. Incidence of metabolic syndrome among night-shift healthcare workers. *Occup Environ Med* [Internet]. 2010 Jan 1;67(1):54 LP – 57. Available from: <http://oem.bmj.com/content/67/1/54.abstract>
 120. Scheer FAJL, Hilton MF, Mantzoros CS, Shea SA. Adverse metabolic and cardiovascular consequences of circadian misalignment. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2009/03/02. 2009 Mar 17;106(11):4453–8. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19255424>

121. Stevens RG. Circadian Disruption and Breast Cancer: From Melatonin to Clock Genes. *Epidemiology* [Internet]. 2005;16(2). Available from: https://journals.lww.com/epidem/Fulltext/2005/03000/Circadian_Disruption_and_Breast_Cancer__From.16.aspx
122. Hertenstein E, Feige B, Gmeiner T, Kienzler C, Spiegelhalder K, Johann A, et al. Insomnia as a predictor of mental disorders: A systematic review and meta-analysis. *Sleep Med Rev* [Internet]. 2019 Feb [cited 2019 May 21];43:96–105. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1087079218301138>
123. Tonon AC, Carissimi A, Schmitt RL, de Lima LS, Pereira F dos S, Hidalgo MP, et al. How do stress, sleep quality, and chronotype associate with clinically significant depressive symptoms? A study of young male military recruits in compulsory service. *Brazilian J Psychiatry* [Internet]. 2019 [cited 2019 Jul 13];(AHEAD). Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-44462019005009102&tlng=en
124. Tufik S, Santos-Silva R, Taddei JA, Bittencourt LRA. Obstructive sleep apnea syndrome in the Sao Paulo Epidemiologic Sleep Study. *Sleep Med*. 2010 May;11(5):441–6.
125. Kripke DF, Kline LE, Nievergelt CM, Murray SS, Shadan FF, Dawson A, et al. Genetic variants associated with sleep disorders. *Sleep Med* [Internet]. 2015 Feb 5 [cited 2019 Jul 31];16(2):217–24. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1389945714004663>
126. Kurmangaliyev YZ, Sutormin RA, Naumenko SA, Bazykin GA, Gelfand MS. Functional implications of splicing polymorphisms in the human genome. *Hum Mol Genet* [Internet]. 2013 Sep 1;22(17):3449–59. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23640990>
127. Moszyńska A, Gebert M, Collawn JF, Bartoszewski R. SNPs in microRNA target sites and their potential role in human disease. *Open Biol* [Internet]. 2017 Apr 1;7(4):170019. Available from: <http://rsob.royalsocietypublishing.org/lookup/doi/10.1098/rsob.170019>
128. Laber-Warren E. New office hours aim for well rested, more productive workers. *The New York Times* [Internet]. 2018 Dec 24; Available from:

<https://www.nytimes.com/2018/12/24/well/mind/work-schedule-hours-sleep-productivity-chronotype-night-owls.html>

129. Duffy J. Work, school and life in general tend to start early in the day – but what if your body clock didn't get the memo? Welcome to the wonderful world of social jet lag. *BBC Worklife* [Internet]. 2019 Oct 23; Available from: <https://www.bbc.com/worklife/article/20191023-the-body-clock-science-behind-later-school-start-times>
130. Hauser C, Kwai I. California Tells Schools to Start Later, Giving Teenagers More Sleep. *The New York Times* [Internet]. 2019 Oct 14; Available from: <https://www.nytimes.com/2019/10/14/us/school-sleep-start.html>
131. Vetter C, Fischer D, Matera JL, Roenneberg T. Aligning Work and Circadian Time in Shift Workers Improves Sleep and Reduces Circadian Disruption. *Curr Biol* [Internet]. 2015 Mar 30;25(7):907–11. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.01.064>
132. Ancoli-Israel S, Martin JL, Blackwell T, Buenaver L, Liu L, Meltzer LJ, et al. The SBSM Guide to Actigraphy Monitoring: Clinical and Research Applications. *Behav Sleep Med* [Internet]. 2015 Jul 17;13(sup1):S4–38. Available from: <https://doi.org/10.1080/15402002.2015.1046356>

ANEXO I – PROJETO DE PESQUISA COMPLEMENTAR

Título: Indicações do Uso Clínico de Actigrafia em Pacientes de Ambulatório de Psiquiatria com Distúrbios do Sono

Autores: Felipe Gutiérrez Carvalho; Luciene Garay; André Comiran Tonon; Alicia Carissimi; Prof.^a Maria Paz Loayza Hidalgo.

Instituições: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; Programa de Pós-Graduação em Psiquiatria e Ciências do Comportamento (CAPES 7); Laboratório de Cronobiologia e Sono da Universidade Federal do Rio Grande do Sul/ Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

A ser submetido via plataforma Brasil para apreciação do CEP/HCPA.

1. INTRODUÇÃO

As alterações relacionadas ao sono apresentam relação com piora de desfechos psiquiátricos, tanto no desenvolvimento como na manutenção de quadros de descompensação (Hertenstein et al., 2019). A avaliação dos múltiplos parâmetros fisiológicos que ocorrem durante o período do sono é comumente realizada pela Polissonografia (PSG). Apesar de constituir uma excelente ferramenta para a avaliação do paciente com alterações do sono, a PSG apresenta limitações importantes, principalmente relacionadas a dificuldades na sua realização – alto custo de aparelhagem e manutenção, necessidade de auxílio técnico durante a coleta do exame, além da necessidade de organizar o ambiente da coleta de forma que se propicie ao paciente em avaliação uma noite de sono semelhante à habitual. Outra importante limitação desse exame é o registro de apenas uma noite de sono, não sendo possível identificar padrões diários ou semanais do comportamento de sono/vigília. Nesse quesito, a Actigrafia (ACT) entra como uma excelente alternativa (Ancoli-Israel et al., 2015).

