UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

Perfil Cronobiológico em Amostra Populacional Caucasiana: Abordagem Cronobiológica dos Sintomas Depressivos

Autor: Rosa Maria Levandovski
Orientador: Maria Paz Loayza Hidalgo

Tese de Doutorado

Porto Alegre
2011

FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

Perfil Cronobiológico em Amostra Populacional Caucasiana: Abordagem Cronobiológica dos Sintomas Depressivos

Tese de Doutorado em Ciências Médicas
Área de Atuação: Cronobiologia

Orientador: Maria Paz Loayza Hidalgo

Rosa Maria Levandovski

Porto Alegre
2011

L655p Levandovski, Rosa Maria
Perfil cronobiológico em amostra populacional caucasiana: abordagem cronobiológica dos sintomas depressivos/ Rosa Maria Levandovski – Porto Alegre: 2011.
250f.

Tese (Doutorado) Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas. Faculdade de Medicina. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

Orientação: Maria Paz Loayza Hidalgo.

1.Fenômenos Cronobiológicos 2.Transtornos de Humor.4.Depressão. 5.Ritmo Circadiano.6.Transtornos do Sono do Ritmo Circadiano. 7.Hidalgo, Maria Paz Loayza, orient.I.Título.

CDU 616.89-008.454:577.33(043.2)

Ficha catalográfica elaborada por Izabel A. Merlo, CRB 10/329.

À minha família

"Unsere Wünsche sind Vorgefühle der Fähigkeiten, die in uns liegen, Vorboten desjenigen, was wir zu leisten imstande sein werden. Was wir können und möchten, stellt sich unserer Einbildungskraft außer uns und in der Zukunft dar; wir fühlen eine Sehnsucht nach dem, was wir schon im Stillen besitzen. So verwandelt ein leidenschaftliches Vorausgreifen das wahrhaft Mögliche in ein erträumtes Wirkliches."

Johann Wolfgang von Goethe (1979-1832)

AGRADECIMENTOS

À PROFESSORA DRA. MARIA PAZ LOAYZA HIDALGO, pela incansável dedicação ao desenvolvimento dessa pesquisa, por oportunizar o desenvolvimento técnico do meu saber e estímulo à realização dessa pesquisa.

À CAPES/DAAD, pela oportunidade de colaboração e auxilio financeiro no período de estágio na Universidade de Munique durante a execução das análises e desenvolvimento teórico deste estudo.

AO INSTITUTE OF MEDICAL PSYCHOLOGY OF THE LUDWIG MAXIMILIANS UNIVERSITY OF MUNICH (LMU) E AOS PROFESSORES: TILL RONNEBERG E KARLA ALLEBRANDT, que oportunizaram a realização deste estudo no âmbito de uma unidade acadêmica de um centro de referencia na Alemanha.

À UNIVATES, pela colaboração na execução das etapas de pesquisa de campo, durante a fase de coletas de dados e amostras.

AO GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO DO HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE, que apoiou o presente estudo.

À UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL, pelo desenvolvimento de minha vida acadêmica.

AOS COLEGAS DO LABORATÓRIO DE CRONOBIOLOGIA DO HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE, fonte constante de aprendizado, pelo companheirismo, amizade e incentivo.

ÀS COLEGAS ANA BEATRIZ CAUDURO HARB e FABIANA BERNARDI, dedico um especial agradecimento pelo companherismo, estímulo e auxílio incondicionais recebidos durante todo o caminha trilhado.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À CARLOS EDUARDO DE ROSE, pelo companheirismo e estímulo incondicionais recebidos durante todo o tempo de execução desta Tese. Sobretudo, pelo empenho dedicado durante a fase de coletas dados, no Vale do Taquari, onde teve efetiva participação para que nossos objetivos fossem atingidos. Não poderia deixar de mencionar as ausências necessárias e o apoio recebido durante a temporada que estive na Alemanha, período este em que me acompanhou, não medindo esforços para que este estágio fosse o mais proveitoso tanto no sentido acadêmico, como pessoal.

ÍNDICE GERAL

RESUMO 12
ABSTRACT 15
INTRODUÇÃO 22
1 REVISÃO DA LITERATURA 26
1.1 Estratégias utilizadas para localizar e selecionar as informações 26
1.1.1 Mapa catalográfico 27
1.2 As Primeiras Evidências sobre os Ritmos Biológicos 28
1.3 Os Primeiros Ritmos Estudados 30
1.4 A Evolução da Cronobiologia como Ciência 33
2 CRONOBIOLOGIA: PRINCIPAIS CONCEITOS 36
2.1 Ritmos e seus Parâmetros 36
2.1.1 Período 37
2.1.2 Frequência 37
2.1.3 Nadir ou Batifase 38
2.1.4 Acrofase ou Zênite 38
2.1.5 Mesor 38
2.1.6 Amplitude 38
2.1.7 Fase 39
2.2 Classificações dos Ritmos 39
2.3 Relação de Fases 39
2.4 Representação Gráfica da Acrofase 43
3 O RELÓGIO CIRCADIANO DE MAMÍFEROS 45
3.1 Relógio Biológico 45
3.2 Localização do Relógio Central de Mamíferos 45
3.3 O NSQ como o Marca-passo Circadiano Central 46
3.4 Agentes Sincronizadores 48
3.5 Osciladores Biológicos 51
3.6 Controle Transcricional dos Osciladores Periféricos 53
4 RITMOS CIRCADIANOS E IMPLICAÇÕES CLÍNICAS 56
4.1 Ritmos da Melatonina 57
4.2 Ritmos de outros Hormônios 59
4.3 Ritmo Alimentar 60
4.4 Ritmos de Trabalho 61
5 CRONOTIPO 63
5.1 Questionário de Matutinidade Vespertinidade de Horne-Otsberg 65
5.2 Vantagens e Desvantagens do MEQ 66
5.3 Questionário de Cronotipo de Munique (MCTQ) 68
5.4 Cálculos Utilizados para Avaliação do MCTQ 69
5.4.1 Período do Inicio do Sono (Sleep onset) 70
5.4.2 Duração do Sono (Sleep Duration) 70
5.4.3 Ponto Médio do Sono (Mid-Sleep) 71
5.4.4 Duração Média do Sono (Average Sleep Duration) 71
5.4.5 Correção do Débito do Sono 72
5.4.6 Jet Lag Social 73

6 LIMITAÇÕES DAS ESCALAS AVALIADAS 74
7 DISTÚRBIOS DO RITMO CIRCADIANO 78
7.1 Alterações do Sono 78
7.2 Dessincronização após Vôos Transmeridionais – Jet Lag 80
7.3 Transtornos do Humor 81
8 ABORDAGEM CRONOBIOLOGICA DA DEPRESSÃO 84
9 JUSTIFICATIVA 86
10 OBJETIVOS 87
11 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 88
12 ARTIGOS ORIGINADOS 96
12.1 Artigo 1 98
12.2 Artigo 2 127
13 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS 193

ÍNDICE DOS ANEXOS

ANEXO I 197
METODOLOGIA 197
Objetivos 198
Objetivos Específicos 198
Delineamento 199
Amostragem 199
Cálculo da Amostra 203
Critérios de Inclusão 203
Critérios de Exclusão 204
Definição dos Fatores em Estudo 205
Definição dos desfechos 205
Instrumentos de aferição 205
Procedimentos 207
Controle de Qualidade 209
Processamento dos Dados e Análise Estatística 210
Aspectos Éticos 210
Descrição das Metas de Formação e Capacitação Almejadas 211
Identificação das Linhas de Atuação na Área Pretendida 212
ANEXO II 213
RESULTADOS 213
Características Gerais da Amostra 216
Cidades pesquisadas 216
Características Gerais 216
Tipologia Cronotipica da Amostra 220
Seleção da Amostra para Avaliação do Cronotipo com o MCTQ 220
Anexo III 235
OUTROS ARTIGOS PUBLICADOS 235
ANEXO IV 237
APRESENTAÇOES EM CONGRESSOS INTERNACIONAIS 237
ABSTRACT SUBMISSION 1 238
ABSTRACT SUBMISSION II 240
ABSTRACT SUBMISSION III 242
ABSTRACT SUBMISSION IV 245
ANEXO V 247
INSTRUMENTOS 247
INSTRUMENTO I – MCTQ 248
INSTRUMENTO II – Inventário de BECK 248

RESUMO

RESUMO

As preferências interindividuais de fase circadiana também são denominadas de cronotipo, considerado como um traço pessoal e caracterizado pelas diferenças dos ritmos circadianos. Nos últimos anos o interesse no estudo desta tipologia tem aumentado, sendo de particular relevância para compreender a organização temporal do processo de regulação do organismo. O questionário de Cronotipo de Munique (MCTQ) é um novo método de avaliação do cronotipo que avalia o período médio do sono durante os dias livres e de trabalho. As características individuais cronobiológicas, relacionadas às preferências para alocar as atividades durante o dia, também foram relacionadas aos distúrbios de humor. O presente trabalho foi realizado pelo núcleo de pesquisa de Cronobiologia do Hospital de Clínicas em colaboração coma a Universidade de Munique na Alemanha, tendo por objetivo avaliar em uma amostra populacional do Vale do Taquari a variabilidade interindividual dos cronotipos e sua relação com os níveis de sintomas depressivos. Foi observada uma dependência entre as variáveis de idade e gênero tanto para a distribuição do MCTQ, quanto para a distribuição dos escores da BECK. A distribuição do BECK mostrou uma correlação não linear com o MSF (*Pearson* = 0,094; $p < 0,0001$), demonstrando que os sintomas depressivos predominaram na maior parte entre os indivíduos que apresentam um avanço na fase do sono, mas também os tipos matutinos apresentaram uma tendência de maior pontuação na escala BECK. Houve uma diferença no ponto médio do sono entre dias de trabalho e os dias livres, nos diferentes cronotipos. Essa característica foi denominada no presente estudo como jet lag social e mostrou uma correlação positiva tanto com MSF (*Spearman* $r^2 = 0,381$, $p < 0,0001$), quanto com BECK (*Spearman* $r^2 = 0,297$, $p < 0,0001$). Quanto maior o jet lag social, mais intenso foram os sintomas depressivos, os indivíduos que apresentaram jet lag social entre 0 e 2 horas

(N = 3.674) relataram sintomas significativamente menores de depressão do que aqueles que apresentaram 2 a 4 horas (N = 320), ou mais de 4 horas (N = 57, ANOVA: F = 79,36, $p <$ 0,0001). A correlação entre o nível de sintomas depressivos e o jet lag social não ocorreu somente nos grupos vespertinos, mas também entre os tipos intermediários e matutinos (*Spearman* r^2 = 0,233, p < 0,0001; r^2 = 0,275, p = 0,0001 e r^2 = 0,311, $p <$ 0,0001, respectivamente). Estes resultados sugerem que a relação do cronotipo com o risco de sintomas depressivos pode ser entendida pela exposição destes indivíduos a situações de periodicidade ambiental diferentes da ritmicidade interna do organismo, o que corresponde a um desalinhamento dos ritmos circadianos internos com os externos.

Palavras chaves: Cronobiologia, Cronotipo, Depressão, Jet Lag Social, Meia Fase de Sono, Ritmo Circadiano, Transtornos de Humor.

ABSTRACT

ABSTRACT

The individual circadian phase preferences, also called chronotype, are an attribute of human beings, which is characterized by differences in circadian rhythms. The interest in the study of individual typology differences has increased in the last years. It is also relevant for understanding the temporal organization of the body's regulatory process. The Munich Chronotype Questionnaire (MCTQ) is a new method developed to assess chronotype based on individual midsleep phase. Individual chronobiology characteristics to allocate activities during the day were also related to mood disorders. This work was carried out by the research group of Chronobiology at Clinicas Hospital in collaboration with the University of Munich in Germany. The objective of this study was to evaluate the interindividual variability of chronotypes and its correlation to the levels of depressive symptoms in a sample of rural population in Vale Taquari. As a result, we observed a dependence between the variables of age and gender distribution of both MCTQ and Beck scores. The distribution of Beck showed a nonlinear correlation with MSF (Pearson = 0.094, $p < 0.0001$), demonstrating that depressive symptoms were prevalent mostly among people who have a sleep phase advance, but also the morning types showed a trend of higher scores on the Beck scale (ANOVA: F = 23:14, $p < 0.0001$). The difference in the midpoint of sleep between workdays and free days was dependent on chronotypes. In this study that was called social jet lag and showed a positive correlation with both MSF (Spearman $r^2 = 0.381$, $p < 0.0001$) and BECK (Spearman $r^2 = 0.297$, $p < 0.0001$). The level of social jet lag was correlated to depressive symptoms. Individuals who had a social jet lag from 0 to 2 hours (N = 3,674) reported significantly less symptoms of depression than those which reported to 2 to 4 hours (N = 320), or more than 4 hours (N = 57, ANOVA: F = 79.36, $p < 0.0001$). The correlation between the level of

depressive symptoms and social jet lag did not occur only in the late type, but also between the morning and intermediate types (Spearman $r^2 = 0.233$, $p < 0.0001$, $r^2 = 0.275$, $p = 0.0001$ and $r^2 = 0.311$, $p < 0.0001$, respectively). These results suggest that the relationship between chronotypes with the risk of depressive symptoms can be understood through the exposure of these individuals to environmental differences in the body's internal rhythm frequency. Additionally it can be suggesting that these changes also correspond to a misalignment of circadian rhythms with internal and external rhythm.

Keywords: Chronobiology, Chronotype, Circadian Rhythms, Depression, Midsleep Phase, Mood Disorders, Social Jetlag.

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH	Hormônio Adrenocorticotrófico
ATC	Classificação Anatômica Terapêutica
ATP	Adenosina Trifosfato
AvSD	*Average Sleep Duration* = Média Diária Da Duração Do Sono
BECK	Inventário de Depressão de Beck
BDI	*Beck Depression Inventory*
BDI_{as}	*Beck Depression Inventory age and sex corrected*
CLOCK	*Circadian Locomotor Output Cycle Kaput*
CNS	Conselho Nacional de Saúde
CRY	*Cryptochromes*
CSM	*Composite Scale of Morningness*
DLMO	*Dim-Light Melatonin Onset*
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DTS	*Diurnal Type Scale*
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
FD	*Free Days* = Dias Livres
GH	*Growth Hormone* = Hormonio do Crescimento
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IMC	Índice de Massa Corpórea
Jet Lag	Dessincronização após Vôos Transmeridionais
JLS	Jet Lag Social
Km	Quilômetro
LMU	*Ludwig-Maximilians-University of Munich*
LOCI	*Lark-Owl Chronotype Indicator*
MALDI-TOF	Espectrometria de Massa
MANCOVA	Análise Múltipla de Covariância
MCTQ	Questionário de Cronotipo de Munique

MEQ	*Morningness-Eveningness Questionnaire* = Questionário de Matutinidade e Vespertinidade
rMEQ	*Morningness-Eveningness Questionnaire Reduced*
MSF	*Midsleep Phase on Free Days* = Ponto Médio do Sono nos Dias Livres
MSFsas	*Midsleep Phase on Free Days sleep, age, and sex corrected*
MSFsc	*Midsleep Phase on Free Days sleep corrected* = Ponto Médio do Sono nos Dias Livres Corrigido para o Débito de Sono
MSW	*Midsleep Phase on Workdays* = Ponto Médio do Sono nos Dias de Trabalho
NSQ	Núcleo Supraquiasmáticos
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PER	*Period*
PIB	Produto Interno Bruto
RNA	Ácido Ribonucleico
SCN	Síndrome do Comer Noturno
SDF	*Sleep Duration on Free Days* = Duração do Sono nos Dias Livres
SDW	*Sleep Duration on Workdays* = Duração do Sono nos Dias de Trabalho
SEnd	Sleep End = Horário de Acordar
SNC	Sistema Nervoso Central
SNPs	*Single Nucleotide Polymorphisms*
SOnset	*SleepOnset* = Horário do Início do Sono
SPSS	*Statistical Program for Social Sciencies*
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
UNIVATES	Unidade Integrada Vale do Taquari de Ensino Superior
WD	*Workdays* = Dias de Trabalho
WHOQOL	Questionário de Qualidade de Vida

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Relógio floral de Linneo.

Figura 2. Nathaniel Kleitman e Bruce Richardson, no ano de 1938 durante o período de um mês de estudo em uma caverna natural.

Figura 3. Parâmetros de um ritmo.

Figura 4. Mapa de fases.

Figura 5. Esquema comparativo das fases interna em relação ao período externo para variáveis relacionadas ao ciclo de sono vigília

Figura 6. Visualização gráfica da acrofase de temperatura corporal ao longo do dia em trabalhadores diurnos e noturnos.

Figura 7. Posicionamento dos Núcleos supraquiasmáticos (NSQ) no sistema nervoso humano e conexões entre a retina e a glândula pineal.

Figura 8. O relógio central localizado no SCN.

Figura 9. Gráfico das Cidades Pesquisadas

Figura 10. Distribuição percentual da amostra de acordo com a faixa etária e gênero.

Figura 11. Distribuição percentual da amostra de acordo com a atividade laboral relatada.

Figura 12. Distribuição percentual dos dias trabalhados semanalmente.

Figura 13. Freqüência de doenças autorelatadas na amostra total.

Figura 14. Distribuição da amostra de acordo com o ponto médio do sono nos dias livres da amostra avaliada.

Figura 15. Distribuição das médias do MSFsc de acordo com a faixa etária e gênero da amostra avaliada.

Figura 16. Distribuição das médias de sintomas depressivos de acordo com a faixa etária e gênero da amostra avaliada.

Figura 17. Distribuição das médias de sintomas depressivos (BECK) de acordo com o ponto médio do sono (MSF).

Figura 18. Distribuição das médias de sintomas depressivos de acordo com o jet lag social

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características gerais da amostra

Tabela 2. Grupos farmacológicos e fármacos excluídos da amostra

Tabela 3. Características da amostra antes e após a seleção

Tabela 4. Prevalência de sintomas depressivos

Tabela 5. Equações matemáticas utilizadas para o ajuste das variáveis em estudo

Tabela 6. Comparações múltiplas utilizando a ANOVA de uma via

Tabela 7. Regressão linear múltipla

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

A sobrevivência das espécies depende da adaptação ao meio ambiente aos quais estas estão inseridas. Um dos mais importantes processos de adaptação refere-se à capacidade de antecipação de eventos. Esse fato permitiu que os seres vivos desenvolvessem respostas fisiológicas e comportamentais capazes de predizer as alterações que ocorrem na natureza.

O ciclo claro-escuro que ocorre em torno do período de 24 horas, devido aos movimentos de rotação do nosso planeta, é considerado como o mais facilmente percebido aos nossos olhos. A duração desta alternância é sabidamente dependente das estações do ano e da localização geográfica (latitude e longitude) em que nos encontramos na terra.

Portanto, um sistema temporizador interno, capaz de medir o tempo ou as variações cíclicas, é fundamental para elaborar respostas adaptativas a estes processos naturais que ocorrem no ambiente externo. Este sistema, denominado de sistema circadiano, é responsável pela geração de ritmos endógenos no nosso organismo e age em consonância com as variações ambientais.

Nas últimas décadas, houve um crescente interesse aos aspectos cronobiológicos do comportamento mental, psicológico e social, o que tem resultado numa vasta proliferação de estudos sobre esta matéria. A depressão é, provavelmente, a doença psiquiátrica cujos estudos mais referências fazem aos ritmos biológicos, pelo caráter periódico dos seus sintomas. A observação de flutuações nas características dos transtornos do humor constituiu o motivo para o desenvolvimento de diversos modelos ou teorias baseados nas alterações dos ritmos biológicos.

As manifestações transitórias observadas durante a travessia aérea de vários fusos horários, denominada de jet lag, tem sido observadas em trabalhadores de turnos e podem ser extrapoladas para os episódios depressivos. Dentro desta linha, este estudo irá abordar a hipótese de que a manifestação dos sintomas depressivos corresponderia também a um desalinhamento dos ritmos circadianos internos com os externos.

O presente trabalho foi realizado pelo núcleo de pesquisa de Cronobiologia do Hospital de Clínicas em colaboração com a Universidade de Munique na Alemanha *(Ludwig-Maximilians-University of Munich - LMU).* Será apresentada nesta Tese a primeira etapa do trabalho em que foi avaliada a relação do cronotipo e o risco de sintomas depressivos. O objetivo foi explorar um modelo de análise para explicar esta relação no domínio do relógio circadiano interno e da sua modulação pelos diferentes cronotipos, tendo como perspectiva a regulação, através da diferença entre os períodos de sono nos dias de trabalho e nos dias livres, que possa ser perturbada.

A formatação desta Tese segue o modelo preconizado pelo Programa de Pós Graduação em Medicina: Ciências Médicas. Um referencial teórico será apresentado na primeira parte deste trabalho na forma de revisão da literatura. Os achados pincipais serão apresentados na forma de artigo original (artigo 1), aceito para publicação na Chronobiology International. A revisão sistemática (artigo 2) está sendo submetida para publicação na Biological Rhythms.

Uma grande base de dados, de 6.500 sujeitos, foi gerada nesta fase e está sendo avaliada de acordo com os demais objetivos do projeto apresentado. A metodologia utilizada pode ser localizada no anexo I. O banco de dados gerado encontra-se em processo de análise.

Os resultados descritivos da amostra e o racional utilizado para a modelagem proposta nesse trabalho estão apresentados no anexo II.

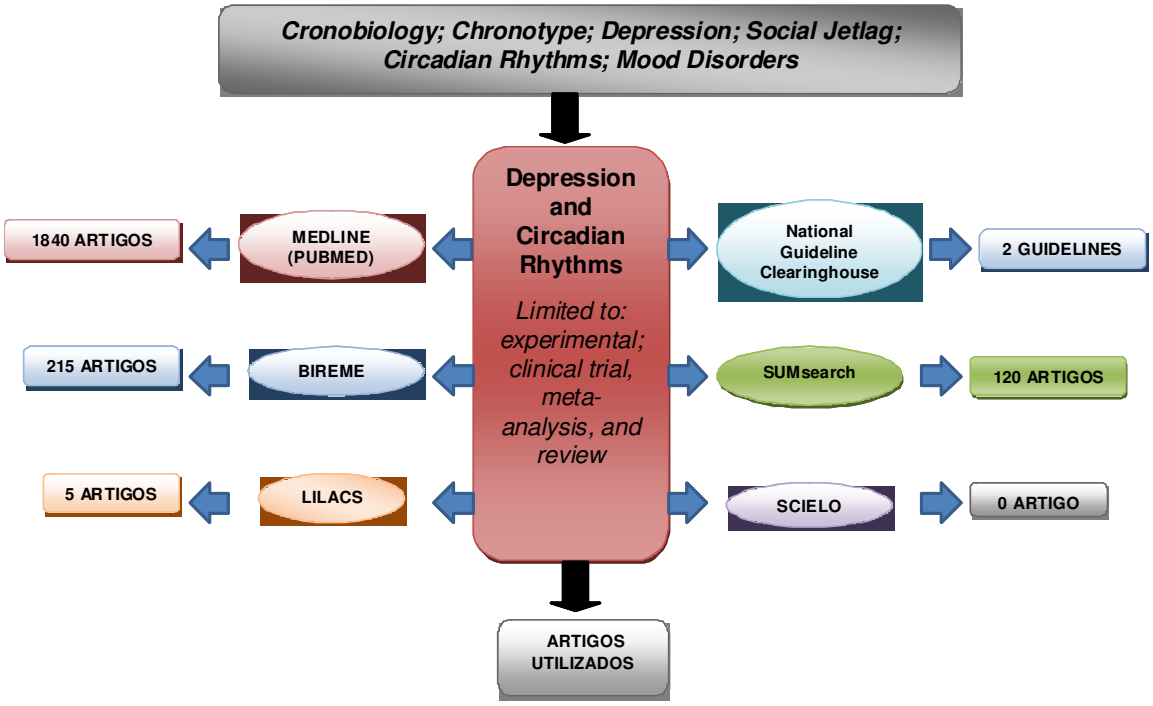
REVISÃO DA LITERATURA

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Estratégias utilizadas para localizar e selecionar as informações

Para apresentar o tema central desse estudo, buscou-se suporte em estudos experimentais, observacionais, ensaios clínicos randomizados e duplo-cegos controlados. Para localizá-los, foi utilizada a estratégia de busca *MEDLINE* (1960-2011), LILACS, SciELO e o *site* da Biblioteca C*ochrane,* com artigos escritos em inglês e português, usando as palavras-chave *cronobiology, chronotype, depression; social jetlag, circadian rhythms and mood disord.* No *MEDLINE* (*site PubMed*), usando a combinação das palavras *depression and, circadian rhythms,* foram localizados 1840 dois artigos. Desses artigos, foram selecionados os que tinham desfecho definido, relacionando citadas no *abstract*, depressão ou doenças afetivas, cujo fator tivesse relação com os ritmos biologicos ou a tipologia circadiana. Foram revisadas as listas de referências de todos os estudos selecionados para detectar possíveis relatos adicionais não localizados na estratégia acima. Outros artigos e capítulos de livro-texto relacionados ao tema desta Tese também foram revisados.