Polissonografia (PSG) x Actigrafia (ACT)

A PSG é considerada o padrão ouro para a avaliação dos múltiplos parâmetros fisiológicos que ocorrem durante o período do sono. Permite a monitorização de medidas variadas, desde atividade cerebral, por meio de eletroencefalografia, até equilíbrio homeostático, por meio do controle de oxigenação capilar e eliminação de gás carbônico (Jafari, 2010). A conformação de montagem varia entre 4 níveis:

- PSG tipo 1: É o modo padrão utilizado nas clínicas especializadas em Medicina do Sono, traz uma mensuração bastante completa dos parâmetros fisiológicos do sono, porém também apresenta custos elevados, pela necessidade de estrutura adequada e profissionais habilitados que acompanhem a sua realização. Os parâmetros incluídos nesta montagem são: eletroencefalograma (EEG) com derivações das regiões frontal, central e occipital, eletro-oculograma (EOG), eletromiograma (EMG) em mento e membros inferiores, eletrocardiograma (ECG), medidas do fluxo respiratório por meio de termistor e cânula de pressão, esforço respiratório por meio de faixas torácica e abdominal, saturação de oxigênio, e por fim sensor de posição (quando disponível).

- PSG tipo 2: Realizados com aparelho de polissonografia portátil, também conhecidos como poligrafia, que permite a realização do exame no próprio domicílio. Nessa modalidade, dependendo do aparelho utilizado, pode haver restrições quanto ao número de derivações na monitorização de EEG, e uso de monitorização cardíaca simples em vez de ECG. A PSG tipo 2 não necessita de acompanhamento de profissional habilitado, tão pouco de infraestrutura própria para a sua realização, o que reduz consideravelmente os custos relacionados ao exame.
- PSG tipo 3: Considerada como uma variação específica para avaliação de casos com alto risco de síndrome da apneia/hipopneia obstrutiva do sono (SAHOS), essa modalidade de PSG inclui apenas monitorização cardiorrespiratória, com monitorização de fluxo aéreo, monitorização cardíaca e saturação de oxigênio através de aparelhos portáteis. A montagem do equipamento requer profissional habilitado, porém o andamento do exame pode ser feito no próprio domicílio, sem acompanhamento.
- PSG tipo 4: Essa modalidade inclui monitorização contínua de apenas um a dois parâmetros, sendo que um necessariamente deve ser a saturação de oxigênio. Pela limitação de parâmetros mensurados, é utilizada em geral para casos com alta probabilidade de diagnóstico de SAHOS.

A PSG é, portanto, uma excelente ferramenta para a avaliação específica do sono, sendo adequada para a avaliação de alterações relacionadas a esse período (Jafari, 2010). Contudo, para medidas que englobam uma perspectiva de ritmos de sono e vigília ao longo de períodos prolongados, torna-se logisticamente pouco viável a realização desse tipo de monitorização.

Por outro lado, a ACT é realizada por dispositivos compactos, de fácil utilização, os quais obtêm dados de movimentação através de acelerômetros, além da coleta da variação da temperatura cutânea e ambiental, e da variação de exposição a diferentes espectros de luz. Esses aparelhos são capazes de mensurar níveis de atividade e repouso por períodos prolongados de tempo, podendo dar uma excelente medida objetiva de dados relacionados a ritmos de atividade e repouso (Ancoli-Israel et al., 2003). Embora realize a coleta de parâmetros limitados, estudos demonstram uma concordância maior que 80% entre dados actigráficos e polissonográficos para parâmetros como tempo total de sono, eficiência de sono, e tempo acordado após o início do sono (WASO). Por outro lado, visto que há

limitações importantes para detectar acordares durante o sono (níveis de especificidade variam entre 30 a 40%), o uso desses dispositivos em populações com distúrbios do sono, principalmente com componentes motores, pode ser menos confiável (Ancoli-Israel et al., 2015; Marino et al., 2013; Martin & Hakim, 2011). Dessa forma, o seu uso em contextos clínicos para avaliação de sono ainda é limitado, com algumas evidências sugerindo utilidade para a complementação de investigação diagnóstica e para a avaliação de resposta de medidas de tratamento em determinadas alterações de sono, como distúrbios relacionados aos ritmos circadianos e insônia (Morgenthaler et al., 2007; Smith et al., 2018). Já quanto às variações comportamentais circadianas, tanto em pesquisas experimentais como em pesquisas com seres humanos, a actigrafia é corriqueiramente utilizada para a avaliação objetiva desses parâmetros. Além disso, os avanços na tecnologia têm permitido o armazenamento de grande quantidade de dados por períodos prolongados, sendo um instrumento igualmente adequado para avaliação de aspectos comportamentais ao longo de períodos sazonais.

Os Ritmos de Sono e Vigília

Os comportamentos rítmicos biológicos estão presentes em diversos aspectos do nosso organismo. Entre eles, o ciclo circadiano de sono e vigília é o mais facilmente identificável. Na literatura científica, a importância da regularidade de ritmos de sono para a regulação de diversas funções fisiológicas, como o ritmo da temperatura corporal, da secreção de hormônios (melatonina e cortisol, por ex.), e da expressão proteica intracelular é bem estabelecida.

O núcleo supraquiasmático (NSQ) do hipotálamo é o nosso marcapasso interno central, agindo como o principal responsável pela regulação dos nossos ritmos corporais nas 24 horas do dia ambiental (Czeisler et al., 1986). Sua atividade sincronizadora se dá por meio de eferências que indiretamente chegam à glândula pineal através de atividade autonômica simpática (Reiter, 1991). Sabe-se que o ciclo claro/escuro é o principal regulador desse sistema. Assim, durante o escuro, essa via entra em ação, liberando adrenalina sobre os adrenoreceptores localizados nos pinealócitos, desencadeando a ativação da via biossintética da melatonina (Reiter, 1991).

a. *Ritmos e Transtornos Psiquiátricos*

Evidências sugerem uma sobreposição entre os sistemas geradores dos ritmos circadianos e as vias envolvidas na patogênese dos transtornos do humor. Do ponto de vista comportamental, é possível observar uma variação circadiana de diversos aspectos relacionados à sintomatologia psiquiátrica, como sono, apetite, libido e outros estados afetivos. Na depressão maior, um achado recorrente é a piora dos sintomas de humor concentrada no início do dia (Germain & Kupfer, 2008). Outra alteração frequente, observada em 60 - 84% dos pacientes deprimidos são as dificuldades para iniciar ou manter o sono (Quera Salva et al., 2011; Harvey, 2011). Entretanto, uma revisão sistemática demonstrou que alterações do sono com frequência precedem o desenvolvimento de depressão e de mania (Jackson, Cavanagh, & Scott, 2003), o que sustenta a hipótese de que alterações dos ritmos biológicos podem tanto se apresentar como quadros prodrômicos, como também servir como fator de risco para o desenvolvimento de um transtornos de humor. Estudos de neuroimagem reforçam a intersecção nos achados em pacientes com insônia primária e em pacientes com depressão maior (Plante, Jensen, Schoerning, & Winkelman, 2012).

Exposto isso, a proposta deste estudo é explorar os dados relacionados ao uso de aparelho de actigrafia para complementar a avaliação diagnóstica e mensurar resposta ao tratamento clínico em amostra de pacientes de ambulatório de psiquiatria com foco em distúrbios do sono.

2. JUSTIFICATIVA

Dados preliminares de exames obtidos no ambulatório de Psiquiatria do Sono do HCPA foram analisados por meio de técnicas de coeficiente de correlação intraclasse (ICC), visando avaliar o número de dias necessário para obter medidas confiáveis para determinados parâmetros. Os resultados (Figura 1) demonstram indefinição no número de dias necessários para coleta dependendo do parâmetro avaliado, com valores que variam desde 2 até 27 dias. Essa observação foi um grande incentivo para a elaboração do presente projeto, visto que a possibilidade de promover um melhor desenvolvimento no uso da actigrafia em contextos clínicos pode gerar resultados promissores inclusive para níveis de saúde pública.

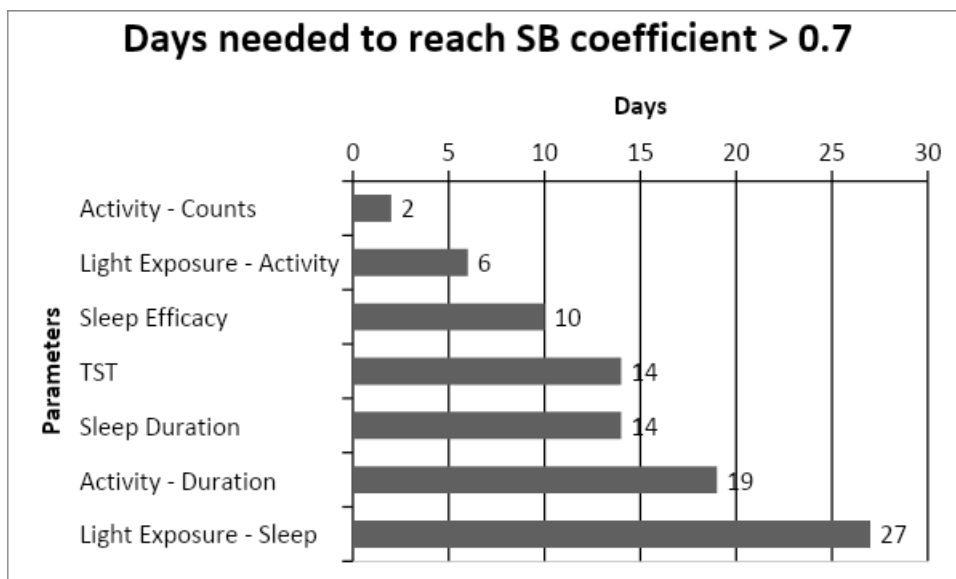


Figura 1 – Dias necessários para alcançar coeficiente de correlação intraclasse > 0.7 utilizando a fórmula de Spearman-Brown (N=27).

3. OBJETIVOS

a. Objetivo Geral

Analisar os valores preditivos de parâmetros de atividade/repouso e exposição à luz no diagnóstico e no seguimento de pacientes de ambulatório de psiquiatria com foco em distúrbios do sono através da revisão de prontuário clínico.

b. Objetivos Específicos

- Identificar os fatores relacionados a ritmo de atividade/repouso aferidos pela actigrafia por 14, 21 e 28 dias os quais contribuam para:
 - o diagnóstico clínico de distúrbios de sono;
 - o controle de resposta terapêutica de distúrbios de sono;
- Identificar os fatores relacionados à exposição à luz feridos pela actigrafia por 14, 21 e 28 dias que contribuam para:
 - o diagnóstico clínico de distúrbios de sono;
 - o controle de resposta terapêutica de distúrbios de sono;
- Correlacionar os parâmetros clínicos dos pacientes atendidos (através da revisão de prontuário) com os questionários de avaliação subjetiva e com os parâmetros de actigrafia;
- Identificar quais os parâmetros subjetivos de sono avaliados pelos questionários que mais se associam com a necessidade de medicação hipnótica diária (e.g. benzodiazepínicos, zolpidem).