1.1.1 Mapa catalográfico



1.2 As Primeiras Evidências sobre os Ritmos Biológicos

O fato de que os organismos vivos convivem com processos rítmicos não é uma descoberta recente. Diversos relatos antigos descrevem a repetição e a alternância de eventos na natureza. Como exemplos clássicos, temos as referências encontradas desde tempos imemoriais, como por exemplo, Homero, na Ilíada, compara o ciclo de vida do homem às mudanças sazonais dos bosques e Hipócrates, cerca de 300 AC, relaciona o aparecimento de certas patologias com as estações do ano, bem como a existência de dias críticos para o aparecimento e desenvolvimento de determinadas doenças (Aschoff, 1984; Aschoff, 1992). Andróstenes de Thaso em 325 a. C (um historiador do tempo de Alexandre o Grande) realizou, provavelmente, o primeiro relato documentado de um ciclo de atividade/repouso em plantas ao relatar que as folhas de tamarindo se moviam de acordo com a mudança do dia para a noite (Rietveld, 1996).

A cronobiologia é uma área do conhecimento científico que se refere ao estudo sistemático das características temporais da matéria viva, em todos os seus níveis de organização (Halberg, 1969). Esta ciência inclui o estudo de ritmos biológicos como, por exemplo, as oscilações periódicas em variáveis biológicas e as mudanças associadas ao desenvolvimento. Apesar de a cronobiologia ser considerada relativamente nova enquanto disciplina científica, as primeiras descrições dos ritmos biológicos encontrados na natureza constam desde a antiguidade.

Segundo Marques e Menna-Barreto (Marques *et al.*, 2003) existem principalmente duas linhas de estudo dos ritmos biológicos. A primeira inclui relatos de ritmos, predominantemente no homem, em diversas variáveis fisiológicas em condições de saúde e

doença. A maioria dos ritmos observados refere-se a mudanças diárias, mas há também referências a ritmos mensais e anuais no peso corporal e no volume urinário (Marques *et al.*, 2003). A segunda linha de estudos envolve a manipulação do ambiente, observando-se os ritmos em condições do ambiente constantes. Um dos primeiros trabalhos que se insere nesta linha e que alcançou bastante notoriedade foi realizado pelo francês Jean Jacques d'Ortous de Mairan em 1729. Este astrônomo descreveu os movimentos periódicos das folhas em plantas mantidas em um lugar isolado de ciclos ambientais de claro e escuro (Moore-Ede, 1986), tendo constatado que esta continuava a orientar periodicamente as suas folhas para o Sol mesmo na ausência de luminosidade. Este foi o primeiro estudo experimental nesta área em que foi eliminado a ritmicidade ambiental verificando-se a persistência dos ritmos fisiológicos e comportamentais da planta nessa situação. Darwin no seu livro "O Poder do Movimento nas Plantas" relatou descrições semelhantes às de Mairan, tendo escrito em 1880 que o movimento diário das folhas era uma propriedade interessante das plantas. O próprio Lineu criou um relógio baseado nas horas em que determinadas espécies de flores abriam ou fechavam (Figura 1). A partir do século XIX foram realizados estudos de ritmos em animais, como o estudo do ritmo de pigmentação em artrópodes. Na primeira metade do século passado esta linha de investigação havia se ampliado para uma grande variedade de organismos: abelhas e outros insetos, crustáceos, coelhos e roedores (Bunning, 1969; Bunning *et al.*, 1969). Nessa linha de estudos, já se pode observar uma preocupação com a análise do papel de ciclos ambientais nos diferentes ritmos estudados (Bunning *et al.*, 1969) o que levava à constatação de que a ritmicidade era uma propriedade geral da matéria viva.



Figura 1. Relógio floral de Linneo. Proposta em 1751 para descrever o tempo característico de abertura e fechamento das pétalas em diferentes espécies de flores (Noguera *et al.*, 2007).

1.3 Os Primeiros Ritmos Estudados

A demonstração do caráter endógeno dos ritmos biológicos teve início no século XVIII com o cientista francês de Mairan, que foi o primeiro a propor a possível existência de um fator interno do organismo controlando a ritmicidade. Observando o movimento regular de abertura e fechamento das folhas da planta sensitiva Mimosa pudica, ele constatou que quando

a planta era mantida em condições de escuro constante, o movimento de abertura e fechamento das folhas era mantido. Este caráter endógeno dos ritmos permite que os organismos antecipem e preparem-se para mudanças ambientais. Quando animais ou vegetais são mantidos em um ambiente constantemente iluminado ou escuro, observa-se a persistência dos ritmos biológicos, embora estes possam apresentar um período diferente daquele quando o organismo está exposto aos ciclos ambientais.

Os estudos dos ritmos em humanos somente iniciaram muito tempo depois, em 1938, quando Nathanial Kleitman e seu aluno, Bruce Richardson, decidiram realizar um auto-experimento estudando os ritmos e a fisiologia do sono em uma caverna natural em Kentucky, USA. Eles permaneceram 33 dias sem sinais externos de luminosidade e com ciclos de sono de 9 horas diárias e rotinas regulares de alimentação, leitura, escrita e caminhada. A temperatura corporal foi monitorada durante todo o período em que os pesquisadores estiveram privados dos sinais externos, sendo observada a persistência de ritmicidade dos ritmos avaliados. Esse foi um dos primeiros estudos em humanos que indicou a existência de um mecanismo de controle interno com capacidade de auto-sustentação mesmo na ausência da alternância do ciclo claro e escuro.

Em 1962, Michel Siffre passou dois meses em total isolamento em uma caverna e realizou a avaliação de seus ritmos. Durante esse período Siffre viveu em total escuridão. Segundo o protocolo seguido neste estudo, ele ligava para sua equipe informando os horários em que dormia ou se alimentava ou acordava (Foer *et al.*, 2008).

Os estudos experimentais e controlados foram realizados em humanos por Aschoff e Wever (Aschoff, 1979; Aschoff, 1992; Aschoff *et al.*, 1967; Wever, 1979). Nestes estudos

foram coletados dados de voluntários que passaram alguns meses em uma caverna artificial, sem informações externas ou pistas temporais ambientais. Como evidência, os ritmos biológicos anteriormente sincronizados pelo ciclo claro e escuro, como o ciclo sono e vigília, passaram a apresentar períodos diferentes de 24 horas. Os ritmos nesta situação foram considerados como estando em situação de livre-curso, revelando o período endógeno dos ritmos que foi denominado de tau (τ). Os estudos revelaram que os indivíduos diferem em relação a este período endógeno, podendo apresentar períodos menor, próximo ou maior das 24 horas, variando entre 23h30min a 26h00min. Participantes que durante a situação de livre-curso apresentaram períodos maiores do que 24 horas, quando expostos ao período externo, apresentaram um atraso de fase em relação ao período de alternância de claro e escuro. Por outro lado, os indivíduos com um ritmo endógeno menor do que 24 horas apresentaram um avanço de fase em suas variáveis endógenas em relação ao tempo externo. O período endógeno em livre-curso também variou de acordo com a natureza das condições ao qual eles foram submetidos, como períodos de claro ou escuro constante (Aschoff, 1979). Durante o mesmo período, Colin Pittendrigh realizou estudos com moscas das frutas e descobriu outras propriedades do relógio circadiano, a compensação de temperatura em diferentes condições ambientais (Pittendrigh, 1960).



Figura 2. Nathaniel Kleitman e Bruce Richardson, no ano de 1938 durante o período de um mês de estudo em uma caverna natural, no Parque Nacional Mammoth de Kentucky (EUA). Fonte: http://image.guim.co.uk/Guardian/society/gallery/2007/dec/03/exhibition.art/Kleitman_d-6690.jpg

1.4 A Evolução da Cronobiologia como Ciência

Julien Joseph Virey (1775-1846) é considerado por muitos como o pai da cronobiologia (Reinberg *et al.*, 2001). A tese de doutorado de Virey, concluída em Paris em 1814, é considerada como um dos primeiros trabalhos dedicados aos ritmos biológicos. Este defende que os ritmos biológicos são endógenos, controlados por relógios biológicos que são sincronizados através de mudanças do ambiente como a alternância do ciclo claro e escuro. Ele também relatou que os efeitos das drogas variam de acordo com seu tempo de administração e foi o primeiro a defender a importância do tempo nas intervenções terapêuticas (Reinberg *et al.*, 2001).

A variação circadiana da pressão arterial é um parâmetro hemodinâmico que é conhecido desde 1881 quando Zadek registrou a existência de uma variabilidade diária na pressão arterial, aumentando durante a tarde e diminuindo à noite com variações entre 8-15 mm-Hg (Middeke *et al.*, 1991). Em 1897, Howell observou a diminuição noturna na pressão sanguínea, seguido de Leondard Hill que em 1898 registrou a variabilidade diurna e o decréscimo com o sono, da pressão arterial (Redfern *et al.*, 1991).

Todo este desenvolvimento de uma nova área do conhecimento viria a ser sistematizado em Ronneby, na Suécia, em 1937, quando da realização da primeira reunião científica sobre ritmos biológicos onde foi decidida a fundação da Sociedade para a Investigação dos Ritmos Biológicos, mais tarde (em 1971) designada Sociedade Internacional de Cronobiologia (Marques *et al.*, 2003).

A primeira monografia publicada na área da Cronobiologia, afirmando que os organismos têm capacidade de medir o tempo e demonstrando que as plantas possuem reatividade variável em relação à luz, dependendo do momento de exposição foi realizada por Bunning, em 1958 (Bunning, 1969).

Neste período, já se havia acumulado um grande número de investigações sobre a ocorrência de ritmos biológicos, tanto sobre variáveis comportamentais, quanto fisiológicas. Os primeiros instrumentos de medida e de monitoração de variáveis biológicas começaram a serem desenvolvidos e a observação de eventos similares por pesquisadores de diferentes áreas levava à necessidade de elaboração de princípios gerais que pudessem unificar os diferentes achados. Além disso, tornava-se também desejável a divulgação destes achados entre os pesquisadores da área. Nesse contexto, em 1960 iniciaram os primeiros encontros na história

da Cronobiologia com a realização do Cold Spring Harbor Symposium on Biological Clocks, organizado por Colin Pittendrigh e colaboradores, realizado de 5 a 14 de junho de 1960 nos EUA (Marques *et al.*, 2003). Este simpósio constituiu-se como um fator decisivo para o reconhecimento da Cronobiologia por parte da comunidade científica internacional ao adotar metodologias rigorosas, tanto ao nível do desenho experimental como da demonstração matemática e estatística da ritmicidade biológica (Cipolla-Neto *et al.*, 1988). Atualmente ainda realizado e considerado como um dos famosos e tradicionais eventos nesta área (Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology; http://symposium.cshlp.org/).

Desde então, têm surgido sub-especialidades desta área da ciência, como por exemplo, a cronofarmacologia (estudo das variações rítmicas da eficácia, da cinética e da toxicidade dos fármacos) e a cronopsicologia (estudo das variações rítmicas de funções cognitivas e comportamentais) (Marques *et al.*, 2003).

2 CRONOBIOLOGIA: PRINCIPAIS CONCEITOS

À semelhança de outras áreas da ciência, a cronobiologia desenvolveu um conjunto de conceitos e termos de modo a compreender, do ponto de vista temporal, os organismos e as suas interações com o meio ambiente. Para o estudo da cronobiologia, é relevante definir o que se entende por ritmos, os principais parâmetros necessários à sua caracterização e a relação que estes estabelecem entre si (ordem temporal interna), assim como conhecer as estruturas que os geram (relógios biológicos) e a relação que estas estabelecem com o meio (sincronização).

2.1 Ritmos e seus Parâmetros

De acordo com Minors e Waterhouse (Minors *et al.*, 1981), ritmo tem sido definido como uma "sequência de eventos que se repetem na mesma ordem e nos mesmos intervalos". Embora, o ritmo possa mudar as suas características sob certas condições ou mesmo na ausência de pistas externas, como por exemplo, quando os ritmos se encontram em livre-curso. Para se proceder à caracterização de um ritmo torna-se necessário definir vários dos seus parâmetros, como o período (T), a frequência (f), a amplitude (A), o nível médio (ou mesor) (M), a fase (φ), a acrofase (φ), o zênite (z) ou o nadir (n) (Figura 3). O ritmo também pode ser denominado como ciclo, periodicidade ou oscilação.

2.1.1 Período

O período (T) refere-se ao tempo necessário para que um dado ritmo finalize um ciclo completo, podendo oscilar desde milisegundos até anos. (Marques *et al.*, 2003).

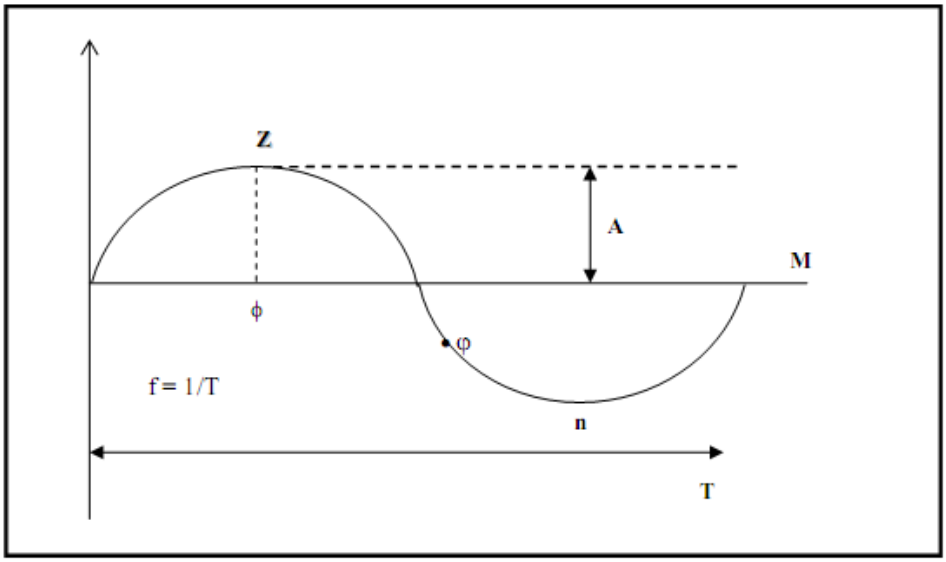


Figura 3. Parâmetros de um ritmo. T = tempo para completar um ciclo ou período; f = frequência; n = nadir ou batifase; z = zênite ou acrofase (φ); M = mesor; A = amplitude; φ = fase.

2.1.2 Frequência

A frequência (f) corresponde ao inverso do período (f=1/T) (Minors & Waterhouse, 1981) e se expressa em número de ciclos por unidade de tempo. Uma vez que a unidade de tempo em cronobiologia é o "dia" de 24 horas, a unidade de medida para a freqüência corresponde ao número de ciclos por dia.

2.1.3 Nadir ou Batifase

O nadir (n) corresponde ao momento em que ocorre o valor mínimo da função, podendo também ser denominada por batifase.

2.1.4 Acrofase ou Zênite

A acrofase, também designada como zênite (z) corresponde ao momento em que ocorre o valor mais elevado da função, sendo designada pela letra grega φ. Suponhamos que o ponto máximo, zênite, do ritmo da temperatura de um dado indivíduo ocorre às 19 horas; neste caso, diz-se que a acrofase desse ritmo é de 19 horas (φ=19h).

2.1.5 Mesor

Outro parâmetro utilizado para a estimativa do nível médio do ritmo é o mesor. Quando se usam métodos de análise trigonométrica e estatística dos ritmos biológicos (ex., método Cosinor), o nível médio designa-se mesor, nome derivado do original em inglês *Midline Estimated Statistic of Rhythm*.

2.1.6 Amplitude

A amplitude (A) corresponde à diferença entre o nível médio da função e o seu ponto máximo (ou ponto mínimo).

2.1.7 Fase

A fase traduz a relação que existe entre um dado valor da função e um dado tempo t do ciclo a que se refere, sendo designada, habitualmente, pela letra grega φ.

2.2 Classificações dos Ritmos

Os parâmetros referentes ao período e à frequência permitem classificar os ritmos em ultradianos, infradianos e circadianos (Noguera *et al.*, 2007). Os ritmos circadianos referem-se a ritmos cujo período é de cerca de um dia (do latim, circa dies), compreendido entre as 20 e as 28 horas. Os ritmos ultradianos apresentam uma frequência inferior a 1 ciclo por dia (ex., ritmo cardíaco) e em ritmos infradianos quando estes apresentam uma frequência superior a 1 ciclo por dia como por exemplo a produção de plaquetas no sangue, o ciclo menstrual ou o ciclo de reprodução (Marques *et al.*, 2003).

2.3 Relação de Fases

A fase do relógio pode ser definida por qualquer ponto instantâneo da curva de oscilação em relação à fase de um *zeitgeber*, podendo esta ser representada, por exemplo, pelo seu valor máximo ou mínimo os quais são generalizados como marcadores para a fase interna de um ciclo como pontos de referência.

Quando a fase de um ritmo muda relativamente aos seus pontos habituais de referência no eixo do tempo, diz-se haver uma alteração ou mudança de fase; dependendo da direção do seu deslocamento no eixo, a alteração de fase é descrita como um adiantamento ou avanço de fase, quando a alteração na fase acontece antes do horário habitualmente observado. Quando o evento é observado depois do horário habitual ele é denominado de atraso de fase. (Minors *et al.*, 1981).

O termo fase é também usado para descrever a relação temporal entre dois ritmos; por exemplo, quando se refere que "o ritmo da temperatura central está em fase com o ritmo da atividade", significa que aspectos similares dos dois ritmos (por exemplo, as suas acrofases) ocorrem simultaneamente, ou seja, diz-se que os dois ritmos estão em fase. No entanto, se tiverem as acrofases separadas entre si por meio ciclo, diz-se que estão em inversão de fase (Marques *et al.*, 2003). Se num dado ritmo a acrofase ocorrer mais cedo do que em outro, diz-se que esse ritmo está em avanço de fase enquanto que se ocorrer mais tarde diz-se que está em atraso de fase. O conceito de fase diz respeito tanto à forma da curva no seu todo como em segmentos, podendo ser aplicado na descrição da expressão de um processo rítmico (Marques *et al.*, 2003).

Em condições normais, as diversas funções rítmicas no organismo mantêm uma estabilidade das relações de fase entre si, apresentando uma sincronização temporal caracterizando uma ordem temporal interna (Marques *et al.*, 2003).

O mapa de fases (figura 4) é a representação gráfica da caracterização entre as diferenças de fases entre os ritmos estudados no período de 24 horas (Marques *et al.*, 2003; Noguera *et al.*, 2007). Nos animais, incluindo os seres humanos, cujos ritmos estão alinhados

por pistas temporais ambientais com um período de 24 horas, a escala temporal externa adotada na elaboração do mapa de fases é o ciclo ambiental claro e escuro. A figura 4 mostra a acrofase de algumas variáveis biológicas em relação ao período de 24 horas.

A relação de fase entre a fase interna e externa também é chamada a fase de arrastamento por alguns autores (Roenneberg, Daan, et al., 2003). O ângulo de fase entre o tempo interno e a fase externa depende do período interindividual em livre-curso (Aschoff, 1979; Roenneberg & Merrow, 2000) e, consequentemente, isso influencia o tempo de arrastamento a um *zeitgeber*.

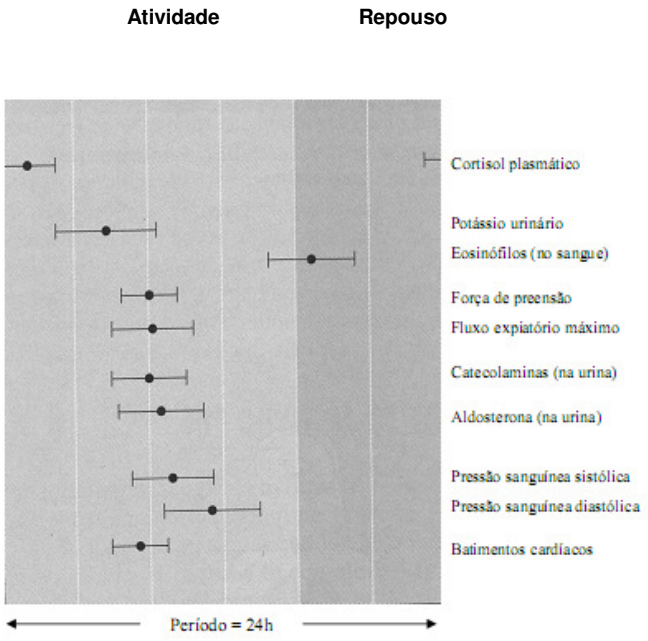


Figura 4. Mapa de fases representando os ritmos circadianos de algumas variaveis fisiológicas (Noguera et al., 2007).

O Mapa de fases, representando na figura 4, pode ser utilizado para na comparação de variáveis fisiológicas que exibem ritmos circadianos. Os pontos representam as acrofases das respectivas funções rítmicas enquanto que as barras horizontais representam a variabilidade das medidas (intervalo de confiança de 95%) (Noguera *et al.*, 2007).

A representação gráfica de características do sistema circadiano do sono é mostrada na figura 5. Primeiro, sobre a influencia das condições externas, o período de sono permanece em fase estável (sincronizado) em relação ao ciclo de claro e escuro (Ψ), apresentando uma relação entre o período de atividade e repouso (α:ρ). Na ausência de pistas externas (ciclo claro e escuro), o período de sono apresenta um atraso de fase progressivo ao longo dos dias de acordo com a ritmicidade interna do relógio circadiano (τ), estando em livre-curso. O prior de livre-curso somente pode ser mensurado em humanos utilizando protocolos específicos e rígidos, mesmo assim sofrendo influência do fotoperíodo ao que foi exposto. A duração do fotoperíodo durante as estações do ano pode modificar o valor do τ, apresentando um valor maior durante o período de inverno. Este fato mostra que o valor do tau também reflete as diferenças externas em relação à exposição ao período de claro e escuro, mais acentuado em algumas latitudes. Técnicas mais atuais são capazes de medir a expressão dos genes do relógio biológico em culturas de tecidos como a pele, embora ainda não esteja estabelecida a relação destes com o relógio central (Brown *et al.*, 2005).