4. METODOLOGIA

a. Delineamento

- Estudo retrospectivo dos prontuários do ambulatório

b. Fatores de estudo

- Parâmetros actigráficos
- Dados do diário do sono
- Dados sociodemográficos
- Dados clínicos do histórico de acompanhamento
- Tipologia circadiana
- Qualidade de sono
- Sintomatologia de sono
- Comorbidades clínico-psiquiátricas

c. Desfechos

- Dados da evolução clínica ambulatorial: diagnóstico e melhora clínica;
- Melhora dos parâmetros de sono: duração, eficiência, qualidade subjetiva de sono, uso de medicações;
- Utilização de medicação hipnótica diária (e.g. benzodiazepínicos, zolpidem).

d. Amostragem

A amostra será composta por pacientes do ambulatório de Psiquiatria do Sono (POO) do HCPA. Os dados serão adquiridos por consulta de prontuário dos pacientes vinculados ao ambulatório. O fluxo de encaminhamento ao ambulatório e de atendimento clínico estão descritos na Figura 2.

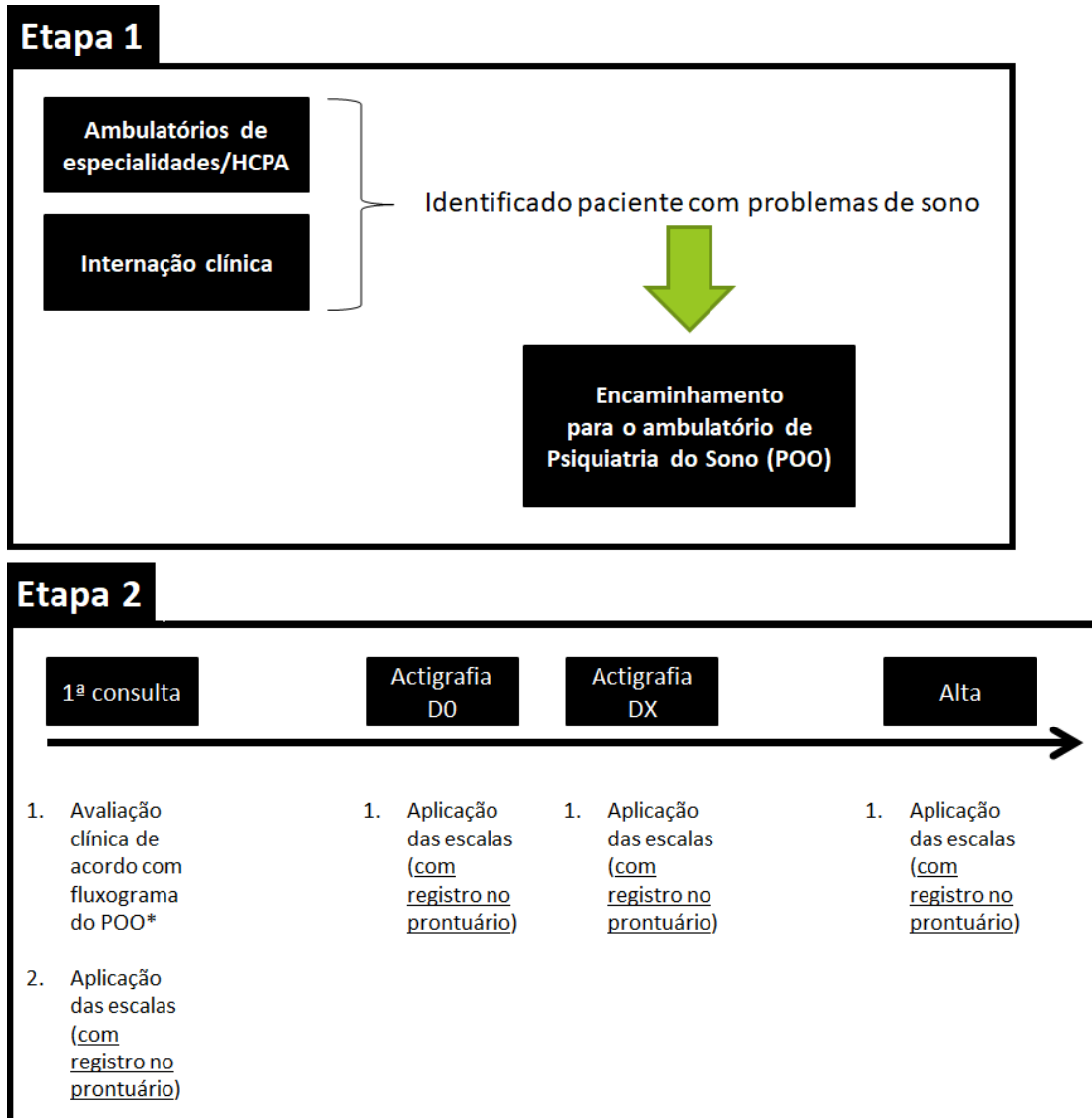


Figura 2 - As etapas de encaminhamento (ETAPA 1) e de acompanhamento (ETAPA 2) do ambulatório de Psiquiatria Sono.

e. Instrumentos

Os seguintes instrumentos de avaliação fazem parte do protocolo de atendimento das avaliações realizadas no ambulatório, e constarão no registro da evolução das consultas ambulatoriais. Todas as avaliações a seguir fazem parte do protocolo de atendimento assistencial do ambulatório de psiquiatria com foco em distúrbios do sono do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Instrumento de Ritmo de Humor (MRhI): O Instrumento De Ritmo De Humor foi desenvolvido para avaliar a variação diária de comportamentos e necessidades fisiológicas

relacionadas aos quadros de humor (de Souza et al., 2016). Compõe-se de 15 questões nas quais deve ser informado se há percepção de ritmicidade nas 24-horas para cada variável investigada e o horário de pico diário (acrofase) dessas variáveis em uma escala análogo visual que corresponde às 24 horas do dia.

Questionário de Cronotipo de Munique (MCTQ): O *Munich Chronotype Questionnaire* (MCTQ) avalia os comportamentos de sono e vigília, separadamente para os dias de semana e dias livres, assumindo-se que a expressão desse comportamento circadiano mais aproximada ao que se passa do ponto de vista endógeno e fisiológico deve ser observado em momentos livres das contingências sociais (Roenneberg, Wirz-Justice, & Mellow, 2003). O ponto médio do sono (horário de início do sono + (duração total do sono/2)) será usado como marcador de comportamento de sono-vigília. Através do MCTQ também é possível a avaliação do número de horas de exposição à luz solar autorrelatadas nos dias de semana e dias livres.

Índice de Qualidade de Sono de Pittsburgh (PSQI): Esse instrumento avalia a qualidade do sono ao longo do último mês (Buysse, Reynolds, Monk, Berman, & Kupfer, 1989). É composto por 19 questões divididas em 7 grupos, os quais abrangem aspectos variados relacionados ao sono. As perguntas são graduadas em uma escala que varia de 0 a 3, sendo a pontuação final de até 21 pontos. Quanto maior a pontuação obtida, pior a qualidade de sono. O instrumento foi validado para o português brasileiro por Bertolazi e colaboradores (Bertolazi et al., 2011).

Índice de Gravidade de Insônia: Por meio de 7 itens autopreenchíveis, esse instrumento é capaz de mensurar aspectos variados de sintomas de insônia, como natureza, gravidade, e impacto na funcionalidade diária no último mês (Bastien, Vallières, & Morin, 2001). Os parâmetros analisados são: dificuldade em iniciar o sono, dificuldade em manter o sono, problemas relacionados a acordar pela manhã, insatisfação relacionada ao sono, e interferência das questões de sono nas atividades diárias. Uma escala *Likert* de 5 pontos é utilizada para mensurar cada um dos itens - de 0= sem problemas a 4= problema muito grave, com um escore total que varia de 0 a 28 pontos. Os escores totais são interpretados como 0 - 7 para ausência de insônia, 8 - 14 para insônia limítrofe, 15 - 21 para insônia moderada, e 22 - 28 para insônia grave.

* **Protocolos clínicos assistenciais do ambulatório POO:** A necessidade de um protocolo clínico padronizado para as análises propostas no presente projeto de pesquisa

levaram à elaboração da primeira versão do Protocolo Assistencial Padrão disponibilizado em plataformas digitais (ANEXO A – APPOO Versão 1.0). O formato digital foi idealizado visando perspectivas futuras que possibilitem a interação automática entre o APPOO e dispositivos compostos por acelerômetros (como telefones celulares e *smart watches*).

f. Actimetria

As variáveis de ritmo serão avaliadas por monitoramento actigráfico contínuo usado no punho dos pacientes com indicação de uso pelos protocolos de atendimento, ao longo de 14 a 28 dias. O modelo de actígrafo previsto para este estudo será *Actiwatch 2 Respironics* (Philips), que mede a atividade e a exposição à luz ambiente. Este aparelho contém um acelerômetro que é capaz de detectar e quantificar a movimentação ao longo do período de registro. O software utilizado para a leitura dos dados será o *Actiware*. Os dados serão convertidos para documentos *.txt*, que podem ser processados pelo programa "El Temps" para análise de dados circulares.

g. Análise estatística

Serão realizados Teste t e ANCOVA para variáveis contínuas e Qui-quadrado para variáveis categóricas para comparação entre pré e pós-tratamento. O banco de dados será digitado no software Microsoft Excel 2010, e as análises estatísticas serão realizadas no software SPSS 18. As variáveis de ritmos derivadas da análise de cosinor, amplitude (diferença entre o mesor e o pico) e acrofase (valor de pico), serão realizadas com vistas a avaliar características rítmicas entre os dados moleculares e clínicos. Será também realizada análise de Rayleigh para comparação de acrofases entre os grupos. As análises estatísticas temporais serão realizadas através do software El Temps v.292.

5. COMPOSIÇÃO DA EQUIPE

- **Professor Felipe Gutiérrez Carvalho**

Psiquiatra com área de atuação em Medicina do Sono; Professor Auxiliar da Faculdade de Medicina da Universidade do Vale do Rio dos Sinos (UNISINOS). Doutorando pelo PPG Psiquiatria e Ciências do Comportamento/UFRGS. Mestre em Psiquiatria e Ciências do Comportamento/UFRGS. Integrante do Laboratório de Cronobiologia e Sono HCPA/UFRGS. Médico Psiquiatra do SMO/HCPA.

- **Eduardo Giordani Steibel**

Estudante de Psicologia pela PUCRS do sexto semestre. Integrante do Laboratório de Cronobiologia e Sono do HCPA/UFRGS.

- **Thiago Maia Greco**

Estudante de Ciências Biológicas pela ULBRA. Aluno de Iniciação Científica do Laboratório de Cronobiologia e Sono HCPA/UFRGS.

- **Ana Maria Delgado Cunha**

Estudante de Medicina pela UFRGS. Aluna de Iniciação Científica do Laboratório de Cronobiologia e Sono HCPA/UFRGS.

- **Luciene Lima dos Santos Garay**

Neuropsicóloga. Graduada em Psicologia (PUCRS). Especialista em Neuropsicologia (UFRGS). Especialista em Terapia Familiar e de Casais (InTCC). Mestranda em Psiquiatria e Ciências do Comportamento, integrante do laboratório de Cronobiologia e Sono HCPA/UFRGS.

- **André Comiran Tonon**

Médico; doutorando no PPG Psiquiatria e Ciências do Comportamento FAMED-UFRGS. Integrante do Laboratório de Cronobiologia e Sono HCPA/UFRGS.

- **Alicia Carissimi**

Psicóloga; Doutora pelo PPG Psiquiatria e Ciências do Comportamento FAMED-UFRGS; Pós-Doutorado em andamento. Integrante do Laboratório de Cronobiologia e Sono HCPA/UFRGS.