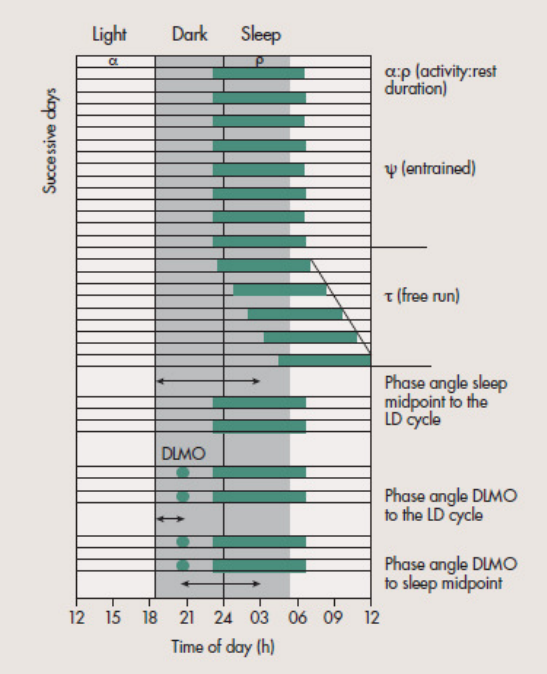


Figura 5. Esquema comparativo das fases interna em relação ao período externo para variáveis relacionadas ao ciclo de sono vigília. O período de sono (linha verde) está representado em relação ao tempo externo (ciclo claro e escuro) e a fase circadiana interna está representada em relação ao período de inicio da produção de melatonina (DLMO – círculo verde) (Wirz-Justice, 2007).

2.4 Representação Gráfica da Acrofase

Dada a diversidade que as várias funções rítmicas podem ter, é necessário reduzir essa complexidade a um descritor comum que represente a análise da organização do sistema circadiano. Entre os parâmetros rítmicos, a acrofase, que corresponde ao momento em que ocorre o valor máximo de um dado ritmo, é um dos parâmetros mais utilizados para caracterizar o modo como os diversos ritmos se relacionam entre si (Marques *et al.*, 2003; Noguera *et al.*, 2007).

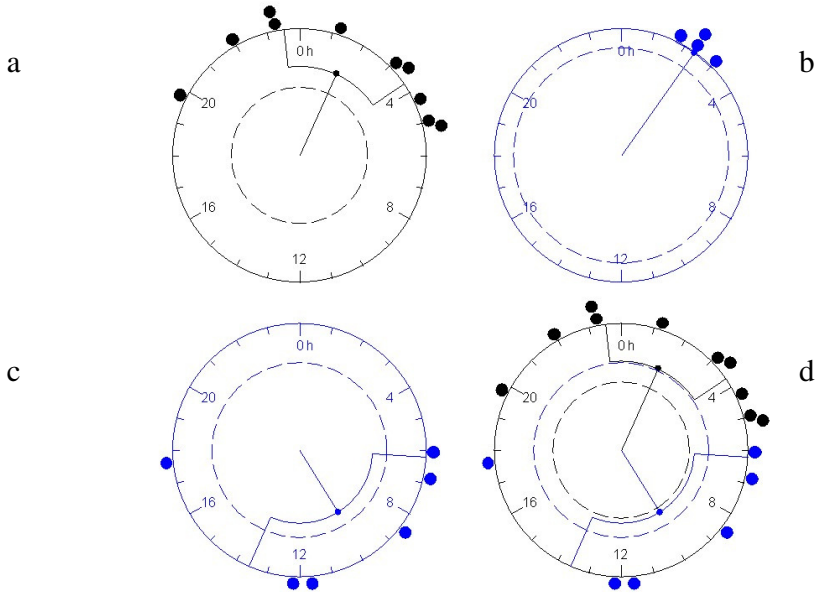


Figura 6. Visualização gráfica da acrofase de temperatura corporal ao longo do dia em trabalhadores diurnos e noturnos. O deslocamento dos pontos, representados na figura, indica a variabilidade da temperatura de acordo com o grupo ao qual ele pertence. A acrofase da temperatura periférica é maior durante a noite no grupo de trabalho diurno e nos trabalhadores noturnos com baixo nível de atividade (figura a e b). O grupo de trabalhadores noturnos com maior nível de atividade apresenta um deslocamento na acrofase de temperatura em relação ao demais. O Gráfico d representa a distribuição desta variável para todos os grupos de trabalhadores (Moraes *et al.*, 2011).

3 O RELÓGIO CIRCADIANO DE MAMÍFEROS

3.1 Relógio Biológico

O termo relógio biológico (ou circadiano) é usado em cronobiologia para designar marca-passo, referindo-se e a toda a estrutura (física ou biológica) cujo funcionamento varia no tempo de forma cíclica como um oscilador e que através da via nervosa ou humoral é capaz de transmitir esta oscilação para regiões próximas ou distantes, capaz de impor o seu ritmo a outras estruturas. A maioria dos ritmos biológicos observados podem não ser originados diretamente pelo relógio biológico, mas por uma cadeia sucessiva de eventos como numa cascata de eventos, tendo apenas o primeiro ritmo sido originado diretamente pela atividade do relógio biológico. O relógio biológico controla diversos níveis fisiológicos desde expressão gênica a comportamentos complexos. Em condições constantes, o relógio biológico funciona livremente, com um período endógeno em torno de 24 horas (Roenneberg *et al.*, 2007a).

3.2 Localização do Relógio Central de Mamíferos

Para que haja ritmicidade circadiana endógena em um ser vivo é necessária a presença de marca-passos. Estes são definidos como osciladores primários, endógenos que exibem um padrão oscilatório geneticamente determinado, auto-sustentado. No hipotálamo, dois pequenos aglomerados de neurônios (15 - 20.000 neurônios) constituem os marca-passos geradores da ritmicidade circadiana em mamíferos representados pelos relógios biológicos circadianos que

são os núcleos supraquiasmáticos (NSQ) (Reppert *et al.*, 2001) (Figura 7). As células do organismo têm padrões de oscilação endógena que marcam ritmos de aproximadamente 24 horas.

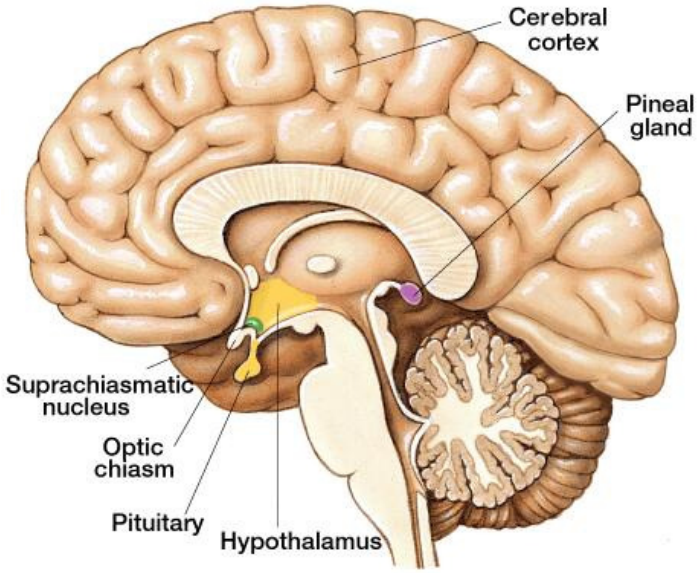


Figura 7. Posicionamento dos Núcleos supraquiasmáticos (NSQ) no sistema nervoso humano e conexões entre a retina e a glândula pineal. Fonte: http://healthysleep.med.harvard.edu/image/200.

3.3 O NSQ como o Marca-passo Circadiano Central

O mecanismo interno que organiza os processos biológicos circadianos está localizado no hipotálamo, mais precisamente no núcleo supraquiasmático (NSQ), considerado como o relógio circadiano central dos mamíferos (Berson *et al.*, 2002).

Ruppert e Weaver (Reppert *et al.*, 2001), descrevem o sistema circadiano nos mamíferos como estando organizado segundo uma hierarquia de múltiplos osciladores

circadianos dispersos pelo organismo, encontrando-se o "centro de comando" do sistema de temporização contido nos neurônios do NSQ, sendo possível que a larga maioria destes funcione como "células relógio" ou osciladores circadianos. O NSQ recebe informação fótica diretamente através do trato retino-hipotalâmico, sincronizando-o para as 24 horas; este, por sua vez, coordena a ação dos osciladores presentes em outras áreas cerebrais e nos órgãos periféricos, como pulmão, rim, fígado etc., denominados como osciladores periféricos. Estes osciladores sincronizados, por sua vez, regulam os ritmos locais na fisiologia constituindo-se, assim, como entidades multi-oscilatórias. Esta ação parece estar dependente da alimentação recebida pelo relógio central, uma vez que estes apenas conseguem suster oscilações de 24 horas por poucos dias em estudos experimentais (Reppert *et al.*, 2001). No caso do ser humano, os ritmos circadianos podem ser sincronizados por estímulos fóticos e não fóticos (Marques *et al.*, 2003).

No caso dos estímulos fóticos, o trato retino-hipotalâmico assegura uma projeção direta da retina para o NSQ, através do trato retino-hipotalâmico, constituindo este a base biológica da sincronização do NSQ pela luz. O principal neurotransmissor desta via é o glutamato, mas também é importante a participação do n-acetil aspartil glutamato e da substancia P (Noguera *et al.*, 2007). O NSQ efetua a sincronização dos ritmos pelo foto período através do envio de impulsos rítmicos para estruturas vizinhas, entre as quais, o núcleo paraventricular do hipotálamo, medula espinhal e gânglio cervical superior de onde partem fibras noradrenérgicas em direção a pineal, glândula endócrina localizada no teto do terceiro ventrículo. A noradrenalina, serotonina e acetilcolina são os principais neurotransmissores que participam destas vias de transmissão até a chegada dos sinais a pineal.

Nos mamíferos, a pineal é considerada um órgão endócrino com propriedades de transdutor neuroendócrino dado que a informação fótica, transmitido através da via simpática, chega à glândula e regula a secreção da melatonina (Golombek *et al.*, 1996), principal hormônio produzido pela glândula pineal, que desempenha um papel central no processo de sincronização dos ritmos circadianos (Moore, 1997; Moore, 1980). A síntese e a secreção deste hormônio ocorrem durante o período noturno, sendo suprimida pela luz. A produção de melatonina depende da estimulação noradrenérgica e funciona como um sinal para a duração do foto período (Lavie, 2001). A pineal constitui o principal meio de comunicação entre o meio externo (ciclo claro e escuro) e os sistemas internos (nervoso central e endócrino). É ainda considerada como uma estrutura responsável pelo efeito sincronizador interno do sistema circadiano.

Quanto à informação não fótica, esta parece chegar ao NSQ através da sua conexão com o folheto intergeniculado (Moore, 1997), os principais neurotransmissores desta via são o GABA e o Neuropeptideo Y (Noguera *et al.*, 2007).

3.4 Agentes Sincronizadores

Os eventos externos que são capazes de promover o ajustamento das variáveis circadianas foram designados por Aschoff como *zeitgeber* (palavra alemã que significa "doador do tempo"), por Halberg e colaboradores como sincronizadores ou por Pittendrigh como agentes arrastadores (Reinberg *et al.*, 2001). As primeiras experiências sistemáticas sobre arrastamento foram conduzidas por Pittendrigh, na década de 1960. Ao expor os

organismos em escuridão constante com exposição de pulsos curtos de luz em diferentes momentos ao longo do dia. Pittendrigh observou a alteração de fase promovida pela exposição à luz durante o dia de 24 horas foi dependente do momento de aplicação do estimulo. Posteriormente outras experiências têm encontrado os mesmos efeitos em humanos (Beersma *et al.*, 1993).

Sincronizador, *zeitgeber* ou agente de arrastamento referem-se a todo o agente cujas variações periódicas são capazes de modificar o período e/ou a fase de um ritmo biológico. Ou seja, o período observado em ambiente de livre-curso é ajustado para um período de 24 horas, pelo processo de arrastamento ou de sincronização, passando a ostentar um período de 24 horas (Marques *et al.*, 2003). O período da oscilação endógena pode ser sincronizado pelos ciclos ambientais externos se o período destes estiver dentro de um intervalo limite entre 20 e 28 horas; caso o período dos agentes arrastadores se encontre fora dos limites de sensibilidade, o período endógeno não será acoplado à periodicidade dos ciclos externos e entrará em livre-curso. Além do ajuste do período e fase de um dado ritmo biológico pelos ciclos ambientais, este processo é responsável pela harmonização das fases dos ritmos fisiológicos e comportamentais com as fases dos ciclos ambientais de tal modo que os ritmos biológicos se encontrem associados às fases dos ciclos ambientais permitindo a manutenção da sobrevivência da espécie (Marques *et al.*, 2003). A importância de um ciclo como sincronizador depende de uma dada espécie, sendo que os ritmos de uma mesma espécie podem ser alinhados por *zeitgebers* diferentes, organizados segundo uma hierarquia (Marques *et al.*, 2003).

O NSQ é sincronizado aos ritmos exteriores pela luz e por fatores sociais e comportamentais. No caso do ser humano, os *zeitgebers* de natureza sócio-ecológica, associados aos horários da vida em comunidade assumem especial relevância (Aschoff *et al.*, 1971). Variações diárias de intensidade do ruído ambiental, horários das refeições, rotinas domésticas e profissionais, interações sociais são exemplos de *zeitgebers* que sincronizam os ritmos humanos (Marques *et al.*, 2003).

De acordo com Marques e Menna-Barreto (Marques *et al.*, 2003), os seres humanos e animais podem ser sincronizados pelos ciclos geofísicos, como ciclo claro e escuro, pelas oscilações ambientais, como variações da temperatura, e também pelos ciclos sociais e comportamentais. Por outro lado, é enfatizado que estes atuam de modo interativo: por exemplo, quando um indivíduo deixa de sair de casa e passa o dia na cama altera diretamente um *zeitgeber* comportamental (o ciclo de atividade-repouso), privando-se igualmente da exposição ao ciclo natural claro-escuro (*zeitgeber* geofísico) bem como de contactos/atividades de natureza social (*zeitgeber* social). Quando o sistema está sincronizado, os ritmos circadianos do organismo assumem uma relação estável com os *zeitgebers*, permitindo esse alinhamento a manutenção de uma relação estável dos ritmos circadianos entre si (Moore-Ede, 1986), em que o sistema temporal circadiano conduz o organismo a uma alternância cíclica ao longo do dia, como pode ser evidenciado pelo ciclo sono-vigília marcado por um período de alerta com uma ativação fisiológica durante o dia e sonolência na parte da noite. O ritmo também pode ser modificado pelo processo de arrastamento, resultando dos efeitos mascaramento (Noguera *et al.*, 2007) quando o ritmo endógeno passa a se manifestar na presença de um ritmo externo, como no exemplo da antecipação dos horários de alimentação. Embora os efeitos de mascaramento estejam frequentemente associados a

artefatos experimentais no estudo de componente endógeno dos ritmos circadianos, Marques e colaboradores (Marques *et al.*, 2003) salientam a importância deste fenômeno do ponto de vista da adaptação temporal pela flexibilidade que dá ao organismo de responder diretamente a um estímulo ambiental. Segundo estes, o arrastamento representa um mecanismo para a sincronização geral de um indivíduo ao seu meio ambiente, enquanto que o efeito de mascaramento pode ser importante do ponto de vista da adaptação do organismo no meio em que vive. Quando os ritmos biológicos deixam de estar em fase com os ciclos externos, diz-se que ocorreu dessincronização externa, como observado durante a realização de trabalho noturno ou a travessia rápida de fusos horários exemplos de situações onde ocorrem alterações bruscas nos *zeitgebers*. Caso a situação de dessincronização externa persista, pode ocorrer, em alguns indivíduos, dessincronização ou dissociação interna das relações de fase entre os ritmos biológicos, fenômeno que ocorre com freqüência durante diferentes jornadas de trabalho.

3.5 Osciladores Biológicos

Diferentes espécies são acopladas com as suas próprias fases características ao ciclo ambiental das 24 horas e, em função desse acoplamento são divididas em noturnas, diurnas ou crepusculares (Moore-Ede, 1986). Os homens que são ativos durante o dia e repousam durante a noite, apresentam um padrão diurno, e grande parte das variáveis fisiológicas apresenta os seus valores mais elevados durante o dia e os valores mais baixos durante a noite. A melatonina, principal hormônio da glândula pineal, apresenta um ritmo circadiano oposto, com níveis elevados durante a noite e baixos durante o dia. O ponto máximo de secreção deste hormônio ocorre entre as 2 e às 6 da manhã (Golombek *et al.*, 1996). O cortisol plasmático

atinge a sua acrofase por volta das 7-8h da manhã e a temperatura corporal atinge o valor máximo por volta das 17 a 19 horas (Bailey *et al.*, 1991).

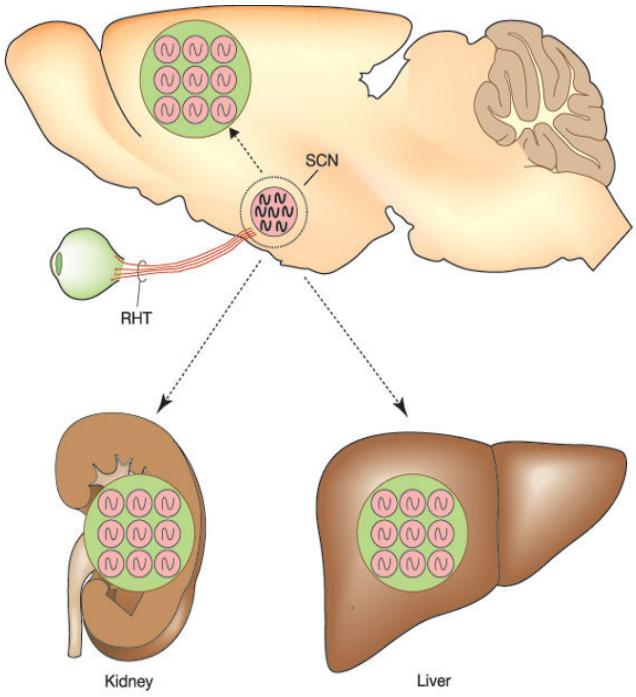


Figura 8. O relógio central localizado no SCN é composto por numerosas células relógio. O SCN recebe informações de luz através do trato retino-hipotalâmico (RHT) para sincronizar o relógio biológico no ciclo de 24 horas. O SCN, por sua vez, coordena a sincronização de osciladores em outras áreas do cérebro (como o córtex) e em órgãos periféricos (como por exemplo, rim e fígado).

Os ritmos de 24h da fisiologia e do comportamento são influenciados por vários fatores ambientais como os horários de alimentação, fatores genéticos e interações sociais como as condições de luz (Ohdo, 2007). Nos seres vivos, há necessidade de sensores que percebam a

variação temporal. Além disto, a presença de sistemas humorais e neurais é necessária para que informem a todo o organismo o estado de iluminação ambiental para que possam acompanhar estas variações. O organismo vivo multicelular atua de forma integrada e sincronizada. A comunicação entre diferentes órgãos e sistemas pode ser feita através da rede neural ou pelo sistema endócrino. A informação é transmitida em tempo real e os órgãos-alvo reagirão segundo o estado em que se encontram no momento em que recebem o estímulo. Este processo é mediado pelos relógios circadianos que são definidos como um conjunto de proteínas de auto-transcrição com feedback positivo e negativo no período de 24 horas. Os componentes do relógio circadiano têm sido encontrados em todos os tecidos mamíferos investigados, incluindo o tecido adiposo (Markus *et al.*, 2003).

3.6 Controle Transcricional dos Osciladores Periféricos

A habilidade de predizer as mudanças às oscilações temporais e outros ritmos circadianos são baseadas em células autônomas-transcricionais capazes de fazer feedback nos relógios de células como proteínas e suas bases. A identificação da ritmicidade circadiana baseada em genes do relógio (*clock genes*), realizada nas espécies *Drosophila melanogaster* e *Neurospora crassa,* foram fundamentais para a busca de homólogos em estudos com outras espécies animais. Três genes do relógio são encontrados nos mamíferos: 1) denominados gene CLOCK (*Circadian Locomotor Output Cycle Kaput*), e o BMAL1 (também conhecido como Mop3), envolvidos com o sistema de temporização em mamíferos; 2) PER1 (*Period*), PER2 e PER3, e são expressos ritmicamente no SNC. Per1 e Per2 induzem a resposta pulsos de luz nos NSQ, enquanto o Per3 tem um padrão oscilatório de expressão independente da luz

(Ohdo, 2007; Pereira *et al.*, 2009). 3) Os genes CRY1 e CRY2 (*Cryptochromes*) são membros da família de receptores de luz azul em plantas. Estes genes foram primeiramente classificados como possíveis candidatos para fotorreceptores circadianos; no entanto, análises posteriores demonstraram que estes genes têm um papel independente da luz no sistema circadiano de mamíferos (Pereira *et al.*, 2009).

São encontrados outros fatores de transcrição de genes como BMAL1, CLOCK, CRY1 e CRY 2. Todas estas proteínas, incluindo Per 1, Per 2 e Per 3 estabelecem as oscilações dos períodos de ~ 24h. Os heterodímeros do CLOCK: BMAL1 estão vinculadas as sequências de DNA e estimulam a transcrição de produção de genes que regulam o comportamento, o metabolismo e a manutenção do estado fisiológico. Além disto, o CLOCK: BMAL1 ativa a transcrição dos genes PER e CRY. O complexo PER: CRY é formado no citoplasma e transloca-se para o núcleo onde regula a atividade transcricional de CLOCK: BMAL1. Um segundo loop feedback também tem sido identificado, envolvendo a transcrição Rev-erbα e repressão da transcrição do BMAL1. A expressão e supressão da transcrição e a formação destes genes e seus heterodímeros de forma sequenciada resulta na ritmicidade de 24h (Mignot *et al.*, 2007). Além disto, BMAL1 é um fator de transcrição que controla o ritmo circadiano e contribui para o controle da adipogenese e da atividade do metabolismo lipídico e da maturidade dos adipócitos. O nível de mRNA Bmal1 aumenta durante a adipogênese. BMAL1 está relacionado em induzir e promover a ativação de muitos fatores envolvendo a lipogênese nos adipócitos 3T3-L1. A maximização da expressão do BMAL1 nos adipócitos aumenta a atividade da síntese dos lipídios, estando envolvidos na regulação, diferenciação e maturidade dos adipócitos (Ohdo, 2007).

Os heterodímeros CLOCK-BMAL1 ativam a transcrição de três genes chamados período: mPer1, mPer2 e mPer3 e dois chamados critocromo: mCry1 e mCry2. As proteínas derivadas de mPer e mCry translocam-se de volta para o núcleo, onde as proteínas mCry interagem diretamente com os genes Clock e Bmal1, inibindo a sua transcrição (alça negativa). A alça positiva envolve a regulação da transcrição de Bmal1, cujo pico de RNAm ocorre 12 h defasado em relação aos RNAm dos genes mPer e mCry. O heterodímero CLOCK-BMAL1, ao mesmo tempo em que ativa os genes mPer e mCry, também inibe a produção do RNAm responsável pela síntese de BMAL (Brown *et al.*, 2005). O produto final deste ritmo gênico é uma saída neural que conecta os NSQ através de uma via polissináptica à coluna intermediolateral da medula e daí para a saída autonômica simpática. Esta é a saída neural. Os núcleos enviam informações rítmicas, com um período de aproximadamente 24 horas. Na fase de claro, o sinal está "OFF", e na fase de escuro o sinal está "ON". Portanto, estas fibras conduzem no período correspondente ao escuro, ou à noite subjetiva, quando o sujeito é mantido em escuro constante. Existe também uma saída humoral. Fibras que se originam no gânglio cervical superior (um gânglio simpático) inervam diretamente a glândula pineal. A liberação dos neurotransmissores noradrenalina e ATP promove a síntese de melatonina, que é sintetizada apenas na fase de escuro (Markus *et al.*, 2003).