- **Professora Maria Paz Loayza Hidalgo**

Psiquiatra; Coordenadora do Laboratório de Cronobiologia e Sono do HCPA-UFRGS; coordenadora do Grupo de Pesquisa HCPA-CNPQ em Cronobiologia Humana. Professora adjunta do Departamento de Psiquiatria e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da UFRGS- Regime de Dedicção Exclusiva.

6. DISPONIBILIDADE EFETIVA DE INFRAESTRUTURA

O ambulatório de Psiquiatria do Sono (POO) atende pacientes provenientes de outras especialidades ambulatoriais do HCPA. Os atendimentos ocorrem todas as quartas-feiras na zona 7, salas 701 e 702, totalizando 2 horários reservados para primeiras consultas, e 6 horários para reconsultas.

7. ASPECTOS ÉTICOS

O protocolo seguirá as condições estabelecidas na Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde (CNS). O projeto será submetido à aprovação pela Comissão de Ética e Pesquisa em Saúde do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

O sigilo quanto às informações coletadas nos prontuários eletrônicos e com os indivíduos de pesquisa será assegurado através de adequado treinamento da equipe envolvida com a coleta de dados dos prontuários, além do comprometimento ético dos pesquisadores participantes da pesquisa no manuseio e no tratamento das informações. Todas as informações coletadas serão arquivadas em local apropriado, não sendo utilizadas para qualquer outra finalidade além dos objetivos propostos.

A utilização dos dados de actigrafia também para fins de pesquisa será informada a todos os participantes, assim como a garantia da confidencialidade dos dados em qualquer relatório desta pesquisa ou qualquer documento que possa ser produzido a partir dela. Essas informações estão previstas no termo do consentimento livre esclarecido que deverá ser assinado por todos os sujeitos ou responsáveis legais antes que sejam realizados quaisquer procedimentos relacionados a este protocolo (ANEXO B). A participação dos dados dos sujeitos na pesquisa será voluntária, e estes poderão se afastar do processo de investigação, ou solicitar o não uso dos dados actigráficos para fins de pesquisa a qualquer momento caso seja manifestada essa vontade. Considerando que não haverá coleta de dados adicionais proposta pelo presente projeto, o termo de consentimento tem como seu propósito único a autorização de uso das informações clínicas do ambulatório e do exame de actigrafia para pesquisa.

8. CRONOGRAMA

- **08/2019 – 03/2020**: Elaboração dos protocolos de atendimento ambulatorio de Psiquiatria do Sono (POO) do HCPA e do projeto de pesquisa;
- **03/2020 – 04/2020**: Submissão do projeto de pesquisa ao CEP/HCPA
- **04/2020 – 07/2023**: Análise dos dados coletados nos prontuários clínicos do POO/HCPA; análise dos dados, e publicação dos resultados em revistas científicas.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DO PROJETO COMPLEMENTAR

- A. Quera Salva, M., Hartley, S., Barbot, F., C. Alvarez, J., Lofaso, F., & Guilleminault, C. (2011). Circadian Rhythms, Melatonin and Depression. *Current Pharmaceutical Design*. <https://doi.org/10.2174/138161211796197188>
- Ancoli-Israel, S., Cole, R., Alessi, C., Chambers, M., Moorcroft, W., & Pollak, C. P. (2003). The role of actigraphy in the study of sleep and circadian rhythms. *Sleep*, 26(3), 342–392. <https://doi.org/10.1093/sleep/26.3.342>
- Ancoli-Israel, S., Martin, J. L., Blackwell, T., Buenaver, L., Liu, L., Meltzer, L. J., ... Taylor, D. J. (2015). The SBSM Guide to Actigraphy Monitoring: Clinical and Research Applications. *Behavioral Sleep Medicine*, 13(sup1), S4–S38. <https://doi.org/10.1080/15402002.2015.1046356>
- Bastien, C. H., Vallières, A., & Morin, C. M. (2001). Validation of the Insomnia Severity Index as an outcome measure for insomnia research. *Sleep Medicine*, 2(4), 297–307. [https://doi.org/10.1016/S1389-9457\(00\)00065-4](https://doi.org/10.1016/S1389-9457(00)00065-4)
- Bertolazi, A. N., Fagondes, S. C., Hoff, L. S., Dartora, E. G., da Silva Miozzo, I. C., de Barba, M. E. F., & Menna Barreto, S. S. (2011). Validation of the Brazilian Portuguese version of the Pittsburgh Sleep Quality Index. *Sleep Medicine*, 12(1), 70–75. <https://doi.org/10.1016/j.sleep.2010.04.020>
- Buyse, D. J., Reynolds, C. F., Monk, T. H., Berman, S. R., & Kupfer, D. J. (1989). The Pittsburgh sleep quality index: A new instrument for psychiatric practice and research. *Psychiatry Research*, 28(2), 193–213. [https://doi.org/10.1016/0165-1781\(89\)90047-4](https://doi.org/10.1016/0165-1781(89)90047-4)
- Czeisler, C. A., Allan, J. S., Strogatz, S. H., Ronda, J. M., Sanchez, R., Rios, C. D., ... Kronauer, R. E. (1986). Bright light resets the human circadian pacemaker independent of the timing of the sleep-wake cycle. *Science*, 233(4764), 667. <https://doi.org/10.1126/science.3726555>
- de Souza, C. M., Carissimi, A., Costa, D., Francisco, A. P., Medeiros, M. S., Ilgenfritz, C. A., ... Hidalgo, M. P. (2016). The Mood Rhythm Instrument: development and preliminary report . *Revista Brasileira de Psiquiatria*, 38(2), 148–153. <https://doi.org/10.1590/1516-4446-2015-1763>
- Germain, A., & Kupfer, D. J. (2008). Circadian rhythm disturbances in depression. *Human Psychopharmacology*, 23(7), 571–585. <https://doi.org/10.1002/hup.964>
- Harvey, A. G. (2011). Sleep and Circadian Functioning: Critical Mechanisms in the Mood Disorders? *Annual Review of Clinical Psychology*, 7(1), 297–319.

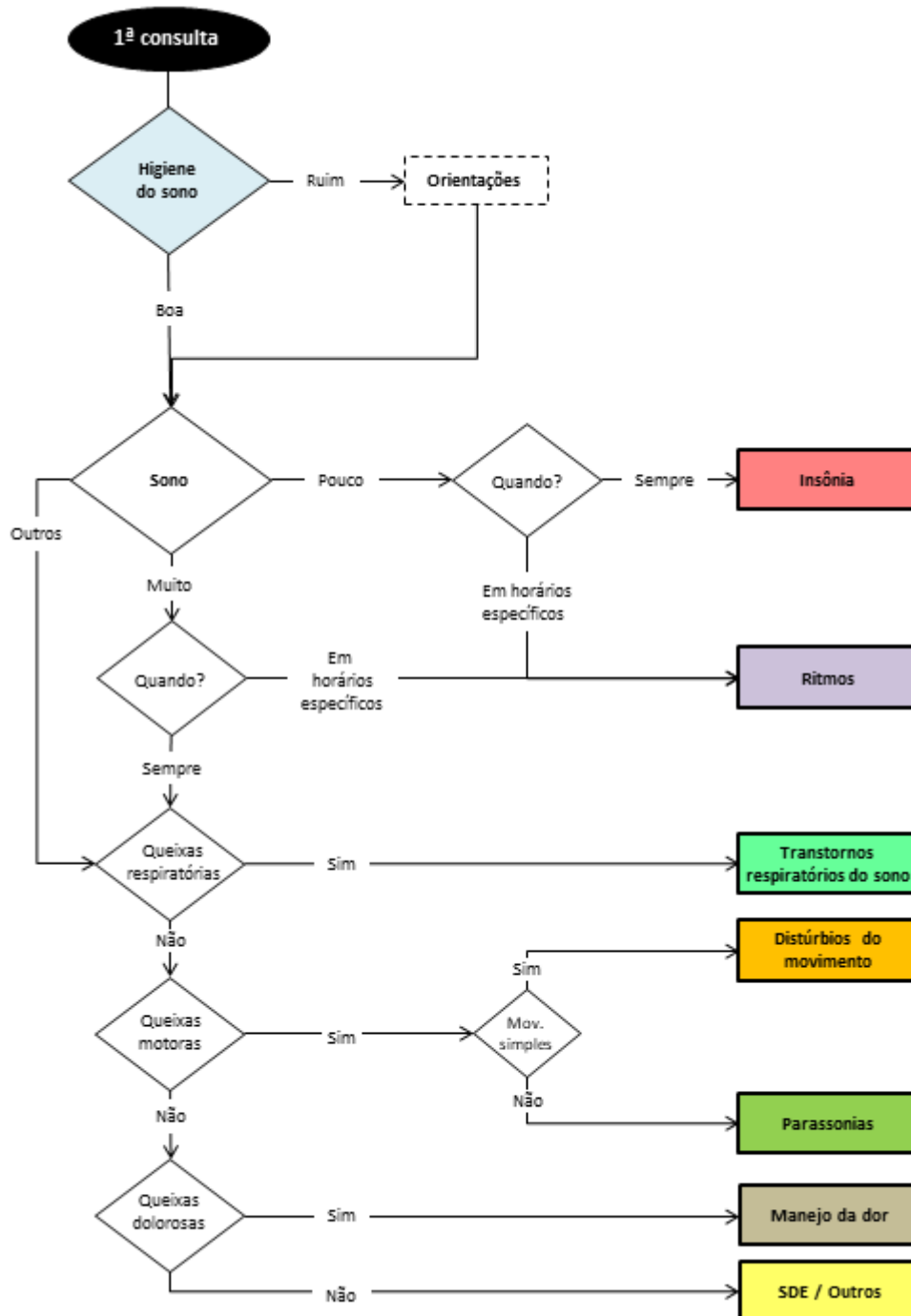
<https://doi.org/10.1146/annurev-clinpsy-032210-104550>

- Hertenstein, E., Feige, B., Gmeiner, T., Kienzler, C., Spiegelhalder, K., Johann, A., ... Baglioni, C. (2019). Insomnia as a predictor of mental disorders: A systematic review and meta-analysis. *Sleep Medicine Reviews*, 43, 96–105. <https://doi.org/10.1016/j.smrv.2018.10.006>
- Jackson, A., Cavanagh, J., & Scott, J. (2003). A systematic review of manic and depressive prodromes. *Journal of Affective Disorders*, 74(3), 209–217. [https://doi.org/10.1016/S0165-0327\(02\)00266-5](https://doi.org/10.1016/S0165-0327(02)00266-5)
- Jafari, B. (2010). Polysomnography. *Clinics in Chest Medicine*, 31(2), 287–297. <https://doi.org/10.1016/J.CCM.2010.02.005>
- Marino, M., Li, Y., Rueschman, M. N., Winkelman, J. W., Ellenbogen, J. M., Solet, J. M., ... Buxton, O. M. (2013). Measuring sleep: accuracy, sensitivity, and specificity of wrist actigraphy compared to polysomnography. *Sleep*, 36(11), 1747–1755. <https://doi.org/10.5665/sleep.3142>
- Martin, J. L., & Hakim, A. D. (2011). Wrist Actigraphy. *CHEST*, 139(6), 1514–1527. <https://doi.org/10.1378/chest.10-1872>
- Morgenthaler, T., Alessi, C., Friedman, L., Owens, J., Kapur, V., Boehlecke, B., ... Swick, T. J. (2007). Practice parameters for the use of actigraphy in the assessment of sleep and sleep disorders: an update for 2007. *Sleep*, 30(4), 519–529. <https://doi.org/10.1093/sleep/30.4.519>
- Plante, D. T., Jensen, J. E., Schoernig, L., & Winkelman, J. W. (2012). Reduced γ -aminobutyric acid in occipital and anterior cingulate cortices in primary insomnia: a link to major depressive disorder? *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 37(6), 1548–1557. <https://doi.org/10.1038/npp.2012.4>
- Reiter, R. J. (1991). Neuroendocrine effects of light. *International Journal of Biometereology*, 35(3), 169–175.
- Roenneberg, T., Wirz-Justice, A., & Mellow, M. (2003). Life between Clocks: Daily Temporal Patterns of Human Chronotypes. *Journal of Biological Rhythms*, 18(1), 80–90. <https://doi.org/10.1177/0748730402239679>
- Smith, M. T., McCrae, C. S., Cheung, J., Martin, J. L., Harrod, C. G., Heald, J. L., & Carden, K. A. (2018). Use of Actigraphy for the Evaluation of Sleep Disorders and Circadian Rhythm Sleep-Wake Disorders: An American Academy of Sleep Medicine Clinical Practice Guideline. *Journal of Clinical Sleep Medicine: JCSM: Official*