4 RITMOS CIRCADIANOS E IMPLICAÇÕES CLÍNICAS

O ritmo circadiano tem se mostrado importante na prática dos cuidados relacionados ao processo de saúde e doença. A introdução progressiva dos conceitos de fase e amplitude dos ritmos fisiológicos e bioquímicos contribuiu para prever os padrões na manifestação e exacerbação de muitas patologias. Além disso, a manifestação de diferentes ritmos do corpo pode afetar significativamente as respostas dos pacientes tanto a exames de diagnóstico quanto a resposta a tratamentos. A ritmicidade na fisiopatologia tem sido utilizada no desenvolvimento de novos fármacos ou na proposição de novas abordagens de tratamento. A cronoterapêutica, desenvolvida a partir desta linha de abordagem, tem por objetivo otimizar os resultados dos tratamentos através de mudanças na concentração ou modo de ação de novos fármacos ou propondo novos horários de utilização para que estes atuem em sincronia com ritmos biológicos determinantes da atividade da doença.

Outra linha de pesquisa está relacionada ao estudo dos genes do relógio biológico. No entanto, esta ainda se encontra incipiente no estudo de doenças em humanos e tem sido desenvolvida basicamente a partir de estudos experimentais. Estudos em animais têm demonstrado que variações nos genes relógio podem causar anormalidades na regulação dos ritmos circadianos (Pereira *et al.*, 2009). As investigações em humanos têm elucidado que este sistema regula muitos processos fisiológicos como controle da temperatura, comportamento alimentar, desordens do sono, secreção hormonal, metabolismo e utilização de drogas, homeostasia da glicose, formação de tumores, e progressão do ciclo celular (Takahashi *et al.*, 2008; Wassertheil-Smoller *et al.*, 2004). Entre as hipóteses de entendimento das anormalidades na regulação dos ritmos circadianos estão as modificações no comprimento do

período endógeno que podem levar a alterações no ângulo de fase de sincronização pela luz. Fenótipos circadianos muito semelhantes aos encontrados em animais são vistos em humanos, abrindo um leque bastante grande para pesquisas científicas, que visam buscar associações de alterações nos genes relógio com fenótipos circadianos (Pereira *et al.*, 2009).

4.1 Ritmos da Melatonina

A melatonina é o principal marcador do ritmo circadiano. Este hormônio é produzido no período de escuro pela glândula pineal e prontamente liberada na corrente circulatória. A função básica desta molécula lipossolúvel é informar ao organismo o período e duração do dia. A produção de melatonina ocorre principalmente na glândula pineal, mas também pode ocorrer em muitos órgãos e tecidos como órgãos do sistema linfóide como a medula óssea, timo e linfócitos, retina, NSQ, testículo, trato digestório e pele (Markus *et al.*, 2003). A melatonina possui um efeito sincronizador endógeno, afetando o sono através da sua influência na fase dos osciladores circadianos. Modelos mais recentes do controle do ciclo sono-vigília postulam que a sonolência, ou propensão a dormir, é proporcional à diferença entre a amplitude do oscilador circadiano, que flutua como uma função senoidal, e a amplitude do processo relacionado ao ciclo sono-vigília, que aumenta quanto mais nos afastarmos do horário do último despertar. Entretanto, a sonolência exibe um ritmo circadiano positivamente correlacionado com a concentração de melatonina no plasma e negativamente correlacionado com as medidas de atividade e temperatura.

O ritmo circadiano da melatonina está relacionado com certas condições clínicas como doenças cardiovasculares e neurodegenerativas, processos fisiológicos como regulação da pressão arterial, oncogênese, função imune e mais recentemente na indução da diferenciação de osteoblastos (Altun *et al.*, 2007; Anisimov *et al.*, 2001; Celinski *et al.*, 2009; Maldonado *et al.*, 2007; Rodriguez *et al.*, 2007; Srinivasan *et al.*, 2008). Além disso, encontram-se evidências de que o ritmo de secreção da melatonina esteja alterado durante as intervenções cirúrgicas e em pacientes críticos, tanto a nível plasmático quando na concentração periférica (Bourne *et al.*, 2006). Estudos clínicos e experimentais recentes evidenciaram que esses mediadores da inflamação aguda inibem o ritmo de secreção da melatonina, que parece estar relacionado à severidade da injúria cirúrgica (Fernandes *et al.*, 2006; Pontes *et al.*, 2006; Pontes *et al.*, 2007). A relação entre altos níveis de TNF-α com baixa produção tanto da melatonina noturna quanto diurna, indica que o aumento dos níveis de TNF-α no plasma suprime a produção da melatonina endócrina, o que reforça a hipótese de um eixo pineal-imune (Fernandes *et al.*, 2006; Markus *et al.*, 2007). Embora a excreção de melatonina tenha sido considerada um índice fisiológico para a função noradrenérgica, estudos comparando os níveis de melatonina em pacientes deprimidos e voluntários saudáveis não são conclusivos, sugerindo que a alteração noturna de melatonina possa ocorrer apenas em níveis mais graves de depressão (Carvalho *et al.*, 2009; Carvalho *et al.*, 2006; Crasson *et al.*, 2004).

4.2 Ritmos de outros Hormônios

A produção e liberação dos hormônios são distribuídas em um ciclo de 24 horas, o qual pode sofrer interferências do estilo de vida, ou exposição a determinados fatores, como a luz durante a noite, atividades físicas ou alimentos em diferentes horários.

A leptina é secretada pelo tecido adiposo. A ação desta no sistema nervoso central promove a redução da ingestão alimentar e o aumento do gasto energético, além de regular a função neuroendócrina e o metabolismo da glicose e de gorduras. A expressão da leptina é controlada por diversas substâncias, como insulina, glicorticóides e citocinas pró-inflamatórias. Assim, um aumento nos níveis desta reduz a ingestão alimentar, enquanto baixos níveis induzem à alimentação (Birketvedt *et al.*, 1999; Stunkard *et al.*, 2003). Os níveis de concentração da leptina encontram-se aumentados durante a noite em indivíduos com hábitos diurnos e peso saudável (Qin *et al.*, 2003).

A grelina é sintetizada, primeiramente, pelo estômago e responsável pelo aumento da secreção do hormônio do crescimento (GH). Age também no controle do gasto energético, controle da secreção ácida e da motilidade gástrica e influencia a função endócrina pancreática e o metabolismo da glicose. Está envolvida na sinalização dos centros hipotalâmicos que regulam a ingestão alimentar e o balanço energético. Níveis circulantes de grelina encontram-se aumentados durante o jejum prolongado e em estado de hipoglicemia e têm sua concentração diminuída após a refeição, ou seja, níveis plasmáticos de grelina são dependentes da ingestão alimentar e aumentam durante a primeira parte da noite/sono (Dzaja *et al.*, 2004).

4.3 Ritmo Alimentar

A ritmicidade alimentar circadiana é herdada, espécie específica, uma vez que o homem é basicamente diurno. Está sincronizado ao ciclo claro/escuro e aos níveis de cortisol, serotonina, leptina, citocinas, entre outros (Waterhouse *et al.*, 2003). Além disso, o ritmo social imprime marcado efeito na regulação da alimentação, pois a sociedade contemporânea funciona 24 horas e seu impacto na quantidade, qualidade e horários da alimentação tem sido inexorável. Como exemplo, cita-se o atraso da alimentação para adaptação aos horários de trabalho (Waterhouse *et al.*, 2003)

Existem algumas situações em que ocorre a dessincronização da ritmicidade alimentar, tendo em vista que a quantidade, a qualidade e o horário das refeições parecem ser determinados por reflexos condicionados, pela rotina e pela sensação de que "é hora de comer". As refeições atuariam como um *zeitgeber*, indicando que as refeições seriam determinadas por uma organização social ou sincronização do ritmo biológico (Bernardi *et al.*, 2009).

Ritmos circadianos e diurnos afetam a ingestão alimentar. Muitos comportamentos, incluindo a ingestão energética, variam em nível e intensidade ao longo do dia nesses processos. Estudos recentes têm mostrado que a quantidade calórica das refeições, os intervalos pós-refeições e os níveis de saciedade diminuem durante o dia. O horário das refeições pode ser relacionado com a ingestão total durante o dia. Os resultados desses estudos sugerem que ingerir um valor calórico maior pela manhã (ou primeira parte do dia) pode resultar em uma diminuição da ingestão total durante o dia, enquanto a ingestão de uma

grande quantidade energética à noite pode resultar em um aumento do total da ingestão (de Castro, 2004).

A alteração dos níveis de adipocinas é considerada um importante mecanismo capaz de alterar o padrão da ingestão alimentar e levar a desajustes nutricionais. A ritmicidade e o sincronismo na secreção destas são importantes para o padrão diário das refeições (Crispim *et al.*, 2007). A observação do comportamento alimentar induziu a definição de uma síndrome denominada Síndrome do Comer Noturno (SCN), caracterizada por um atraso circadiano do padrão alimentar (Birketvedt *et al.*, 2002), mediado por alterações neuroendócrinas (Birketvedt *et al.*, 1999; Stunkard *et al.*, 2003).

4.4 Ritmos de Trabalho

A proposição de novos esquemas de trabalho na sociedade atual, como a alternância de turnos ou o trabalho noturno tem despertado o interesse na área da cronobiologia na busca de novos estudos relacionados aos possíveis efeitos desta troca de turnos. A exposição à luz noturna é um fator dessincronizador do sistema circadiano. O trabalho em turno é um exemplo dessa exposição à luz no período da noite e está associado a doenças como câncer de mama, doenças cardiovasculares, depressão, transtornos de ansiedade e diabetes tipo 2, muitos desses efeitos estão ligados a supressão da melatonina (Rahman *et al.*, 2008).

A propensão para a dessincronização interna parece, no entanto, depender de certas diferenças individuais, como é o caso da idade, sendo que a probabilidade da sua ocorrência é maior em indivíduos mais velhos (Wever, 1985). A dessincronização interna tem sido

observada no contexto de trabalho por turnos, podendo comprometer o bem-estar e estado de saúde dos trabalhadores. Também neste caso, a variável idade parece constituir uma variável relevante nas diferenças detectadas entre trabalhadores.

5 CRONOTIPO

A maior parte dos parâmetros biológicos e comportamentais apresenta ritmicidade circadiana de origem endógena, sincronizada com o ciclo claro-escuro. No entanto, os indivíduos que vivem sob as mesmas condições ambientais e com atividades diárias semelhantes podem apresentar diferenças interindividuais que afetam a expressão dos ritmos circadianos. Esta modificação da ritmicidade biológica pode ser observada pela variedade nos horários que os indivíduos escolhem para dormir, bem como na distribuição das atividades ao longo do dia (Roenneberg *et al.*, 2003b; Waterhouse *et al.*, 2000). A esta característica é classificada de acordo com as preferências para alocar os períodos de atividade e repouso ao longo das 24 horas do dia. Podemos encontrar em um extremo os indivíduos que preferem acordar cedo pela manha e dormir cedo à noite, preferindo também desempenhar as tarefas de maior concentração ou que exigem maior esforço físico no período da manha. Também existe outro extremo que estão ativos em um período mais tarde do dia e preferem deitar muito tarde, durante a madrugada, e acordar mais tarde durante o dia. O desenvolvimento de instrumentos para mensurar estas atividades foi baseado na observação destes hábitos.

Este caráter é denominado de matutinidade e vespertinidade para os extremos e os tipos indiferentes são classificados como intermediários, sendo estes últimos a maioria na população. As preferências interindividuais de fase circadiana também são denominadas de cronotipo, sendo considerado como um traço pessoal onde a posição de fase pode ser indicada pelo mínimo da temperatura central que ocorre muito mais cedo nos matutinos que nos vespertinos (Adan *et al.*, 2002; Adan *et al.*, 2001).

Pessoas matutinas apresentam um avanço de fase do ciclo sono/vigília quando comparados a pessoas vespertinas, sendo observada uma correlação deste caráter com variáveis biológicas como a temperatura corporal, níveis de cortisol e melatonina (Andrade *et al.*, 1992; Horne *et al.*, 1976). Portanto, a diferença de fase não pode ser atribuída somente na preferência para executar as atividades ou a rotina de vida. Mesmo quando indivíduos são submetidos a situações de isolamento ou rotina constante, esta ritmicidade biológica persiste.

Tal característica sofre alteração ao longo do desenvolvimento dos indivíduos, sendo que as crianças apresentam maior matutinidade modificada durante a adolescência, onde pode ser observado um deslocamento de fase, aumentando a vespertinidade (Andrade *et al.*, 1992; Ishihara *et al.*, 1985), invertendo na terceira idade, quando o caráter de matutinidade é mais acentuado (Carrier *et al.*, 1997; Duffy *et al.*, 1999).

O interesse no estudo desta tipologia tem aumentado nos últimos anos sendo de particular relevância para compreender a organização temporal do processo de regulação do organismo. Diferentes questionários têm sido desenvolvidos na tentativa de estimar a posição de fase do indivíduo com base em questionários auto-avaliação. O questionário de Matutinidade/ Vespertinidade (MEQ) desenvolvido por Horne e Ostberg é a ferramenta mais utilizada para a diferenciação subjetiva cronotipos (Horne *et al.*, 1976). Outros instrumentos de avaliação foram desenvolvidos: o inventário tipologia circadiana (Folkard, 1986), a escala composta de matutinidade (Smith *et al.*, 1989) e o questionário de Cronotipo de Munique (Roenneberg *et al.*, 2003b).

5.1 Questionário de Matutinidade Vespertinidade de Horne-Otsberg

O Questionário de Matutinidade Vespertinidade (MEQ) de Horne e Ostberg é considerado como um método fácil para investigar o comportamento circadiano humano. Ele é composto por perguntas relacionadas aos hábitos de sono e outras relacionadas às preferências das pessoas para realizar determinadas tarefas durante o dia como a disposição para se alimentar ou realizar atividades mentais ou físicas em diferentes horários do dia (Horne *et al.*, 1976). As perguntas do MEQ são na sua maioria subjetivas (por exemplo, estado de alerta na parte da manhã), com quatro opções de respostas. Algumas perguntas são feitas utilizando intervalos de tempo determinado (por exemplo, a que horas da noite você se sente cansado e, como resultado, necessita dormir?). A cada resposta é fornecida uma pontuação, indicando baixa pontuação para o tipo vespertino, alta para o matutino. O escore final, obtido após a soma das respostas individuais, varia de 16 (extremo vespertino) a 86 (extremo matutino). A publicação original dividiu a pontuação em cinco grupos: definitivamente matutino (70-86), moderadamente matutino (59-69), indiferentes (42-58), moderadamente vespertino (31-41), e definitivamente vespertino (16-30) (Horne *et al.*, 1976). O MEQ foi validado através da mensuração da temperatura oral em 150 pessoas com idades entre 18 e 32 anos de ambos os sexos (Horne & Ostberg, 1976). A pontuação do MEQ foi correlacionado com parâmetros fisiológicos como para a melatonina (Duffy *et al.*, 1999), cortisol (Bailey *et al.*, 1991), e temperatura corporal (Baehr *et al.*, 2000; Duffy *et al.*, 1999).

5.2 Vantagens e Desvantagens do MEQ

Na maioria dos estudos, o MEQ tem sido utilizado para determinar a tendência de matutinidade/vespertinidade refletindo a fase do relógio circadiano dos indivíduos através da pontuação do MEQ (Archer *et al.*, 2003; Katzenberg *et al.*, 1998; Katzenberg *et al.*, 1999; Pedrazzoli *et al.*, 2000)

O Questionário de Matutinidade Vespertinidade (MEQ) de Horne & Ostberg é considerado como um método fácil para investigar o comportamento circadiano humano. As perguntas do MEQ são na sua maioria subjetivas e auto-aplicáveis, e a soma das questões representa o escore final deste instrumento.

Estudos têm demonstrado as mudanças relacionadas às fases de sono ao longo da ontogênese. A progressão da idade foi associada com um inicio do sono mais cedo à noite, um menor período de sono durante a noite e um despertar mais cedo do que o habitual (Carrier *et al.*, 1997). Os pontos de corte determinado na publicação original (Horne *et al.*, 1976) foram baseados em uma amostra de pessoas na faixa etária entre 18 e 32 anos. Recentemente, Taillard et al (Taillard *et al.*, 2004) validou o MEQ em uma população para uma faixa etária mais avançada utilizando uma amostra de 566 trabalhadores entre 44 e 58 anos. Este estudo, avaliando diferentes componentes do MEQ, propõe que apenas três grupos podem ser definidos a partir desta amostra e sugerem novos pontos de corte (vespertino: $\leq$ 52, intermediário: 53-64, matutino: $\geq$ 65). A pontuação do MEQ, portanto, parece ser inconsistente entre as diferentes faixas etárias (Caci *et al.*, 2009b; Taillard *et al.*, 2004).

Outro fator que parece influenciar na pontuação do MEQ é a presença de patologias como distúrbio do sono ou depressão. Os efeitos da depressão sobre os escores do MEQ foram avaliados no estudo de Drennan e colaboradores (Drennan *et al.*, 1991). Trinta e nove pacientes com depressão foram comparados com o mesmo número de controles sadios. Pacientes deprimidos apresentaram menores escores no MEQ quando comparado com controles. Um atraso de fase em pacientes com depressão sazonal também foi observado em outro estudo (Lewy *et al.*, 1987). Estes achados tem se replicado em estudos realizados em sujeitos saudáveis, o que indica não uma deficiência do instrumento, mas um achado relacionado à alteração de fase na presença de patologias como a depressão (Hidalgo *et al.*, 2009; Schneider, 2011).

A presença de distúrbios do sono pode afetar os escores do MEQ. A síndrome do atraso ou avanço da fase do sono é um distúrbio do sono no qual o principal episódio de sono está atrasado ou avançado em relação ao horário desejado, resultando em sintomas de insônia inicial ou dificuldade em despertar em horários convencionais. Estes distúrbios são resultados de mutações genéticas que afetam o relógio biológico e estão relacionadas com maior vespertinidade (Archer *et al.*, 2003; Brown *et al.*, 2005; Toh *et al.*, 2001), fazendo com que a pessoa atrase ou adiante o horário de início de sono. A presença destes distúrbios pode afetar os escores do MEQ, sendo então recomendado o uso com restrição do mesmo nesta população.

Roenneberg e colaboradores (Roenneberg *et al.*, 2003b; Valdez *et al.*, 1996) e Valdez e colaboradores (Valdez *et al.*, 1996) relataram comportamento vigília-sono diferentes entre os dias de trabalho e dias livres. Em dias de trabalho, a maioria das pessoas acumula um déficit

de sono, provavelmente devido ao início dos horários de trabalho para o qual eles compensam em dias livres. O MEQ não permite discriminar entre os dias de trabalho dos dias livres o que segundo Roenneberg dificulta estudos em que estas diferenças individuais dos participantes poderiam ser correlacionadas a outras questões.

5.3 Questionário de Cronotipo de Munique (MCTQ)

O questionário de cronotipo de Munique foi desenvolvido para avaliar o cronotipo baseado na fase de sono de cada individuo (Roenneberg *et al.*, 2003b). O MCTQ pergunta sobre os hábitos de sono separando os dias livres dos dias de trabalho. O cronotipo é baseado no ponto médio do sono nos dias livres onde não existem obrigações de trabalho (MSF) (Roenneberg *et al.*, 2004). Durante os dias de trabalho é esperado um débito de sono que é compensado nos dias livres. O MSF é então corrigido para o débito de sono dos dias de trabalho, resultando no MSFsc de acordo com o horário local. O MSFsc é então utilizado para classificar o cronotipo do individuo avaliado de acordo com a distribuição na população ao qual ele pertence (Roenneberg *et al.*, 2004).

Segundo os autores, o MCTQ fornece uma medida quantitativa do cronotipo, baseado na fase do sono avaliado como uma medida quantitativa do horário médio do sono (Allebrandt *et al.*, 2008). Como resultado o MSFsc não é baseado em escores, mas possui uma distribuição continua e aproximada a uma curva normal. Os cronotipos matutinos e vespertinos são distribuídos nos extremos desta curva e são utilizados limites mínimos de 30 % dos valores de cada população avaliada para esta classificação.

O MCTQ foi correlacionado com os valores do MEQ (Zavada *et al.*, 2005). De acordo com este estudo, o ponto médio do sono avaliado pelo MCTQ apresenta uma correlação negativa (r = -0.73) com o escore do MEQ, o que representa que os indivíduos com menores escores no MEQ correspondem aos que apresentam no MCTQ maiores valores do MSFsc como seria de se esperar para os tipos vespertinos.

A principal diferença entre estes instrumentos é que o MEQ determina a o cronotipo baseado em preferências para alocar os períodos de atividades e repouso, enquanto que o MCTQ avalia a fase de sono, através do meio período de sono (Sack *et al.*, 2007).

5.4 Cálculos Utilizados para Avaliação do MCTQ

Para obter a pontuação do questionário de cronotipo de Munique é necessário avaliar o meio período da fase de sono de cada individuo, denominada como o ponto médio do sono ou meio período de sono (Roenneberg et al., 2003b). O primeiro passo para o cálculo do MCTQ é digitar as perguntas sobre os hábitos de sono em uma planilha tipo Excel, separando os dias livres dos dias de trabalho. O ponto médio do sono nos dias livres (MSF) pode ser calculado seguindo as fórmulas abaixo descritas seguindo o método original do desenvolvimento deste instrumento pelos autores (Roenneberg et al., 2004). Durante os dias de trabalho é esperado um débito de sono que é compensado nos dias livres. O MSF é então corrigido para o débito de sono dos dias de trabalho, resultando no MSFsc de acordo com o horário local.

5.4.1 Período do Inicio do Sono (Sleep onset)

Este valor é referente ao horário em que o individuo inicia o sono. Para o cálculo soma-se o horário em que o individuo respondeu que está preparado para dormir à latência do sono e subtrai-se de 24 horas (Roenneberg *et al.*, 2004).

SOnset = (ST- SL) -24

Onde:

SOnset: horário do início do sono;

ST: horário do inicio do sono;

SL: latência do sono.

5.4.2 Duração do Sono (Sleep Duration)

Subtrai-se o período do fim do sono com o valor do inicio do sono. Utiliza-se o período do inicio do sono conforme descrito no tópico anterior (Roenneberg *et al.*, 2004).

SD = SEnd - SOnset

Onde:

SD: duração do sono;

SEnd: horário de acordar;

SOnset: horário do início do sono.

5.4.3 Ponto Médio do Sono (Mid-Sleep)

Para o cálculo do ponto médio do sono divide-se o valor da duração do sono por dois. Para corrigir os valores do período anterior às 24 horas, utiliza-se o valor do inicio do sono no formato de 24 horas e subtrai-se este valor de 24 (Roenneberg *et al.*, 2004).

$$MSF = \frac{SOnset + SEnd}{2}$$

Onde:

MSF: ponto médio do sono;

SOnset: horário do início do sono;

SEnd: horário de acordar.