Publication of the American Academy of Sleep Medicine, 14(7), 1231–1237.
<https://doi.org/10.5664/jcsm.7230>

ANEXOS DO PROJETO DE PESQUISA COMPLEMENTAR

A. Exemplo do fluxograma de atendimento com Interface inicial APPOO Versão 1.0



B. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Nº do projeto GPPG ou CAAE _____

INDICAÇÕES DO USO CLÍNICO DE ACTIGRAFIA EM PACIENTES DE AMBULATÓRIO DE PSIQUIATRIA COM DISTÚRBIOS DO SONO

Você está sendo convidado(a) a participar de uma pesquisa cujo objetivo é entender o uso clínico da actigrafia (o uso de um aparelho semelhante a um relógio de pulso para monitorização de atividade/repouso e exposição à luz) para diagnóstico e tratamento de problemas de sono no ambulatório que você está realizando seu acompanhamento médico em Psiquiatria. Esta pesquisa está sendo realizada pelo Laboratório de Cronobiologia e Sono do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA/UFRGS), que integra parte da equipe que atende você neste ambulatório.

Ao concordar com a participação na pesquisa, não haverá qualquer alteração no seu tratamento no ambulatório assistencial. A assinatura deste termo representa que você autoriza o uso de suas informações clínicas para realização de pesquisas na área. Os dados coletados durante a pesquisa serão sempre tratados confidencialmente. Os resultados serão apresentados de forma conjunta, sem a identificação dos participantes, ou seja, você não será identificado na publicação dos resultados caso você concorde em participar.

Não há riscos ou desconfortos decorrentes da sua participação na pesquisa, considerando que não há outros procedimentos além dos padronizados no atendimento do ambulatório. Também não há benefícios diretos decorrentes da participação, mas este projeto poderá contribuir para aumentar o conhecimento das técnicas de actigrafia para uso na assistência clínica de futuros pacientes.

A participação na pesquisa é totalmente voluntária, ou seja, não é obrigatória. Caso você decida não autorizar a participação, ou ainda, retirar a autorização após a assinatura desse Termo, não haverá nenhum prejuízo no seu atendimento na instituição. Não está previsto nenhum tipo de pagamento pela participação na pesquisa e não haverá nenhum custo com respeito aos procedimentos envolvidos.

Caso você tenha dúvidas, poderá entrar em contato com a equipe do Laboratório de Cronobiologia e Sono, pesquisadora responsável Profª Drª Maria Paz Hidalgo, pelo telefone (51) 3359-6339; ou com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), pelo telefone (51) 3359-7640.

Esse Termo é assinado em duas vias, sendo uma para o participante e seu responsável e outra para os pesquisadores.

Nome do participante da pesquisa

Assinatura

Nome do pesquisador que aplicou este termo

Assinatura

Local e Data: _____

ANEXO II – PRODUÇÃO COMPLEMENTAR

A. TRABALHOS APRESENTADOS EM EVENTOS CIENTÍFICOS

Pôster e apresentação oral - O caminho do bem-estar psicológico: um estudo de mediação/moderação sobre os padrões de sono-vigília, autoeficácia, rotinas de trabalho e bem estar psicológico. XXVIII Salão de Iniciação Científica da UFRGS (2016); Apresentadora: Juliana Jury Freitas.

Pôster - O caminho do bem-estar psicológico: um estudo de mediação/moderação sobre os padrões de sono-vigília, autoeficácia, rotinas de trabalho e bem estar psicológico. 36ª Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (2016); Apresentador: Carlos Augusto Vieira Ilgenfritz.

Pôster - Polimorfismo do gene *AANAT* está associado a risco de depressão em mulheres. XXXII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FESBE (2017). Apresentadora: Lívia Lopez Torres.

Pôster e apresentação oral - Relação entre qualidade do sono e polimorfismos dos genes do relógio. XXXI Salão de Iniciação Científica UFRGS (2019). Apresentadora: Ana Maria Delgado Cunha.

B. OUTROS TRABALHOS PUBLICADOS/PRODUZIDOS DURANTE O PERÍODO DE DOUTORAMENTO

Pôster - Preditores cronobiológicos de melhora na depressão unipolar. 36ª Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (2016). Apresentadora: Juliana Jury Freitas.

Artigo - Validation of the English Version of the Mood Rhythm Instrument. Submetido à BMC Psychiatry em 2019. Primeira autora: Melissa Alves Braga de Oliveira.

Artigo - Mood and Biological Rhythm Differences in Individuals at-Risk for Psychiatric Disorders. Submetido à Canadian Journal of Psychiatry em 2020. Primeira autora: Salina Mathur.