5.4.4 Duração Média do Sono (Average Sleep Duration)

A média diária de duração do sono é calculada utilizando o período de sono nos dias de trabalho multiplicado pelos dias de trabalho e somado ao período de sono nos dias livres multiplicado pelo numero de dias livres na semana. Este valor é dividido por sete para se obter o período médio diário de sono (Roenneberg *et al.*, 2004).

$$AvSD = \frac{SDW \times n^{o}\ DT + SDF \times n^{o}}{FD}$$

Onde:

AvSD: Duração média do sono;

SDW: duração do sono nos dias de trabalho;

WD: número de dias de trabalho;

SDF: duração do sono nos dias livres;

FD: número de dias livres.

5.4.5 Correção do Débito do Sono

Durante os dias de trabalho é esperado um débito de sono que é compensado nos dias livres. O MSF é então corrigido para o débito de sono dos dias de trabalho, resultando no MSFsc de acordo com o horário local. Este recurso é utilizado quando a duração do sono dos dias livres é maior do que nos dias de trabalho. Para esta correção, subtrai-se o valor da duração do sono nos dias livres da média diária de duração do sono dividida por dois (Roenneberg *et al.*, 2004).

$$MSFsc = MSF^{*}\ 0{,}5\ (SDF - AvSD)$$

$$2$$

Onde:

MSFsc: ponto médio do sono nos dias livres corrigido para o débido de sono;

MSF: ponto médio do sono nos dias livres;

SDF: duração do sono nos dias livres;

AvSD: média diária da duração do sono.

5.4.6 Jet Lag Social

Um cálculo adicional da diferença entre o período médio de sono nos dias livres dos dias de trabalho é realizado como um indicativo da pressão sobre a fase de sono que o individuo é exposto quando este período difere do seu horário de sono endógeno. Esta diferença é denominada pelos autores como Jet lag social, uma analogia ao Jet lag experimentado em viagens transmeridionais. Para este cálculo subtrai-se o período médio do sono nos dias livres do período médio do sono nos dias de trabalho (Wittmann *et al.*, 2006).

JLS = MSF - MSW

Onde:

JLS: Jet Lag Social;

MSF: ponto médio do sono nos dias livres;

MSW: ponto médio do sono nos dias de trabalho.

6 LIMITAÇÕES DAS ESCALAS AVALIADAS

O termo cronotipo se refere à diferença entre as relações de fase de variáveis biológicas como o período de sono, níveis de melatonina, temperatura corporal, entre outros e tem sido mensurada através de questionários como o MEQ que avalia uma preferência de matutinidade e vespertinidade (Horne *et al.*, 1976). As questões utilizadas são basicamente subjetivas, relacionadas à forma de alocar as atividades e o período de sono. Algumas situações hipotéticas também são avaliadas como por exemplo: considerando apenas o seu bem-estar e o seu melhor ritmo, qual o horário você acordaria caso estivesse livre para planejar o seu dia (Horne *et al.*, 1976).

Embora a pontuação do MEQ tenha sido validada com o tempo medido experimentalmente em relação aos ritmos circadianos do indivíduo, como por exemplo, a temperatura, a melatonina, ou cortisol (Bailey *et al.*, 1991; Duffy *et al.*, 1999; Duffy *et al.*, 2001), algumas críticas tem sido feitas sobre estas escalas. Alguns autores argumentam que a MEQ não avalia os dias de trabalho e os dias livres separadamente, e também não avalia os horários de sono real ou a exposição à luz (Roenneberg *et al.*, 2003a). Este fato originou o desenvolvimento de um novo questionário para avaliar quantitativamente o tempo de sono durante o dia de 24 horas (fase do sono) pela universidade de Munique na Alemanha. Segundo estes, a nova escala proposta representa uma avaliação qualitativa, em vez de auto-avaliação subjetiva do cronotipo, como vinha sendo proposto até então pelas outras escalas.

O MEQ continua sendo o questionário mais comumente utilizado para avaliar a preferência de matutinidade e vespertinidade. No entanto, a pontuação do MEQ não parece ser consistente na investigação de amostras de diferentes idades. Os pontos de corte determinados

na publicação original (Horne *et al.*, 1976) foram baseados em uma amostra de jovens com idade entre 18 e 32 anos. Recentemente, Taillard e colaboradores (Taillard *et al.*, 2004) validou o MEQ em uma população de meia idade em trabalhadores franceses (média de idade: 51,2 ± 3,2 anos). Segundo estes autores, apenas três grupos podem ser definidos a partir desta amostra e foram sugeridos novos pontos de corte para determinação dos grupos nesta faixa etária (tipo vespertino: ≤ 52, tipo indiferente: 53-64, tipo matutino: ≥ 65). A pontuação do MEQ, portanto, parece ser inconsistente entre os grupos etários mais jovens e mais velhos e também entre diferentes populações (Caci *et al.*, 2009b; Caci *et al.*, 2005a). O problema relacionado com a classificação pode ser atribuído a uma distribuição da amostra, como foi observado no trabalho utilizando o CSM (Greenwood, 1994). A amostra teve uma distribuição negativa (-0,22 p <0,05) indicando que a distribuição diferiu significativamente do normal e, consequentemente, tem influência sobre a proporção de classificação dos indivíduos. Portanto, o uso de escores normativos padronizados, como o ponto de corte, para classificação da tipologia apresenta uma dependência da característica da amostra e não reflete os efeitos da idade, sexo e cultura (Caci *et al.*, 2009b).

Segundo Torsvall e Akerstedt (Torsvall *et al.*, 1980), os itens do MEQ são inadequados para os trabalhadores em horários irregulares. Trabalhadores de turnos têm de mudar seus hábitos de sono alterados de acordo com a escala de trabalho e, consequentemente, a medição do cronotipo pode ser mascarada pela atividade de trabalho. A distribuição da pontuação MEQ também mostrou as influências culturais entre trabalhadores japoneses e coreanos. Os escores médios foram significativamente diferentes entre trabalhadores japoneses e trabalhadores coreanos. A pontuação média do MEQ em trabalhadores japoneses (56,2) foi estatisticamente superior ao dos trabalhadores da Coréia (49,1), em todas as faixas etárias é provável que seja o

resultado da diferença de condições sociais e culturais entre os dois países (Park *et al.*, 1998). Adan e colaboradores (Adan *et al.*, 2005) estudando o CSM, em uma amostra de estudantes de espanhol, relatou que indivíduos foram classificados como tipo vespertino usando notas inferiores ou iguais a 21, nem como tipo, escores entre 22 e 39, e como o tipo da manhã, pontuação maior ou igual a 40. Nesta pesquisa propõe-se que um novo critério deveria ser aplicado, como os percentis 20 e 80 para selecionar os estremos de vespertinidade e matutinidade, respectivamente. A influência da idade sobre a distribuição dos escores MEQ foi observada por Carrier et al (Carrier *et al.*, 1997). Eles concluíram que matutinidade foi significativamente correlacionada com a idade, com o aumento da idade associada com maior matutinidade. Há evidências de mudanças associadas com o desenvolvimento e envelhecimento. Um atraso na fase de sono, comumente observada entre os adolescentes, são atribuídas, pelo menos em parte, às mudanças no desenvolvimento dos mecanismos que regulam o tempo de sono (Carskadon *et al.*, 1993). Por outro lado, há uma tendência para que as pessoas se tornem mais matutinas com o avanço da idade (Carrier *et al.*, 1997).

Alguns estudos têm relatado que a população do sexo feminino parece ser mais do tipo matutina que a população masculina (Motohashi, 1988); (Ishihara *et al.*, 1985), Portanto, a diferença entre os sexos deve ser considerada na determinação da preferência de matutinidade e vespertinidade nos estudos.

Alguns critérios como a variabilidade dos escores na distribuição etária e horários irregulares de trabalho devem ser fatores levados em consideração no momento de escolher o instrumento adequado para medir o cronotipo em diferentes estudos. Dependendo do tema do estudo, às vezes apenas uma questão com base na auto-avaliação do cronotipo parece ser

capaz de classificar os participantes de forma eficiente sobre as preferências de matutinidade e vespertinidade. O uso do percentil como ponto de corte tem se mostrado arbitrário e, de acordo com a amostra, é possível que o mesmo sujeito possa ser classificado como um tipo diferente de acordo com a distribuição de amostra. Em conclusão, a utilização do período médio do sono não deve ser considerada estritamente uma medida do cronotipo, mas sim uma estimativa do mesmo.

7 DISTÚRBIOS DO RITMO CIRCADIANO

Sob a denominação de distúrbio de ritmo circadiano, podemos encontrar algumas patologias que interferem no ritmo circadiano, influenciando a vida de muitas pessoas. Entre estas podemos citar Jet lag, trabalho em turnos alternados, trabalho noturno, distúrbios do sono, distúrbios psiquiátricos, entre outros. Os distúrbios dos ritmos circadianos podem acompanhar outras patologias com as quais aparecem como efeitos secundários. Nas espécies sujeitas ao forte impacto do fotoperíodo, estas são informações essenciais para assegurar que as funções dependentes das estações do ano sejam ajustadas corretamente. Desta forma, a melatonina tem um papel essencial nas funções do controle do sono e da temperatura corporal durante as 24 horas do dia. Os estudos que vêm sendo realizados indicam que a melatonina seria não apenas um coadjuvante na organização circadiana, mas teria importante função na informação sobre o escuro. Ela tem sido considerada como um hormônio que sinaliza para diversas partes do organismo a ocorrência da noite no ambiente, provendo também informações sobre a duração da noite nas diferentes estações do ano (Arendt, 1998).

7.1 Alterações do Sono

A principal característica dos distúrbios do ritmo circadiano do sono é a dissociação entre o padrão de sono em relação ao padrão normal. Nestes distúrbios o individuo não consegue dormir quando esperado ou desejado e o padrão de sono e vigília ocorrem em momentos inadequados (Dagan, 2002). Como consequência, os pacientes queixam-se de

insônia ou sonolência excessiva diurna Estes distúrbios podem ser ocasionados por fatores endógenos e exógenos (Sack *et al.*, 2007).

Os dados com humanos, apesar de variáveis, indicam que a melatonina é um fármaco capaz de influenciar o sono (Arendt, 2000). Um dos pontos mais evidentes é que a melatonina (0,1-10mg) é capaz de reduzir a temperatura corporal, alterar a Curva de Resposta Dependente de Fase à luz diminuir a latência para o inicio do sono (Gilbert *et al.*, 1999). Estudos têm evidenciado o efeito da melatonina no tratamento da síndrome do atraso de sono. A dose de 5mg tem demonstrado efeito benéfico provocando um avanço na fase de sono quando administrada 5 horas antes do inicio endógeno de melatonina (Altun *et al.*, 2007).

A associação de benzodiazepínicos e melatonina reduz a latência para o inicio do sono em pacientes idosos, comparados com pacientes tratados apenas com benzodiazepínico. A melatonina também aumenta a eficiência do sono e reduz o aparecimento de efeito rebote em protocolos de retirada de benzodiazepínico (Zisapel, 1999). Nos indivíduos idosos, para os quais a piora do sono esta ligada à diminuição de melatonina, protocolos de administração desse hormônio (0,3mg/dia) promovem uma melhora significativa no quadro. Vários relatos na literatura demonstram que esse hormônio pode modular positivamente o sono, mas a sua utilização como um hipnótico ainda traz algumas controvérsias. Em idosos não insones, a melatonina não interfere no sono mesmo que eles apresentem um pico de melatonina menor que indivíduos adultos normais (Wurtman, 2000).

7.2 Dessincronização após Vôos Transmeridionais – Jet Lag

O Jet lag é um fenômeno que ocorre em pessoas que atravessam meridianos num mesmo dia, e por isso tem que se adaptar a um novo fuso horário. A incapacidade do relógio biológico em adaptar-se imediatamente às abruptas mudanças dos *zeitgebers* ocorre quando há a dessincronização entre os sistemas geradores de ritmo interno e o meio ambiente e social ocasionado por viagem rápida através de múltiplos fusos horários. As principais consequências são os distúrbios para iniciar ou manter o sono, a diminuição da qualidade do sono, a sonolência diurna, o cansaço durante o dia, a diminuição do alerta subjetivo e do desempenho, o mal-estar gastrintestinal e a dor-de-cabeça (Sack *et al.*, 2007).

A rapidez em que o corpo se ajusta ao novo horário varia de pessoa para pessoa. Enquanto algumas pessoas demoram muitos dias para se adaptar ao novo horário, outras demoram poucas horas para fazê-lo. Estudos indicam que os ritmos de temperatura tendem a normalizar no período de uma semana, enquanto que o ritmo de cortisol pode levar até 21 dias para normalizar.

Testes clínicos foram realizados com voluntários após vôos intercontinentais, verificando que a melatonina administrada antes de deitar, tanto em doses fisiológicas (0,5 mg), como em doses farmacológicas (5,0 mg), foi capaz de diminuir todos os sintomas do Jet lag. Ressalte-se que em doses farmacológicas (5,0 mg) as propriedades de aumentar a qualidade de sono e diminuir a latência são mais efetivas (Brown *et al.*, 2009).

7.3 Transtornos do Humor

Dentre os transtornos afetivos do humor, a depressão e transtorno bipolar são as principais causas de incapacidade em saúde publica, bem como apresentam uma condição crônica e recorrente (Andrews, 2001). A depressão é uma condição altamente prevalente em estudos epidemiológicos, com índices que variam de 8,2% no Canadá, 8,56% na Europa e 8,7% nos Estados Unidos, independente dos critérios utilizados para definir a depressão nestes estudos (Ayuso-Mateos *et al.*, 2001; Vasiliadis *et al.*, 2007). No Brasil as estimativas de depressão, avaliada em população urbana, foram de 10% (Mari *et al.*, 1986).

O fato de que a depressão tem um padrão típico diário, relacionado com a ritmicidade circadiana, descrita como um cansaço maior nas primeiras horas da manhã do que à noite, foi observado por Sprengel em 1810 (Lemmer, 2009). Esta perturbação na ordem temporal do sistema circadiano foi associada com a vulnerabilidade genética, sexo e idade. Variações de humor durante o dia, alterações do sono, bem como, alterações no ritmo circadiano da secreção de cortisol, ACTH, melatonina e outros parâmetros endócrino-metabolico foram observado em pacientes com episódios depressivos (Soria *et al.*, 2009).

As características individuais cronobiologicas, relacionadas às preferências para alocar as atividades durante o dia, também foram relacionadas aos distúrbios de humor. Estudos realizados em nosso meio utilizando a escala de matutinidade e vespertinidade de Horne e Ostberg demonstraram uma associação entre vespertinidade e sintomas depressivos em pessoas saudáveis (Hidalgo *et al.*, 2009). A depressão bipolar também foi associada a uma preferência vespertina (Giglio *et al.*, 2010).

A Doença Bipolar (classicamente designada por psicose maníaco-depressiva) apresenta períodos de oscilações entre episódios maníacos e depressivos. As oscilações se manifestam, para muitos pacientes, em ciclos regulares que duram de alguns dias a alguns anos, levando a alguns investigadores a atribuir a responsabilidade da origem da síndrome depressiva à variação do fotoperíodo, contribuindo para a confirmação da natureza rítmica desta doença. Outro exemplo de manifestação rítmica pode ser vista na depressão sazonal, descrita por Rosenthal (Rosenthal *et al.*, 1984), como uma doença de ritmicidade infradiana circanual, coincidindo o seu início com o começo do Outono, atingindo a sua máxima expressão no Inverno e diminuindo progressivamente a sintomatologia com a chegada da Primavera.

A depressão sazonal é um distúrbio do ritmo circadiano causado pela dessincronização entre o relógio solar e o relógio biológico humano durante as estações de fotoperíodos curtos (Rosenthal *et al.*, 1984). Durante estes períodos é observado um aumento da produção de melatonina relacionado à depressão sazonal uma vez que o tratamento fótico, com a exposição à luz no período da manhã, ocorre a inibição da produção de melatonina, reduzindo os sintomas depressivos (Lewy *et al.*, 1987; Terman *et al.*, 2005; Wirz-Justice *et al.*, 2005).

Do ponto de vista biológico, o caráter temporal da depressão pode ser observado pelas alterações nos perfis de diversos ritmos circadianos durante o período depressivo. Entre eles o ritmo da temperatura corporal e alterações na arquitetura do sono. Alguns estudos têm observado variações na secreção circadiana de alguns parâmetros hormonais como cortisol, melatonina, prolactina e hormônio do crescimento (Soria *et al.*, 2009). No entanto, não existe unanimidade entre os vários estudos, o que pode ser justificado pela variedade de fenômenos fisiológicos e clínicos presentes nos distúrbios do humor. A diversidade de resultados das

investigações pode ter origem nos diversos tipos de depressão estudadas, na utilização indiferenciada de deprimidos, cujo diagnóstico varia em função dos diferentes critérios de classificação utilizados pelo pesquisador. Outros aspectos que podem influenciar os resultados podem estar relacionados ao tipo de tratamento, tempo de doença, variações na duração do fotoperíodo e clima dos locais de estudo, ou ainda a variedade metodológica dos estudos.

8 ABORDAGEM CRONOBIOLOGICA DA DEPRESSÃO

Nas últimas décadas, houve o crescente interesse aos aspectos cronobiológicos do comportamento mental, psicológico e social, o que tem resultado numa vasta proliferação de estudos sobre esta matéria. A depressão é, provavelmente, a doença psiquiátrica cujos estudos mais referências fazem aos ritmos biológicos, pelo caráter periódico dos seus sintomas, podendo surgir com diferentes periodicidades: diária, mensal, sazonal ou anual.

A observação de flutuações nas características dos transtornos do humor constituiu o motivo para o desenvolvimento de diversos modelos ou teorias baseados nas alterações dos ritmos biológicos. O modelo de Healy e Waterhouse (Healy *et al.*, 1995; Healy *et al.*, 1991) preconiza que os indivíduos, perante rupturas ambientais ou condições de vida persistentes que perturbam as suas rotinas sociais, alteram a exposição aos *zeitgebers*, provocando um desalinhamento entre os fatores endógenos e os fatores exógenos da ritmicidade biológica. A formulação deste modelo resultou da observação das conseqüências daquele desalinhamento em trabalhadores por turnos. Os seus autores extrapolaram-no para as perturbações do humor, devido ao fato de muitas das alterações fisiológicas e psicológicas manifestadas por aquele grupo de trabalhadores encontrarem uma equivalência no perfil clínico dos doentes deprimidos: disforia, perturbações do sono e do apetite, irritabilidade, fadiga persistente, prejuízo do desempenho físico e mental, entre outras (Healy *et al.*, 1995; Healy *et al.*, 1991). O estilo de vida muito irregular dos trabalhadores por turnos dificulta a adaptação às constantes mudanças nos estímulos ambientais. A exposição destes indivíduos a situações de periodicidade ambiental diferentes das que seriam esperadas leva à ocorrência de alterações nos ritmos biológicos, que surge como tentativa de adaptação aos novos estímulos.

Healy e Waterhouse verificaram manifestações transitórias, semelhantes às referidas para a travessia aérea de vários fusos horários (jet lag), para a depressão e para o trabalhadores de turnos. Os autores sugerem que essas manifestações corresponderiam também a um desalinhamento dos ritmos circadianos internos com os externos. As experiências de isolamento temporal ou de rotinas constantes demonstram, igualmente, que as mudanças nos *zeitgebers* produzem o referido desalinhamento e que, se aqueles persistirem, este origina disritmia (Minors et al., 1981). A sua ocorrência em indivíduos com predisposição biológica e psicológica (por exemplo, características de personalidade) induz alterações bioquímicas e fisiológicas capazes de conduzir a uma doença afetiva (Healy et al., 1995). A depressão, por sua vez, mantém o desalinhamento porque ela própria é responsável pela alteração de *zeitgebers*, como a diminuição dos contatos sociais e redução do tempo de exposição à luz, perpetuando a situação de desalinhamento instalado

9 JUSTIFICATIVA

O interesse no estudo da relação entre a tipologia circadiana e os distúrbios do humor tem aumentado. A maioria dos estudos anteriores que investigou essas relações foi realizada com pacientes e tem avaliado a preferência de matutinidade e vespertinidade, utilizando o Questionário de Matutinidade e Vespertinidade (MEQ).

A utilização do MCTQ para avaliar a tipologia circadiana pode permitir uma avaliação mais precisa da interferência do débito de sono acumulado durante os dias de trabalho e sua relação com o processo de dessincronização interna como fator intrínseco nos processos de morbidade dos sintomas depressivos.

10 OBJETIVOS

Os objetivos deste estudo foram avaliar, em uma amostra populacional do Vale do Taquari, a influencia cultural e ambiental da latitude na distribuição dos cronotipos; a relação do cronotipo com a saúde e bem-estar humanos; a associação entre cronotipos com a auto-eficácia (estratégias de reação ao estresse) e a variabilidade genética interindividual.

Será apresentada nesta Tese a primeira etapa do trabalho em que foi avaliada a relação do cronotipo e o risco de sintomas depressivos, buscando explorar um modelo de análise para explicar esta relação no domínio do relógio circadiano interno e da sua modulação pelos diferentes cronotipos.

11 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAN, A., CACI, H. & PRAT, G. (2005). Reliability of the Spanish version of the Composite Scale of Morningness. *Eur Psychiatry*, **20,** 503-9.

ADAN, A. & NATALE, V. (2002). Gender differences in morningness-eveningness preference. *Chronobiol Int*, **19,** 709-20.

ADAN, A. & SANCHEZ-TURET, M. (2001). Gender differences in diurnal variations of subjective activation and mood. *Chronobiol Int*, **18,** 491-502.

ALLEBRANDT, K.V. & ROENNEBERG, T. (2008). The search for circadian clock components in humans: new perspectives for association studies. *Braz J Med Biol Res*, **41,** 716-21.

ALTUN, A. & UGUR-ALTUN, B. (2007). Melatonin: therapeutic and clinical utilization. *Int J Clin Pract*, **61,** 835-45.

ANDRADE, M.M., BENEDITO-SILVA, A.A. & MENNA-BARRETO, L. (1992). Correlations between morningness-eveningness character, sleep habits and temperature rhythm in adolescents. *Braz J Med Biol Res*, **25,** 835-9.

ANDREWS, G. (2001). Should depression be managed as a chronic disease? *Bmj*, **322,** 419-21.

ANISIMOV, V.N., ZAVARZINA, N.Y., ZABEZHINSKI, M.A., POPOVICH, I.G., ZIMINA, O.A., SHTYLICK, A.V., ARUTJUNYAN, A.V., OPARINA, T.I., PROKOPENKO, V.M., MIKHALSKI, A.I. & YASHIN, A.I. (2001). Melatonin increases both life span and tumor incidence in female CBA mice. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, **56,** B311-23.

ARCHER, S.N., ROBILLIARD, D.L., SKENE, D.J., SMITS, M., WILLIAMS, A., ARENDT, J. & VON SCHANTZ, M. (2003). A length polymorphism in the circadian clock gene Per3 is linked to delayed sleep phase syndrome and extreme diurnal preference. *Sleep*, **26,** 413-5.

ARENDT, J. (1998). Melatonin and the pineal gland: influence on mammalian seasonal and circadian physiology. *Rev Reprod*, **3,** 13-22.

ARENDT, J. (2000). Melatonin, circadian rhythms, and sleep. *N Engl J Med*, **343,** 1114-6.

ASCHOFF, J. (1979). Circadian rhythms: influences of internal and external factors on the period measured in constant conditions. *Z Tierpsychol*, **49,** 225-49.

ASCHOFF, J. (1984). Circadian timing. *Ann N Y Acad Sci*, **423,** 442-68.

ASCHOFF, J. (1992). Estimates on the duration of sleep and wakefulness made in isolation. *Chronobiol Int*, **9,** 1-10.

ASCHOFF, J., FATRANSKA, M., GIEDKE, H., DOERR, P., STAMM, D. & WISSER, H. (1971). Human circadian rhythms in continuous darkness: entrainment by social cues. *Science*, **171,** 213-5.

ASCHOFF, J., GERECKE, U. & WEVER, R. (1967). Desynchronization of human circadian rhythms. *Jpn J Physiol*, **17,** 450-7.

AYUSO-MATEOS, J.L., VAZQUEZ-BARQUERO, J.L., DOWRICK, C., LEHTINEN, V., DALGARD, O.S., CASEY, P., WILKINSON, C., LASA, L., PAGE, H., DUNN, G. & WILKINSON, G. (2001). Depressive disorders in Europe: prevalence figures from the ODIN study. *Br J Psychiatry*, **179,** 308-16.

BAEHR, E.K., REVELLE, W. & EASTMAN, C.I. (2000). Individual differences in the phase and amplitude of the human circadian temperature rhythm: with an emphasis on morningness-eveningness. *J Sleep Res*, **9,** 117-27.

BAILEY, S.L. & HEITKEMPER, M.M. (1991). Morningness-eveningness and early-morning salivary cortisol levels. *Biol Psychol*, **32,** 181-92.

BEERSMA, D.G. & DAAN, S. (1993). Strong or weak phase resetting by light pulses in humans? *J Biol Rhythms*, **8,** 340-7.

BERNARDI, F., HARB, A.B.C., LEVANDOVSKI, R.M. & HIDALGO, M.P. (2009). Transtornos alimentares e padrão circadiano alimentar: uma revisão. *Rev. psiquiatr. Rio Gd. Sul* **31,** 170-176.

BERSON, D.M., DUNN, F.A. & TAKAO, M. (2002). Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. *Science*, **295,** 1070-3.

BIRKETVEDT, G.S., FLORHOLMEN, J., SUNDSFJORD, J., OSTERUD, B., DINGES, D., BILKER, W. & STUNKARD, A. (1999). Behavioral and neuroendocrine characteristics of the night-eating syndrome. *Jama*, **282,** 657-63.

BIRKETVEDT, G.S., SUNDSFJORD, J. & FLORHOLMEN, J.R. (2002). Hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the night eating syndrome. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **282,** E366-9.

BOURNE, R.S. & MILLS, G.H. (2006). Melatonin: possible implications for the postoperative and critically ill patient. *Intensive Care Med*, **32,** 371-9.

BROWN, G.M., PANDI-PERUMAL, S.R., TRAKHT, I. & CARDINALI, D.P. (2009). Melatonin and its relevance to jet lag. *Travel Med Infect Dis*, **7,** 69-81.

BROWN, S.A., FLEURY-OLELA, F., NAGOSHI, E., HAUSER, C., JUGE, C., MEIER, C.A., CHICHEPORTICHE, R., DAYER, J.M., ALBRECHT, U. & SCHIBLER, U. (2005). The period length of fibroblast circadian gene expression varies widely among human individuals. *PLoS Biol*, **3,** e338.

BUNNING, E. (1969). Common features of photoperiodism in plants and animals. *Photochem Photobiol*, **9,** 219-28.

BUNNING, E. & MOSER, I. (1969). Interference of moonlight with the photoperiodic measurement of time by plants, and their adaptive reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **62,** 1018-22.

BUYSSE, D.J., REYNOLDS, C.F., 3RD, MONK, T.H., BERMAN, S.R. & KUPFER, D.J. (1989). The Pittsburgh Sleep Quality Index: a new instrument for psychiatric practice and research. *Psychiatry Res*, **28,** 193-213.

CACI, H., DESCHAUX, O., ADAN, A. & NATALE, V. (2009). Comparing three morningness scales: age and gender effects, structure and cut-off criteria. *Sleep Med*, **10,** 240-5.

CACI, H., MATTEI, V., BAYLE, F.J., NADALET, L., DOSSIOS, C., ROBERT, P. & BOYER, P. (2005). Impulsivity but not venturesomeness is related to morningness. *Psychiatry Res*, **134,** 259-65.

CARRIER, J., MONK, T.H., BUYSSE, D.J. & KUPFER, D.J. (1997). Sleep and morningness-eveningness in the 'middle' years of life (20-59 y). *J Sleep Res*, **6,** 230-7.

CARSKADON, M.A., VIEIRA, C. & ACEBO, C. (1993). Association between puberty and delayed phase preference. *Sleep*, **16,** 258-62.

CARVALHO, L.A., GORENSTEIN, C., MORENO, R., PARIANTE, C. & MARKUS, R.P. (2009). Effect of antidepressants on melatonin metabolite in depressed patients. *J Psychopharmacol*, **23,** 315-21.

CARVALHO, L.A., GORENSTEIN, C., MORENO, R.A. & MARKUS, R.P. (2006). Melatonin levels in drug-free patients with major depression from the southern hemisphere. *Psychoneuroendocrinology*, **31,** 761-8.

CELINSKI, K., KONTUREK, P.C., SLOMKA, M., CICHOZ-LACH, H., GONCIARZ, M., BIELANSKI, W., REITER, R.J. & KONTUREK, S.J. (2009). Altered basal and postprandial plasma melatonin, gastrin, ghrelin, leptin and insulin in patients with liver cirrhosis and portal hypertension without and with oral administration of melatonin or tryptophan. *J Pineal Res*, **46,** 408-14.

CHACHAMOVICH, E., FLECK, M.P., TRENTINI, C. & POWER, M. (2008). Brazilian WHOQOL-OLD Module version: a Rasch analysis of a new instrument. *Rev Saude Publica*, **42,** 308-16.

CIPOLLA-NETO, J., NEGRAO, N., AFECHE, S.C., PALUDETTI, L.A., BENEDITO-SILVA, A.A., MARQUES, N. & MENNA-BARRETO, L. (1988). Remarkable similarities between the temporal organization of neocortical electrographic sleep patterns of rats and humans. *Braz J Med Biol Res*, **21,** 599-601.

CRASSON, M., KJIRI, S., COLIN, A., KJIRI, K., L'HERMITE-BALERIAUX, M., ANSSEAU, M. & LEGROS, J.J. (2004). Serum melatonin and urinary 6-sulfatoxymelatonin in major depression. *Psychoneuroendocrinology*, **29,** 1-12.

CRISPIM, C.A., ZALCMAN, I., DATTILO, M., PADILHA, H.G., TUFIK, S. & MELLO, M.T. (2007). [Relation between sleep and obesity: a literature review]. *Arq Bras Endocrinol Metabol*, **51,** 1041-9.

DAGAN, Y. (2002). Circadian rhythm sleep disorders (CRSD). *Sleep Med Rev*, **6,** 45-54.

DE CASTRO, J.M. (2004). The time of day of food intake influences overall intake in humans. *J Nutr*, **134,** 104-11.

DRENNAN, M.D., KLAUBER, M.R., KRIPKE, D.F. & GOYETTE, L.M. (1991). The effects of depression and age on the Horne-Ostberg morningness-eveningness score. *J Affect Disord*, **23,** 93-8.

DUFFY, J.F., DIJK, D.J., HALL, E.F. & CZEISLER, C.A. (1999). Relationship of endogenous circadian melatonin and temperature rhythms to self-reported preference for morning or evening activity in young and older people. *J Investig Med*, **47,** 141-50.

DUFFY, J.F., RIMMER, D.W. & CZEISLER, C.A. (2001). Association of intrinsic circadian period with morningness-eveningness, usual wake time, and circadian phase. *Behav Neurosci*, **115,** 895-9.

DZAJA, A., DALAL, M.A., HIMMERICH, H., UHR, M., POLLMACHER, T. & SCHULD, A. (2004). Sleep enhances nocturnal plasma ghrelin levels in healthy subjects. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **286,** E963-7.

FERNANDES, P.A., CECON, E., MARKUS, R.P. & FERREIRA, Z.S. (2006). Effect of TNF-alpha on the melatonin synthetic pathway in the rat pineal gland: basis for a 'feedback' of the immune response on circadian timing. *J Pineal Res*, **41,** 344-50.

FOER, J. & SIFFRE, M. (2008). Caveman: An Interview with Michel Siffre. *Cabinet Magazine*.

FOLKARD, S. (1986). Our diurnal nature. *Br Med J (Clin Res Ed)*, **293,** 1257-8.

GIGLIO, L.M., MAGALHAES, P.V., ANDERSEN, M.L., WALZ, J.C., JAKOBSON, L. & KAPCZINSKI, F. (2010). Circadian preference in bipolar disorder. *Sleep Breath*, **14,** 153-5.

GILBERT, S.S., VAN DEN HEUVEL, C.J. & DAWSON, D. (1999). Daytime melatonin and temazepam in young adult humans: equivalent effects on sleep latency and body temperatures. *J Physiol*, **514 (Pt 3),** 905-14.

GOLOMBEK, D.A., PEVET, P. & CARDINALI, D.P. (1996). Melatonin effects on behavior: possible mediation by the central GABAergic system. *Neurosci Biobehav Rev*, **20,** 403-12.

GORENSTEIN, C. & ANDRADE, L. (1996). Validation of a Portuguese version of the Beck Depression Inventory and the State-Trait Anxiety Inventory in Brazilian subjects. *Braz J Med Biol Res*, **29,** 453-7.

GREENWOOD, K.M. (1994). Long-term stability and psychometric properties of the Composite Scale of Morningness. *Ergonomics*, **37,** 377-83.

HALBERG, F. (1969). Chronobiology. *Annu Rev Physiol*, **31,** 675-725.

HEALY, D. & WATERHOUSE, J.M. (1995). The circadian system and the therapeutics of the affective disorders. *Pharmacol Ther*, **65,** 241-63.

HEALY, D. & WATERHOUSE, J.M. (1991). Reactive rhythms and endogenous clocks. *Psychol Med*, **21,** 557-64.

HIDALGO, M.P., CAUMO, W., POSSER, M., COCCARO, S.B., CAMOZZATO, A.L. & CHAVES, M.L. (2009). Relationship between depressive mood and chronotype in healthy subjects. *Psychiatry Clin Neurosci*, **63,** 283-90.

HORNE, J.A. & OSTBERG, O. (1976). A self-assessment questionnaire to determine morningness-eveningness in human circadian rhythms. *Int J Chronobiol*, **4,** 97-110.

ISHIHARA, K., MIYASITA, A., INUGAMI, M., FUKUDA, K., YAMAZAKI, K. & MIYATA, Y. (1985). Differences in the time or frequency of meals, alcohol and caffeine ingestion, and smoking found between 'morning' and 'evening' types. *Psychol Rep*, **57,** 391-6.

KATZENBERG, D., YOUNG, T., FINN, L., LIN, L., KING, D.P., TAKAHASHI, J.S. & MIGNOT, E. (1998). A CLOCK polymorphism associated with human diurnal preference. *Sleep*, **21,** 569-76.

KATZENBERG, D., YOUNG, T., LIN, L., FINN, L. & MIGNOT, E. (1999). A human period gene (HPER1) polymorphism is not associated with diurnal preference in normal adults. *Psychiatr Genet*, **9,** 107-9.

LAHIRI, D.K. & SCHNABEL, B. (1993). DNA isolation by a rapid method from human blood samples: effects of MgCl2, EDTA, storage time, and temperature on DNA yield and quality. *Biochem Genet*, **31,** 321-8.

LASA, L., AYUSO-MATEOS, J.L., VAZQUEZ-BARQUERO, J.L., DIEZ-MANRIQUE, F.J. & DOWRICK, C.F. (2000). The use of the Beck Depression Inventory to screen for depression in the general population: a preliminary analysis. *J Affect Disord*, **57,** 261-5.

LAVIE, P. (2001). Sleep-wake as a biological rhythm. *Annu Rev Psychol*, **52,** 277-303.

LEMMER, B. (2009). Discoveries of rhythms in human biological functions: a historical review. *Chronobiol Int*, **26,** 1019-68.

LEWY, A.J., SACK, R.L., MILLER, L.S. & HOBAN, T.M. (1987). Antidepressant and circadian phase-shifting effects of light. *Science*, **235,** 352-4.

MALDONADO, M.D., MURILLO-CABEZAS, F., CALVO, J.R., LARDONE, P.J., TAN, D.X., GUERRERO, J.M. & REITER, R.J. (2007). Melatonin as pharmacologic support in burn patients: a proposed solution to thermal injury-related lymphocytopenia and oxidative damage. *Crit Care Med*, **35,** 1177-85.

MARI, J.J. & WILLIAMS, P. (1986). A validity study of a psychiatric screening questionnaire (SRQ-20) in primary care in the city of Sao Paulo. *Br J Psychiatry*, **148,** 23-6.

MARKUS, R.P., BARBOSA JUNIOR, E.J.M. & FERREIRA, Z.S. (2003). Ritmos biológicos: entendendo as horas, os dias e as estações do ano. *Einstein,*, **1,** 143-8.

MARKUS, R.P., FERREIRA, Z.S., FERNANDES, P.A. & CECON, E. (2007). The immune-pineal axis: a shuttle between endocrine and paracrine melatonin sources. *Neuroimmunomodulation*, **14,** 126-33.

MARQUES, N. & MENNA-BARRETO, L. (2003). *Cronobiologia: princípios e aplicações*. São Paulo: Edusp - Editora da Universidade de São Paulo.

MIDDEKE, M., KLUGLICH, M. & HOLZGREVE, H. (1991). Circadian blood pressure rhythm in primary and secondary hypertension. *Chronobiol Int*, **8,** 451-9.

MIGNOT, E. & TAKAHASHI, J.S. (2007). A circadian sleep disorder reveals a complex clock. *Cell*, **128,** 22-3.

MINORS, D.S. & WATERHOUSE, J.M. (1981). Endogenous and exogenous components of circadian rhythms when living on a 21-hour day. *Int J Chronobiol*, **8,** 31-48.

MOORE-EDE, M.C. (1986). Physiology of the circadian timing system: predictive versus reactive homeostasis. *Am J Physiol*, **250,** R737-52.

MOORE, R.Y. (1997). Circadian rhythms: basic neurobiology and clinical applications. *Annu Rev Med*, **48,** 253-66.

MOORE, R.Y. (1980). Suprachiasmatic nucleus, secondary synchronizing stimuli and the central neural control of circadian rhythms. *Brain Res*, **183,** 13-28.

MORAES, C.Á., LEVANDOVSKI, R., DE SOUZA, C.M. & HIDALGO, M.P. (2011). Peripheral Temperature and Activity Rhythm in Shift Work. *in press*.

MOTOHASHI, Y. (1988). Sex difference in the morningness-eveningness preference in student and hospital nurse samples. *Ind Health*, **26,** 245-9.

NOGUERA, D.A., RIU, T.C., HORTENSI, J.V. & CUCURELLA, N.C. (2007). *Cronobiologia*. Porto Alegre: Editora Livre.

OHDO, S. (2007). Chronopharmacology focused on biological clock. *Drug Metab Pharmacokinet*, **22,** 3-14.

PARK, Y.M., MATSUMOTO, K., SEO, Y.J., SHINKODA, H. & PARK, K.P. (1998). Effects of aging on morningness-eveningness and sleep habits in Korean and Japanese workers. *Psychiatry Clin Neurosci*, **52,** 245-6.

PEDRAZZOLI, M., LING, L., FINN, L., KUBIN, L., YOUNG, T., KATZENBERG, D. & MIGNOT, E. (2000). A polymorphism in the human timeless gene is not associated with diurnal preferences in normal adults. *Sleep Res Online*, **3,** 73-6.

PEREIRA, D.S., TUFIK, S. & PEDRAZZOLI, M. (2009). [Timekeeping molecules: implications for circadian phenotypes]. *Rev Bras Psiquiatr*, **31,** 63-71.

PITTENDRIGH, C.S. (1960). Circadian rhythms and the circadian organization of living systems. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **25,** 159-84.

PONTES, G.N., CARDOSO, E.C., CARNEIRO-SAMPAIO, M.M. & MARKUS, R.P. (2006). Injury switches melatonin production source from endocrine (pineal) to paracrine (phagocytes) - melatonin in human colostrum and colostrum phagocytes. *J Pineal Res*, **41,** 136-41.

PONTES, G.N., CARDOSO, E.C., CARNEIRO-SAMPAIO, M.M. & MARKUS, R.P. (2007). Pineal melatonin and the innate immune response: the TNF-alpha increase after cesarean section suppresses nocturnal melatonin production. *J Pineal Res*, **43,** 365-71.

QIN, L.Q., LI, J., WANG, Y., WANG, J., XU, J.Y. & KANEKO, T. (2003). The effects of nocturnal life on endocrine circadian patterns in healthy adults. *Life Sci*, **73,** 2467-75.

RAHMAN, S.A., KOLLARA, A., BROWN, T.J. & CASPER, R.F. (2008). Selectively filtering short wavelengths attenuates the disruptive effects of nocturnal light on endocrine and molecular circadian phase markers in rats. *Endocrinology*, **149,** 6125-35.

REDFERN, P.H., WATERHOUSE, J.M. & MINORS, D.S. (1991). Circadian rhythms: principles and measurement. *Pharmacol Ther*, **49,** 311-27.

REINBERG, A.E., LEWY, H. & SMOLENSKY, M. (2001). The birth of chronobiology: Julien Joseph Virey 1814. *Chronobiol Int*, **18,** 173-86.

REPPERT, S.M. & WEAVER, D.R. (2001). Molecular analysis of mammalian circadian rhythms. *Annu Rev Physiol*, **63,** 647-76.

RIETVELD, W.J. (1996). General introduction to chronobiology. *Braz J Med Biol Res*, **29,** 63-70.

RODRIGUEZ, M.I., CARRETERO, M., ESCAMES, G., LOPEZ, L.C., MALDONADO, M.D., TAN, D.X., REITER, R.J. & ACUNA-CASTROVIEJO, D. (2007). Chronic melatonin treatment prevents age-dependent cardiac mitochondrial dysfunction in senescence-accelerated mice. *Free Radic Res*, **41,** 15-24.

ROENNEBERG, T., KUEHNLE, T., JUDA, M., KANTERMANN, T., ALLEBRANDT, K., GORDIJN, M. & MERROW, M. (2007). Epidemiology of the human circadian clock. *Sleep Med Rev*, **11,** 429-38.

ROENNEBERG, T., KUEHNLE, T., PRAMSTALLER, P.P., RICKEN, J., HAVEL, M., GUTH, A. & MERROW, M. (2004). A marker for the end of adolescence. *Curr Biol*, **14,** R1038-9.

ROENNEBERG, T. & MERROW, M. (2003a). The network of time: understanding the molecular circadian system. *Curr Biol*, **13,** R198-207.

ROENNEBERG, T., WIRZ-JUSTICE, A. & MERROW, M. (2003b). Life between clocks: daily temporal patterns of human chronotypes. *J Biol Rhythms*, **18,** 80-90.

ROSENTHAL, N.E., SACK, D.A., GILLIN, J.C., LEWY, A.J., GOODWIN, F.K., DAVENPORT, Y., MUELLER, P.S., NEWSOME, D.A. & WEHR, T.A. (1984). Seasonal affective disorder. A description of the syndrome and preliminary findings with light therapy. *Arch Gen Psychiatry*, **41,** 72-80.

SACK, R.L., AUCKLEY, D., AUGER, R.R., CARSKADON, M.A., WRIGHT, K.P., JR., VITIELLO, M.V. & ZHDANOVA, I.V. (2007). Circadian rhythm sleep disorders: part I, basic principles, shift work and jet lag disorders. An American Academy of Sleep Medicine review. *Sleep*, **30,** 1460-83.

SAVOIA, M.G. (1999). Escalas de eventos vitais e de estratégias de enfrentamento (Coping). *Rev Psiq Clin*, **26**.

SCHNEIDER, M.L.M., VASCONCELLOS, D.C., DANTAS, G., LEVANDOVSKI, R., CAUMO, W., ALLEBRANDT, K.V., HIDALGO, M.P.L. (2011). Morningness-eveningness, use of stimulants, and minor psychiatric disorder among undergraduate student. *Int J Psychol*, **46,** 18-23.

SMITH, C.S., REILLY, C. & MIDKIFF, K. (1989). Evaluation of three circadian rhythm questionnaires with suggestions for an improved measure of morningness. *J Appl Psychol*, **74,** 728-38.

SORIA, V. & URRETAVIZCAYA, M. (2009). [Circadian rhythms and depression]. *Actas Esp Psiquiatr*, **37,** 222-32.

SRINIVASAN, V., SPENCE, D.W., PANDI-PERUMAL, S.R., TRAKHT, I. & CARDINALI, D.P. (2008). Therapeutic actions of melatonin in cancer: possible mechanisms. *Integr Cancer Ther*, **7,** 189-203.

STUNKARD, A.J. & ALLISON, K.C. (2003). Two forms of disordered eating in obesity: binge eating and night eating. *Int J Obes Relat Metab Disord*, **27,** 1-12.

TAILLARD, J., PHILIP, P., CHASTANG, J.F. & BIOULAC, B. (2004). Validation of Horne and Ostberg morningness-eveningness questionnaire in a middle-aged population of French workers. *J Biol Rhythms*, **19,** 76-86.

TAKAHASHI, J.S., HONG, H.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,** 764-75.

TERMAN, M. & TERMAN, J.S. (2005). Light therapy for seasonal and nonseasonal depression: efficacy, protocol, safety, and side effects. *CNS Spectr*, **10,** 647-63; quiz 672.

TOH, K.L., JONES, C.R., HE, Y., EIDE, E.J., HINZ, W.A., VIRSHUP, D.M., PTACEK, L.J. & FU, Y.H. (2001). An hPer2 phosphorylation site mutation in familial advanced sleep phase syndrome. *Science*, **291,** 1040-3.

TORSVALL, L. & AKERSTEDT, T. (1980). A diurnal type scale. Construction, consistency and validation in shift work. *Scand J Work Environ Health*, **6,** 283-90.

VALDEZ, P., RAMIREZ, C. & GARCIA, A. (1996). Delaying and extending sleep during weekends: sleep recovery or circadian effect? *Chronobiol Int*, **13,** 191-8.

VASILIADIS, H.M., LESAGE, A., ADAIR, C., WANG, P.S. & KESSLER, R.C. (2007). Do Canada and the United States differ in prevalence of depression and utilization of services? *Psychiatr Serv*, **58,** 63-71.

WASSERTHEIL-SMOLLER, S., SHUMAKER, S., OCKENE, J., TALAVERA, G.A., GREENLAND, P., COCHRANE, B., ROBBINS, J., ARAGAKI, A. & DUNBAR-JACOB, J. (2004). Depression and cardiovascular sequelae in postmenopausal women. The Women's Health Initiative (WHI). *Arch Intern Med*, **164,** 289-98.

WATERHOUSE, J., BUCKLEY, P., EDWARDS, B. & REILLY, T. (2003). Measurement of, and some reasons for, differences in eating habits between night and day workers. *Chronobiol Int*, **20,** 1075-92.

WATERHOUSE, J., WEINERT, D., MINORS, D., FOLKARD, S., OWENS, D., ATKINSON, G., NEVILL, A. & REILLY, T. (2000). Estimates of the daily phase and amplitude of the endogenous component of the circadian rhythm of core temperature in sedentary humans living nychthemerally. *Biol Rhythm Res*, **31,** 88-107.

WEVER, R.A. (1979). Influence of physical workload on freerunning circadian rhythms of man. *Pflugers Arch*, **381,** 119-26.

WEVER, R.A. (1985). Use of light to treat jet lag: differential effects of normal and bright artificial light on human circadian rhythms. *Ann N Y Acad Sci*, **453,** 282-304.

WIRZ-JUSTICE, A. (2007). How to measure circadian rhythms in humans. *Medicographia*, **29,** 84-90.

WIRZ-JUSTICE, A., BENEDETTI, F., BERGER, M., LAM, R.W., MARTINY, K., TERMAN, M. & WU, J.C. (2005). Chronotherapeutics (light and wake therapy) in affective disorders. *Psychol Med*, **35,** 939-44.

WITTMANN, M., DINICH, J., MERROW, M. & ROENNEBERG, T. (2006). Social jetlag: misalignment of biological and social time. *Chronobiol Int*, **23,** 497-509.

WURTMAN, R.J. (2000). Age-related decreases in melatonin secretion--clinical consequences. *J Clin Endocrinol Metab*, **85,** 2135-6.

ZAVADA, A., GORDIJN, M.C., BEERSMA, D.G., DAAN, S. & ROENNEBERG, T. (2005). Comparison of the Munich Chronotype Questionnaire with the Horne-Ostberg's Morningness-Eveningness Score. *Chronobiol Int*, **22,** 267-78.

ZISAPEL, N. (1999). The use of melatonin for the treatment of insomnia. *Biol Signals Recept*, **8,** 84-9.

ARTIGOS ORIGINADOS

12 ARTIGOS ORIGINADOS

ARTIGO 1

Aceito para publicação Revista Chronobiology International - Índice de Impacto 3.987

12.1 Artigo 1

DEPRESSIVE SCORES ASSOCIATE WITH CHRONOTYPE AND SOCIAL JETLAG IN A RURAL POPULATION

Rosa Levandovski[1,2+], Giovana Dantas[1], Luciana Carvalho Fernandes[3], Wolnei Caumo[4], Iraci Torres[4], Till Roenneberg[2], Maria Paz Loayza Hidalgo[1], Karla V. Allebrandt[2+*]

[1]Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, Faculdade de Medicina, Departamento de Psiquiatria e Medicina Legal; Laboratório de Cronobiologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA)
[2]Ludwig-Maximilians-University of Munich, Department of Medical Psychology
[3]Centro Universitário UNIVATES
[4]Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Abstract

In public health, mood disorders are among the most important mental impairments. Patients with depressive episodes exhibit daily mood variations, abnormal patterns in sleep-wake behavior, and in the daily rhythms of several endocrine-metabolic parameters. Although the relationship between the sleep/circadian processes and mood disorders is poorly understood, clock-related therapies, such as of light therapy, sleep deprivation, and rigid sleep schedules have shown to be effective treatments. Several studies investigated the relationship between circadian phenotype (chronotype) and depression. These focused mainly on urban populations and assessed diurnal preferences (Morningness-Eveningness score). Here, we used the Beck Depression Inventory (BDI) in an essentially rural population (N = 4,051), and investigated its relation to circadian phenotypes (chronotype and social jetlag), assessed with the Munich Chronotype Questionnaire (MCTQ). In our study design we i) normalized both chronotype and BDI scores for age and sex (MSFsas and BDIas, respectively); ii) calculated individual social jetlag (misalignment of the biological and social time), and iii) investigated the relation of circadian phenotypes with BDI scores in a population homogeneous in respect to culture, socio-economic factors, and daily light exposure. 3.95% (N = 160) of the participants showed moderate to severe depressive BDI scores. Late chronotypes had a higher BDIas than intermediate and early types, which was independent of whether the participants were smokers. Both chronotype and BDIas correlated positively with social jetlag. BDIas was significantly higher in subjects with more than 2 h of social jetlag than in the rest of the population – again independent of smoking status. We also compared chronotype and social jetlag distributions between BDI categories (no, minimal, and mild to severe symptoms of depression) separately for men and women and for four age groups; specifically in the age

group 31-40, subjects with mild to severe BDI scores were significantly later chronotypes and suffered from higher social jetlag. Our results indicate that misalignment of circadian and social timing is a risk factor for developing depression, especially in middle age. Attempts to reduce social jetlag should therefore be part of prevention strategies.

Keywords: Chronotype, Depression, Social Jetlag, Circadian clock, Mood disorders, Sleep-wake behavior.

INTRODUCTION

The endogenous clock is responsible for the maintenance and coherence of the body's daily program and its synchronization with the light-dark cycle of the environment (Roenneberg and Merrow 2003; Roenneberg et al. 2003). The relationship between the circadian clock and health, as well as, daily modulations of pathological symptoms have been extensively documented (Foster and Wulff 2005 (Scheer, 2009; Ramsey and Bass 2009; Wulff et al. 2010; Yavuz et al, 2010). Patients with depressive episodes, for example, show daily mood variations, abnormal patterns in sleep-wake behavior, cortisol secretion, adrenocorticotropic hormone (ACTH), and daily modulation of others endocrine-metabolic parameters (Soria and Urretavizcaya 2009). Additionally, clock genes variants have been associated with abnormal sleep timing and mood disorders (for review see Wulff et al. 2010), indicating common pathways.

One of the first circadian hypothesis for major depressive disorders suggested that patients sleep at a significantly later circadian phase compared to healthy individuals (Wehr et al. 1979; Kripke 1984). Several follow-up studies showed that it is the individual circadian timing itself that is drastically delayed in patients with bipolar disorders (Giglio et al. 2009; Soreca et al. 2009), seasonal affective disorders (Elmore et al. 1993), or major depressive disorders (Drennan et al. 1991; Soria and Urretavizcaya 2009). SAD has also been associated with "internal" circadian misalignment (Lewy et al. 2006). Although the underlying mechanisms are poorly understood, they are clinically and therapeutically relevant, as evidenced by the antidepressant effects of light therapy, sleep deprivation, or rigid sleep schedules (Lewy et al. 1987; Terman and Terman 2005; Benedetti et al. 2007; Boivin et al,

1996; Zeitzer et al, 2000; Haynes et al, 2005). Circadian misalignment and sleep disruptions in patients with mood disorders have been also linked to abnormal daily pattern of gene expression, hormonal secretion, body temperature, cognitive, and behavioral functions (for review see Wulff et al. 2010). An additional indication of circadian misalignment contributing to depressive symptoms is the finding that individuals living in urban settings are more prone to depressive symptoms (Chelminski et al. 1999; Giannotti et al. 2002; Hidalgo et al. 2009). The circadian clock in urban populations is delayed compared to rural populations (Roenneberg and Merrow 2007), accentuating the discrepancies between social and biological time (Wittmann et al. 2006).

Mood disorders, especially those related to depression, are among the most prevalent mental impairments, it is therefore important to understand their etiology for improving their therapy and prevention. Even sub-clinical depressive symptoms, which are predictors of the onset of mood and anxiety disorders (Gentil et al. 2007), correlate with slow information processing, poor memory functioning (Simons et al. 2009) and cardiovascular dysfunction (Wassertheil-Smoller et al. 2004, Taillard et al, 1993). The prevalence of depression appears to be independent of cultural background: Canada 8.2%; United States 8.7%; Europe 8.6%; Southern Brazil 10% (Mari and Williams 1986) and is higher in urban populations, with a lifetime prevalence estimated to be 25.1% (18.5% for man and 31.5% for women) (Patten 2007).

Given the importance of sub-clinical depressive symptoms in public health, we screened a general population with the BECK depression inventory (Beck et al. 1996). Based on the hypotheses of circadian misalignment and on the finding that Eveningness (assessed by

the Morningness-Eveningness Questionnaire-MEQ, Horne and Ostberg 1976) has been proposed as a risk factor for depression, we investigated the relationship between circadian phenotypes (chronotype and social jetlag) with the BDI scores in a rural population (N = 4,051). Most prior studies investigating these relationships have focused on urban populations and assessed circadian timing as subjective daily preferences using MEQ-scores (Chelminski et al. 1999; Giannotti et al. 2002; Hidalgo et al. 2009, Shingo et al, 2010). Here, we investigated chronotype, social jetlag and depression scores in a rural population homogeneous in respect to culture, socio-economic factors, and daily light exposure. Characterization of chronotype and social jetlag were based on quantitative assessments of sleep/wake behavior by the Munich ChronoType Questionnaire (MCTQ). All variables were normalized for age, and sex.

METHODS

Study Population

Participants were locals of 12 counties in the Taquari Valley (Brazil); European descendents (Germans and Italians) who immigrated to this region between 1824 and 1870. The study was performed according to international ethical standards (Touitou et al. 2006; Portaluppi et al. 2010) between February 2008 to July 2010 (Ethics Approval number 08-087 GPPG/HCPA), and all participants signed an informed consent form.

From the initial 6,505 participants, 4,051 subjects (1,340 men and 2,711 women; mean age: 44.1 ± 13.4, ranging from 18 to 65 years) were included in this study. Exclusion criteria were: 1) incomplete information; 2) ages below 18 or above 65 years; 3) night shift work; 4) usage of an alarm clock on free days; 5) sleep duration shorter than three or longer than 14 hours, and 6) use of sleep or psychoactive medication (Supplementary Table 1).

The majority of the population works as farmers (N = 1,526; 38%), followed by house keeping (N = 839; 21%) and "informal jobs" (N = 605; 15%; defined as irregular, unregistered, temporary or part-time workers). The remaining 26% (N = 1,081) were factory workers, sales people, health-care or community workers, full-time students, retired, or job-less.

Instruments

Depression scores (BDI) and sleep-wake behavior (MCTQ) were assessed by trained interviewers using questionnaires.

The Beck Depression Inventory, BDI

The BDI (Beck et al. 1996) is a self-report scale assessing cognitive, affective, and somatic symptoms of depression (Lasa et al. 2000). It consists of 21 items, whereby each question is assigned to a score ranging from 0 (no symptoms) to 3 (severe symptoms of depression), with a final score between 0 and 63. The Portuguese version was validated in Brazil (Gorenstein and Andrade 1996). The BDI's screening categories are: 0-9 – no or minimal depressive symptoms; 10-16 – mild depressive symptoms; 17-9 – moderate depressive symptoms; and 30-63 – severe depressive symptoms (Lasa et al. 2000).

The Munich ChronoType Questionnaire, MCTQ

Chronotype was assessed with the Brazilian-Portuguese version of the Munich ChronoType Questionnaire (MCTQ; http://www.bioinfo.mpg.de/wepcronotipo). The calculated mid-sleep time on free days (MSF) of the MCTQ correlates well with the Horne-Ostberg Morningness-Eveningness Scale - MEQ (Zavada et al. 2005). The MEQ assesses subjective daily preferences and results in a Morningness-Eveningness score. These preferences are based on when people prefer to be active or to rest. It does not differentiate

between workdays and work-free days, and the questions emphasize subjects' rest/activity behavior in relationship to others.

In contrast, the MCTQ assesses actual sleep times (not bed times), separately for work- and free days and results in a time-of-day, the mid-sleep phase on free days (MSF), which correlates well with entrained circadian phase. As a refined chronotype assessment, MSF is corrected for sleep deficits accumulated during the work-week (Roenneberg and Merrow 2007). Subjects are asked to judge their sleep habits over the prior two weeks. MSFsc provides a quantitative measure of chronotype as a continuous, time-based variable (Allebrandt and Roenneberg 2008). The continuous distribution of MSFsc – with extreme early and late types on either end – is population-specific. The MCTQ assessed information allows to calculate "social jetlag", defined as a discrepancy between social and endogenous time (the absolute difference in hours between the uncorrected MSF and mid-sleep on work days, MSW (Wittmann et al. 2006). Average weekly outdoor light exposure ("without a roof above your head") was calculated by averaging the information for work- and free days over the week. In addition to the BDI and MCTQ questionnaires, we assessed the participants' smoking and alcohol consumption status, as well as, pesticide exposure (yes/no).

Data treatment

Both chronotype and BDI scores are age- and sex-dependent (Fig. 1A and B; Fig.2) and were therefore normalized based on the respective curve fits: (MSF_{sc}: $y = -2E\text{-}05x^3 + 0.0036x^2 - 0.2578x + 8.6317$ for men, and $y = -2E\text{-}05x^3 + 0.0038x^2 - 0.2299x + 7.3658$ for

women; BDI for the age range 18-29: $y = 0.014x^2 - 0.654x + 10.8$ for men and $y = 0.0322x^2 - 1.241x + 16.84$ for women; BDI for the age range 30-65: $y = - 0.0004x^3 + 0.0568x^2 - 2.4935x + 39.117$ for men and $y = - 0.0001x^3 + 0.0164x^2 - 0.6964x + 14.673$ for women. Fits for BDI were more precise when done separately (Fig. 1A) for the age groups of 18-29 years (women, N = 539, r2 = 1; men, N = 221, r2 = 1), and subjects older than 29 years (women, N = 2,172, r2 = 0.81; men, N = 1,119, r2 = 0.90). BDIas indicated how early or late individuals were in relation to the average population BDI values for a specific sex or age group. BDIas had a slightly skewed distribution and ranged from -35 to 77, and was therefore analyzed by non-parametric statistics.

The distribution of MSF_{sc} times was close to normal, ranging from 11 p.m. (-1) to 10:15 a.m. (10.25; mean 2.76 ± 1.17 h). Similar to the BDI scores, MSF and MSF_{sc} correlated with age in both sexes (women, N = 2,711, r2 = 0.84; men, N = 1,340, r2 = 0.93; Fig. 1B). MSFsas indicated how early or late individuals were in relation to the average population MSFsc values normalized for age and sex, ranging from - 4.38 to 6.49 (mean - 0.21 □ 1.18 h). MSFsas distribution was also close to normal. We conducted the normalizations not only based on means, as shown in the figures, but also on medians, which produced the same results (data not shown). For comparisons purposes, we defined 3 categories of MSFsas, each representing a third of the total population (early, N = 1,337; intermediate, N = 1,365, and late types, N = 1,349), as well as three groups of social jetlag (≤2 h, N = 3,674; 2-4 h, N = 320, and >4 h, N = 57). Similarly, we analyzed three categories of BDI scores (indicating no symptoms, minimal symptoms, and mild to severe symptoms) in their relationship to chronotype (MSFsc) and social jetlag. Analyses were conducted independently for women and men for 4 age groups (18-30, 241 men and 593 women; 31-40, 216 men and 520 women; 41-50, 286 men

and 631 women; and older than 50 years; 597 men and 967 women). We also assessed individual average daily light exposure and its relation to BDI scores, and the influence of smoking status on the relationships of MSFsas and social jetlag with BDIas.

Statistical analysis

For comparisons of frequency differences between categorical variables, we used chi-square. Variables with skewed or nearly skewed distributions (BDIas, BDI scores, social jetlag, light exposure, and MSF_{sas}) were analyzed with the following tests: *Spearman's* correlations; the Independent-Samples Median test; Mann-Whitney *U*-Test; and Kruskal-Wallis One-way ANOVA. The BDI_{as} distribution was compared between chronotype (MSF_{sas}) and social jetlag groups using the Kruskal-Wallis test. The MSFsc and social jetlag distributions were compared between BDI categories with the Kruskal-Wallis test and the Independent-Samples Median test. Data were analyzed using SPSS version 18.0 (SPSS, Chicago, IL). For all analyses, statistical significance was $p < 0.05$.

RESULTS

Approximately 84% of the sample population scored in the lowest category of the BDI scale (≤ 9 points), and only 3.95% scored 17 or more points (N = 160; moderate to severe depressive symptoms; Table 1). Alcohol consumption and pesticide exposure were not over-represented in the group scoring ≥ 10 points in relation to those with lower BDI scores (Total n = 3,417 vs. 634, alcohol consumers 42% vs. non-consumers 52% and pesticide users 37% vs. non-users 42%. There were however more smokers among subjects scoring ≥ 10 points than those with lower BDI scores (20% versus 12%; $\chi^2_{(df = 2)} = 32.5$, $p < 0.0001$).

BDI scores significantly increase with age (Mann-Whitney *U*-Test $p < 0.001$ for both sexes up to an age of 51; Fig. 2, with women scoring in average significantly higher in all age groups; Mann-Whitney *U*-Test, $p < 0.01$). BDI scores were independent of average daily light exposure in all age groups except for men older than 50, whose scores decreased with increasing light exposure (Kruskal-Wallis Test, $p = 0.006$). We therefore normalized the BDI scores for age and sex (BDIas, see Methods).

The BDI_{as} showed a positive correlation with the MSF_{sas} ($r = 0.149$; $p < 0.0001$; Fig. 3A). The BDI_{as} distribution differed significantly for early, intermediate and late tapes (Table 2). The significance of these relationships persisted when analyzed separately for smokers and non-smokers (N = 533; Kruskal-Wallis Test $\chi^2_{(df = 2)} = 15.6$, $p < 0.0001$, and N = 3,518, Kruskal-Wallis Test $\chi^2_{(df = 2)} = 69.8$, $p < 0.0001$; respectively). The BDI_{as} medians were higher for late chronotypes compared to intermediate and early types (Table 2; Median Test $\chi^2_{(df = 2)} = 77.7$, $p < 0.0001$).

Social jetlag showed a positive correlation with both MSF_{sas} ($r = 0.381$, $p < 0.0001$) and BDI_{as} ($r = 0.297$, $p < 0.0001$; Fig. 3B). BDI_{as} was significantly higher in subjects with more than 2 h of social jetlag than in the rest of the population (Table 2), independent of smoking status (Kruskal-Wallis Test – smokers: N = 533; $\chi^2_{(df = 2)} = 13.8$, $p = 0.001$; non-smokers: N = 3,518 $\chi^2_{(df = 2)} = 176$, $p < 0.0001$). Later the chronotype (MSF_{sas}) or higher the social jetlag, higher ranked the individuals in relation to BDI_{as} means (Table 2). While the association between BDI_{as} and social jetlag was significant in all three chronotype categories (early, N = 1,337; intermediate, N = 1,365; late, N = 1,349; Table 2), the association between BDI_{as} and chronotype (MSF_{sas}) was only significant in the lowest of the three social jetlag categories ($\leq$ 2 h, N = 3,674; 2-4 h, N = 320; > 4 h, N = 57; BDI_{as} -4.080 ± 17.81, Kruskal-Wallis Test $\chi^2_{(df = 2)} = 47.5$, $p < 0.0001$).

To complete the differential analysis of BDI, chronotype, and social jetlag, we investigated the association between chronotype and social jetlag for three BDI categories (no symptoms, N = 461; minimal symptoms, N = 2,956, and mild to severe symptoms of depression, N = 634), separately for men and women and for four age groups (see Methods); in order to control for age and sex differences. In the highest BDI category, both men and women had a significantly later MSFsc and more severe social jetlag than in the other two BDI categories, specifically in the age group of 31-40 years (Median test; $p < 0.05$ for both sexes; Table 3). Subjects with a social jetlag or MSFsc above the population median were over-represented in the group with mild to severe depression symptoms (Table 3). A comparison for all age groups of the MSFsc and social jetlag distributions in the different BDI categories again only showed significant differences for 31-40 year old participants. The

MSFsc distribution was significantly different between BDI categories for both women and men (Kruskal-Wallis Test; women: $\chi^2_{(df = 2)} = 8.1$, p = 0.017; men: $\chi^2_{(df = 2)} = 6.8$, $p = 0.034$). In this age group, the social jetlag distribution between BDI categories only differed in men (Kruskal-Wallis Test: $\chi^2_{(df = 2)} = 13.0$, p = 0.002). There were no discrepancies in sample size of the age groups investigated and the lowest number of observations per BDI categories, for the respective age groups, was 16 for men and 63 for women.

DISCUSSION

In our study population, BDI scores and chronotype correlated positively, as it has been reported before in an urban Brazilian population (Hidalgo et al. 2009). This is the first study however to show associations between BDI scores and social jetlag. Uniquely, the dependencies of the circadian phenotypes and BDI scores on age and sex were addressed and incorporated in our analyses.

Children are generally early chronotypes drastically delaying during puberty and adolescence (Roenneberg et al, 2004). At around the age of 20, people become progressively earlier chronotypes once again, with women being on average earlier than men up to the age of 50 (Roenneberg et al, 2004). These general tendencies were also true for our Brazilian study population, but the age at which men and women become similar chronotypes again was smaller (45 years). The prevalence of depressive symptoms increased significantly after the age of 50 in both sexes. But, on average, women had higher BDI scores than men, supporting earlier results (Camozzato et al. 2007). These age-dependencies of chronotype (Roenneberg et al, 2004) and depression (Soria and Urretavizcaya 2009) have been associated with hormonal changes. We therefore, addressed the confounding effects of age and sex on chronotype and BDI scores by our normalization procedure, or by testing hypotheses independently for women and men in four age groups. The relationship of BDI scores with the circadian phenotype (chronotype) or the misalignment of it (social jetlag) was specifically stronger for subjects 31 to 40 years old, indicating these relationships are age dependent.

Additionally, both circadian timing and depression have been shown to depend on light exposure (Roenneberg and Merrow, 2007; Roenneberg et al, 2007A; Benedetti et al. 2007;

McClung 2007) . We therefore also assessed how much time participants spend outdoors in daylight, which is up to thousand fold brighter than indoor lighting. Average outdoor light exposure of participants was similar for all BDI categories up to the age of 50, and at higher ages, only men showed a negative correlation between outdoor light exposure and BDI scores, i.e., could profit from brighter light. Most of our participants either worked as farmers or as housekeepers in a small rural community, indicating that they were exposed to more outdoor light throughout the year than urban populations. Indeed, the prevalence of moderate to severe depressive symptoms was less than half than in urban Brazilian populations from equivalent geographic locations (Mari and Williams 1986). Besides light exposure, the strong social networks and the socio-economic homogeneity, typical for small rural communities, may also play a role in keeping depressive symptoms low.

Smoking and drinking habits are also associated with the manifestation of depression symptoms (Wittmann et al. 2006; Pratt and Brody 2010; Schneider 2010), but it is more likely that these are coping strategies rather than causal variables of this association. An association between social jetlag and well-being was previously reported (Wittmann et al. 2006), and a subsequent re-analysis of the same data in relation to substance-use indicated that the increased psychological distress of late chronotypes correlated with their smoking and drinking habits (Wittmann et al. 2010). In our study, subjects who scored mild to severe depression symptoms indeed smoked more (but drank less alcohol) compared to subjects having lower BDI scores. However, nicotine consumption status had no impact on the association between BDIas and chronotype or social jetlag. Nevertheless, BDIas increased with social jetlag, independently of chronotype, indicating that circadian misalignment can contribute for mood disorders. Consistently with it, rigid sleep schedules were shown to have

an antidepressive effect in clinically depressed patients (Boivin et al, 1996; Zeitzer et al, 2000).

Confounders and exclusion criteria

In this essentially rural population pesticide handling is a common practices, and both acute and chronic pesticide exposure could contribute to the manifestation of depressive symptoms (Beseler et al. 2008). Symptoms of depression were, however, not more prevalent among subjects handling pesticides, indicating that this variable was not a confounder.

We applied exclusion criteria for phenotyping data quality control, as: i) for sleep/wake times to reflect endogenous time, subjects must report wake up times without the use of alarm clock on free days; ii) too short or too long sleep duration compromises sleep/wake times so that the mid-sleep measure becomes unreliable to estimate chronotype; iii) night shift-workers have their sleep/wake times dictated by their work schedule, so that even when having free days within a week, they will still suffer from the afterwards effects of being pushed against their endogenous time during the work days, and iv) chronotype changes strikingly throughout life (Roenneberg et al. 2007B). We excluded very young and elderly subjects to reduce heterogeneity of our sample. Additionally, we excluded subjects using sleep and psychoactive drugs to avoid interference with the sleep/wake cycle. Consequently we excluded (indirectly) subjects being treated for mood disorders, with minor implications for our study, as our goal was not to have a sample of clinically depressed subjects. We also are aware however that interviewing subjects, instead of using self-assessment, could influence the reliability of the

answers. Nevertheless, interviewers could help on the subject's interpretation of the questions, probably compensating the validity of the interview assessments in relation to self-assessment.

Conclusion

In summary, our results indicate that the misalignment of the circadian and social timing is a risk factor for developing depression, especially in 31 to 40 years olds, and suggest that a reduction of social jetlag should be part of prevention strategies.

Acknowledgments

We thank the graduate students Alicia Deitos, Ana Claudia Souza, Fabiane Dresch, Gabriela Laste, Janaina da Silveira (UNIVATES) and Andre Oliveira Marques Cristiane Koplin, Diego Fraga, Fabiana Guarienti, Jane Cronst Manoela Jornada (UFRGS) for their assistance in data collection and data management. We thank Prof. Hans Distel (LMU) for the fruitful discussions that contributed to improve this manuscript. This work was supported by PROBRAL/CAPES/Brazil, PNPD/CAPES/Brazil, FIPE/HCPA/Brazil, Propesq/UFRGS (M.P.H., R.M.L., and G.D.), UNIVATES (undergraduate scholarships), DAAD/Germany (KA) and EUCLOCK (KA,TR).

Conflict of Interest: Authors report no conflicts of interests.

REFERENCES

Allebrandt KV, Roenneberg T (2008) The search for circadian clock components in humans: new perspectives for association studies. Braz J Med Biol Res 41:716-21

Beck AT, Steer RA, Ball R, Ranieri W (1996) Comparison of Beck Depression Inventories -IA and -II in psychiatric outpatients. J Pers Assess 67:588-97

Benca R, Duncan MJ, Frank E, McClung C, Nelson RJ, Vicentic A (2009) Biological rhythms, higher brain function, and behavior: Gaps, opportunities, and challenges. Brain Res Rev 62:57-70

Benedetti F, Barbini B, Colombo C, Smeraldi E (2007) Chronotherapeutics in a psychiatric ward. Sleep Med Rev 11:509-22

Beseler CL, Stallones L, Hoppin JA, Alavanja MC, Blair A, Keefe T, Kamel F (2008) Depression and pesticide exposures among private pesticide applicators enrolled in the Agricultural Health Study. Environ Health Perspect 116:1713-9

Boivin DB, Duffy JF, Kronauer RE, Czeisler CA (1996) Dose-response relationships for resetting of human circadian clock by light. Nature. 8;379(6565):540-2

Camozzato AL, Hidalgo MP, Souza S, Chaves ML (2007) Association among items from the self-report version of the Hamilton Depression Scale (Carroll Rating Scale) and respondents' sex. Psychol Rep 101:291-301

Cermakian N, Boivin DB (2003) A molecular perspective of human circadian rhythm disorders. Brain Res Brain Res Rev 42:204-20

Chelminski I, Ferraro FR, Petros TV, Plaud JJ (1999) An analysis of the "eveningness-morningness" dimension in "depressive" college students. J Affect Disord 52:19-29

Drennan MD, Klauber MR, Kripke DF, Goyette LM (1991) The effects of depression and age on the Horne-Ostberg morningness-eveningness score. J Affect Disord 23:93-8

Elmore SK, Dahl K, Avery DH, Savage MV, Brengelmann GL (1993) Body temperature and diurnal type in women with seasonal affective disorder. Health Care Women Int 14:17-26

Foster RG, Wulff K (2005) The rhythm of rest and excess. Nat Rev Neurosci 6:407-14

Gentil V, Zilberman ML, Lobo D, Henna E, Moreno RA, Gorenstein C (2007) Clomipramine-induced mood and perceived performance changes in selected healthy individuals. J Clin Psychopharmacol 27:314-5

Giannotti F, Cortesi F, Sebastiani T, Ottaviano S (2002) Circadian preference, sleep and daytime behaviour in adolescence. J Sleep Res 11:191-9

Giglio LM, Magalhaes PV, Andersen ML, Walz JC, Jakobson L, Kapczinski F (2009) Circadian preference in bipolar disorder. Sleep Breath 14:153-5

Gorenstein C, Andrade L (1996) Validation of a Portuguese version of the Beck Depression Inventory and the State-Trait Anxiety Inventory in Brazilian subjects. Braz J Med Biol Res 29:453-7

Haynes PL, Ancoli-Israel S, McQuaid J (2005) Illuminating the Impact of Habitual Behaviors in Depression. Chronobiology International 22(2):279-297

Hidalgo MP, Caumo W, Posser M, Coccaro SB, Camozzato AL, Chaves ML (2009) Relationship between depressive mood and chronotype in healthy subjects. Psychiatry Clin Neurosci 63:283-90

Horne JA, Ostberg O (1976) A self-assessment questionnaire to determine morningness-eveningness in human circadian rhythms. Int J Chronobiol, 4(2):97-110

Kripke DF (1984) Critical interval hypotheses for depression. Chronobiol Int 1:73-80
Lasa L, Ayuso-Mateos JL, Vazquez-Barquero JL, Diez-Manrique FJ, Dowrick CF (2000) The use of the Beck Depression Inventory to screen for depression in the general population: a preliminary analysis. J Affect Disord 57:261-5
Lewy AJ, Lefler BJ, Emens JS, Bauer VK (2006) The circadian basis of winter depression. Proc Natl Acad Sci U S A 103:7414-9
Lewy AJ, Sack RL, Miller LS, Hoban TM (1987) Antidepressant and circadian phase-shifting effects of light. Science 235:352-4
Mari JJ, Williams P (1986) A validity study of a psychiatric screening questionnaire (SRQ-20) in primary care in the city of Sao Paulo. Br J Psychiatry 148:23-6
McClung CA (2007) Circadian genes, rhythms and the biology of mood disorders. Pharmacol Ther 114:222-32
Patten SB (2007) An animated depiction of major depression epidemiology. BMC Psychiatry 7:23
Portaluppi F, Smolensky MH, Touitou Y (2010) Ethics and methods for biological rhythm research on animals and human beings. Chronobiol Int 27:1911-29
Pratt LA, Brody DJ (2010) Depression and smoking in the U.S. household population aged 20 and over, 2005-2008. NCHS Data Brief:1-8
Ramsey KM, Bass J (2009) Obeying the clock yields benefits for metabolism. Proc Natl Acad Sci U S A 106:4069-70
Rea MS, Bierman A, Figueiro MG, Bullough JD (2008) A new approach to understanding the impact of circadian disruption on human health. J Circadian Rhythms 6:7
Roenneberg T, Kuehnle T, Pramstaller PP, Ricken J, Havel M, Guth A, Merrow M (2004) A marker for the end of adolescence. Curr Biol. 14(24):R1038-9
Roenneberg T, Kumar CJ, Merrow M (2007A) The human circadian clock entrains to sun time. Curr Biol 17(2):R44-5
Roenneberg T, Kuehnle T, Juda M, Kantermann T, Allebrandt K, Gordijn M, Merrow M (2007B) Epidemiology of the human circadian clock. Sleep Med Rev 11:429-38
Roenneberg T, Merrow M (2003) The network of time: understanding the molecular circadian system. Curr Biol 13:R198-207
Roenneberg T, Merrow M (2007) Entrainment of the human circadian clock. Cold Spring Harb Symp Quant Biol 72:293-9
Roenneberg T, Wirz-Justice A, Merrow M (2003) Life between clocks: daily temporal patterns of human chronotypes. J Biol Rhythms 18:80-90
Scheer FA, Hilton MF, Mantzoros CS, Shea SA (2009) Adverse metabolic and cardiovascular consequences of circadian misalignment. Proc Natl Acad Sci 106(11):4453-8
Schneider MLM, Vasconcellos, D.C., Dantas, G., Levandovski, R., Caumo, W., Allebrandt, K.V., Hidalgo, M.P.L. (2010) Morningness-eveningness, use of stimulants, and minor psychiatric disorder among undergraduate student. Int J Psychol in press
Shingo Kitamura, Akiko Hida, Makiko Watanabe, Minori Enomoto, Sayaka Aritake-Okada, Yoshiya Moriguchi, Yuichi Kamei, Kazuo Mishima (2010) Evening preference is related to the incidence of depressive states independent of sleep-wake conditions. Chronobiology International 27 (9-10):1797-1812
Simons CJ, Jacobs N, Derom C, Thiery E, Jolles J, van Os J, Krabbendam L (2009) Cognition as predictor of current and follow-up depressive symptoms in the general population. Acta Psychiatr Scand 120:45-52

Soreca I, Fagiolini A, Frank E, Goodpaster BH, Kupfer DJ (2009) Chronotype and body composition in bipolar disorder. Chronobiol Int 26:780-8
Soria V, Urretavizcaya M (2009) [Circadian rhythms and depression]. Actas Esp Psiquiatr 37:222-32.
Taillard J, Lemoine P, Boule P, Drogue M, Mouret J (1993) Sleep and Heart Rate Circadian Rhythm in Depression: The Necessity to Separate. Chronobiology International 10(1):63-72: 63-72

Terman M, Terman JS (2005) Light therapy for seasonal and nonseasonal depression: efficacy, protocol, safety, and side effects. CNS Spectr 10:647-63; quiz 672
Wassertheil-Smoller S, Shumaker S, Ockene J, Talavera GA, Greenland P, Cochrane B, Robbins J, Aragaki A, Dunbar-Jacob J (2004) Depression and cardiovascular sequelae in postmenopausal women. The Women's Health Initiative (WHI). Arch Intern Med 164:289-98
Wehr TA, Wirz-Justice A, Goodwin FK, Duncan W, Gillin JC (1979) Phase advance of the circadian sleep-wake cycle as an antidepressant. Science 206:710-3
Wittmann M, Dinich J, Merrow M, Roenneberg T (2006) Social jetlag: misalignment of biological and social time. Chronobiol Int 23:497-509
Wittmann M, Paulus M, Roenneberg T (2010) Decreased psychological well-being in late 'chronotypes' is mediated by smoking and alcohol consumption. Subst Use Misuse 45:15-30
Wulff K, Gatti S, Wettstein JG, Foster RG (2010) Sleep and circadian rhythm disruption in psychiatric and neurodegenerative disease. Nat Rev Neurosci 11:589-99
Yavuz Selvi, Adem Aydin, Murat Boysan, Abdullah Atli, Mehmed Yucel Agargun and Lutfullah Besiroglu (2010) Associations between chronotype, sleep quality, suicidality, and depressive symptoms in patients with major depression and healthy controls. Chronobiology International 27(9-10):1813-1828
Zavada A, Gordijn MC, Beersma DG, Daan S, Roenneberg T (2005) Comparison of the Munich Chronotype Questionnaire with the Horne-Ostberg's Morningness-Eveningness Score. Chronobiol Int 22:267-78
Zeitzer JM, Dijk D-J, Kronauer RE, Brown EN, Czeisler CA (2000) Sensitivity of the human circadian pacemaker to nocturnal light: Melatonin phase resetting and suppression. J Physiol 1;526 Pt 3:695-702

Figures legends

FIGURE 1 Distribution of MSFsc (A) and BDI (B) by age and sex. Filled circles = women, open circles = men; MSFsc = mid sleep on free days corrected for sleep debt (4 years bins); BDI = Beck Depression Inventory (5 years bins). Bars represent the standard error of the mean (SEM).

FIGURE 2 BDI average scores for women and men for different age groups in the study population.

FIGURE 3 MSF_{sas} (one hour intervals) and social jetlag (one hour intervals) plotted against BDI_{as} normalized values. BDI_{as} was higher among late types (A). MSF_{sas} = mid sleep on free days adjusted for sleep dept of work days, age and sex; BDI_{as} = Beck Depression Inventory adjusted for age and sex.

Figures

Figure 1

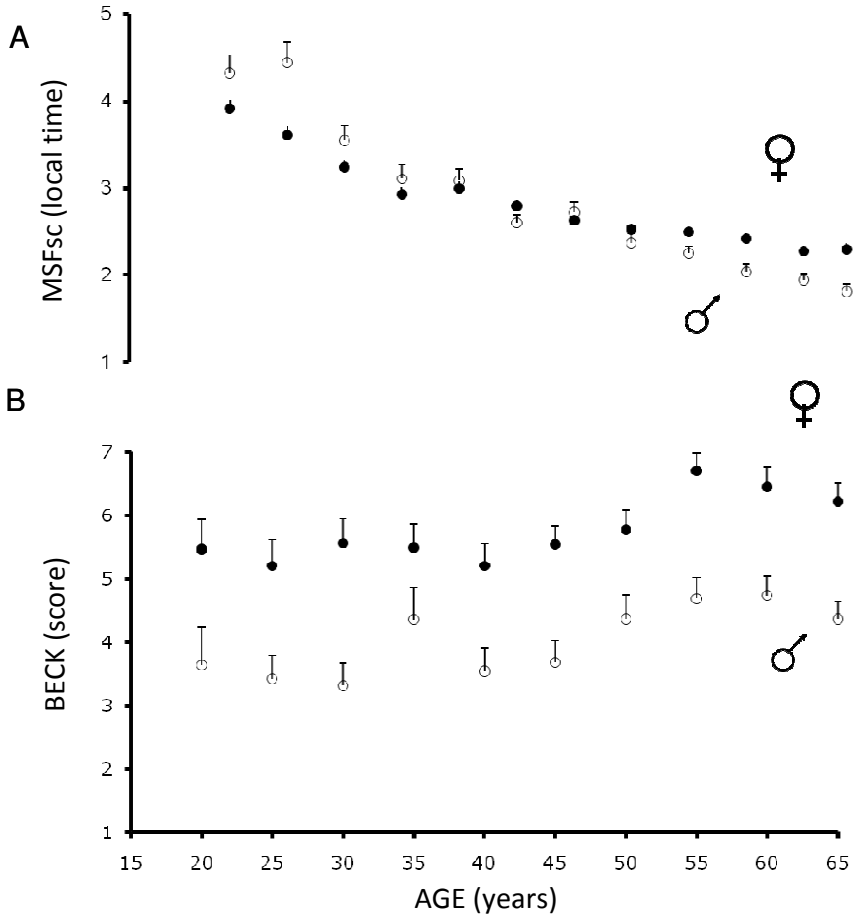


Figure 2

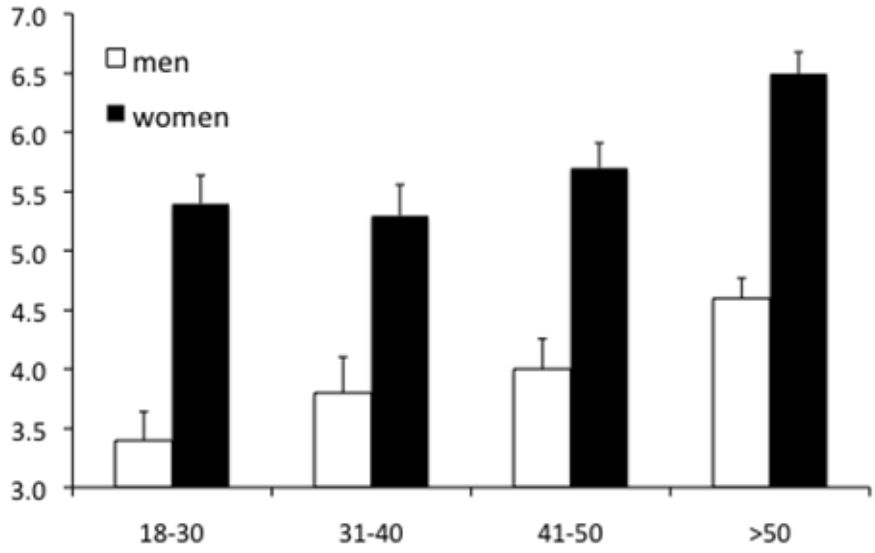
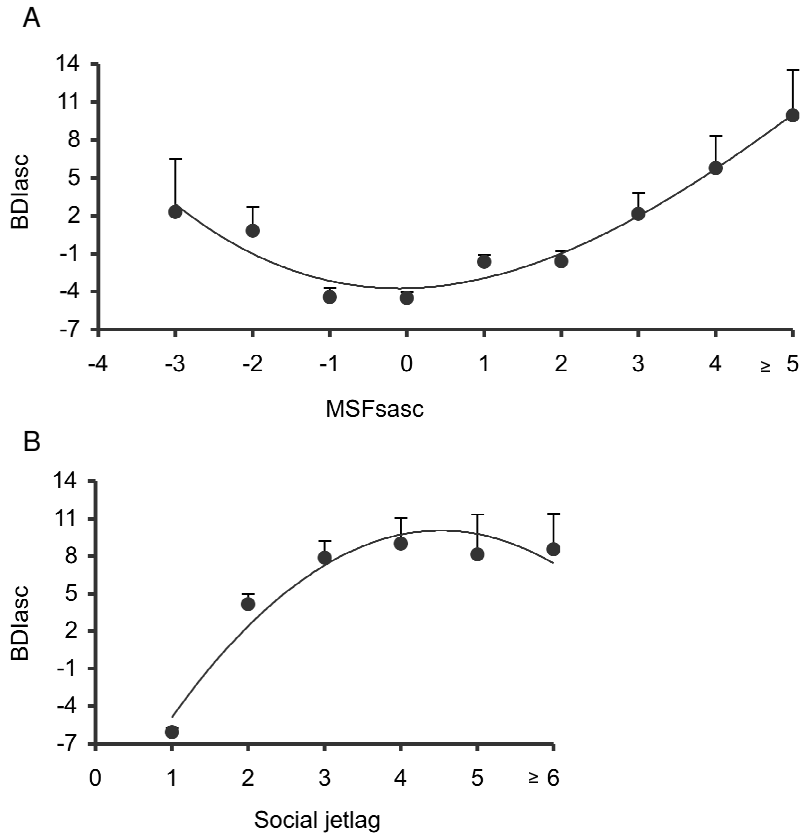


Figure 3


A
14
11
8
5
2
-1
-4
-7
BDIasc
-4
-3
-2
-1
0
1
2
3
4
≥ 5
MSFsasc
B
14
11
8
5
2
-1
-4
-7
BDIasc
0
1
2
3
4
5
≥ 6
Social jetlag

Tables

TABLE 1 Prevalence of depression symptoms in the study population accordingly to BDI scores.

Classification of BDI scores (points)	Men % (N)	Women % (N)	Total % (N)
Minimal or non-depression symptoms (< 10)	90.75 (1,216)	81.19 (2,201)	84.35 (3,417)
Mild depressive symptoms (10 to 16)	7.61 (102)	13.72 (372)	11.70 (474)
Moderate depressive symptoms (17 to 29)	1.42 (19)	4.39 (119)	3.41 (138)
Severe depressive symptoms (≥ 30)	0.22 (3)	0.70 (19)	0.54 (22)
Sum	33.08 (1,340)	66.92 (2,711)	100 (4,051)

BDI = Beck Depression Inventory.

TABLE 2 Independent Sample Kruskal-Wallis One-way ANOVA Test

Dependent variable: BDIas		**N**	**BDI_{as} mean**	**Mean rank**	**Chi-square**	**Sig.**
Grouping by chronotype (MSF_{sas})						
	Early type	1,337		1886		
	Intermediate type	1,365	-2.939 ± 18.32	1905	100.27	1.67 E-22
	Late type	1,349		2286		
Grouping by social jetlag (hours)						
	≤ 2 h	3,674		1945		
	> 2 h to 4 h	320	-2.939 ± 18.32	2779	189.19	8.26 E^{-42}
	> 4 h	57		2992		
Subpopulations of chronotypes / social jetlag						
Early type	≤ 2 h	1,310		663		
	> 2 h to 4 h	25	-4.062 ± 19.46	973	16.59	2.49 E^{-4}
	> 4 h	2a		905		
Intermediate type	≤ 2 h	1,311		668		
	> 2 h to 4 h	50	-4.550 ± 17.71	1034	46.22	9.15 E^{-11}
	> 4 h	4a		1111		
Late type	≤ 2 h	1,053		624		
	> 2 h to 4 h	245	-0.196 ± 17.46	841	85.55	2.64 E^{-19}
	> 4 h	51		934		

a = number of observations was too small for the statistics, but the groups ≤ 2 h and > 2 h to 4 hours were large enough to indicate differences in the BDIas distribution. BDIas = Beck Depression Inventory normalized for age and sex. Groups were defined as described on the methodology. MSFsas = mid sleep on free days adjusted for sleep dept of work days, age and sex.

TABLE 3 Independent samples median test statistics for men vs. women

Dependent variables (medians for men / women)	Grouping variable BDI scale (points)	No symptoms (0)	Minimal symptoms (1 – 10)	Mild to severe symptoms (> 10)	Chi-Square (2 df)	Asymp. Sig.
		Median test statistics: men (women)				
MSFsc (2.81 / 2.87)	> Median	14 (26)	83 (185)	11 (49)	7.322/ 6.562	0.026 / 0.038
	<= Median	28 (40)	75 (188)	5 (32)		
Social Jetlag (0.75 / 0.75)	> Median	9 (26)	86 (158)	9 (47)	14.929 / 7.389	0.001 / 0.025
	<= Median	33 (40)	72 (215)	7 (34)		

Median test statistics for men and women from age group = 31 to 40; Total N of men = 216, and women = 520; MSFsc = mid-sleep phase on free days adjusted for the sleep deficit accumulated during the work-week (local time). Social jetlag means were given in hours.

ARTIGO 2
REVISÃO SISTEMATICA

12.2 Artigo 2

CHRONOTYPE: ADVANTAGES, DISADVANTAGES AND APPLICABILITY OF THE MAIN SCALES USED IN THE LITERATURE - A REVIEW

Rosa Levandovski[1], Etianne Martini Sasso[1], Maria Paz Loayza Hidalgo[2]

[1]Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Faculdade de Medicina, Programa de Pós Graduação em Medicina: Ciências Médicas; Laboratório de Cronobiologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, Brazil.

[2]Professora do Departamento de Psiquiatria e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Coordenadora do Laboratório de Cronobiologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Brazil.

Abstract

The assessment of the phase of circadian rhythms is of particular relevance to understanding the temporal organization of the body's regulatory process. Interest in the study of individual typology differences has increased in the last years. As a result, new instruments have been developed in attempt to estimate the phase position of the individual human behavior characteristics. It is widely observed that individual differences in morningness reflect fundamental biological differences in the phase of physiological and biochemical circadian rhythms and, as a consequence, have been used as gold standards to validate those questionnaires. In attempt to understand this concept and to point out the difference and utility of the most used questionnaires, we conducted this review. The inclusion criterion adopted in this review was the presence of a questionnaire to measure chronotype or eveningness/morningness dimension or morningness/eveningness preferences in the abstract. The most used instruments to evaluate chronotype are the Morningness-Eveningness Questionnaire, or MEQ, and the Composite Scale of Morningness, or CSM. Other assessment tools have been developed, such as the Circadian Type Inventory and the Munich Chronotype Questionnaire, MCTQ. The individual circadian phase preferences, also called chronotype, are an attribute of human beings, which reflect whether they are alert and prefer to be active, early or late in the day. Phase differences reflect chronotype differences among individuals, and they have a normal distribution in a general population. In conclusion, the measurement of phase of entrainment, therefore, does not strictly measure chronotype; rather it is an estimation of it. Therefore, the chronotype is an indirect measurement of circadian rhythms defined in terms of the degree to which individuals prefer to be active during the day (phenotype).

Key words: Chronobiology, Circadian rhythm, Typology, Review

INTRODUCTION

Individuals differ in their sleep habits and their circadian preferences. Some individuals prefer to go to bed early and wake up early (Adan *et al.*, 2002), and others prefer to go to bed late and wake up late(Adan *et al.*, 2002). The assessment of the phase of circadian rhythms is of particular relevance to understanding the temporal organization of the body's regulatory process. Interest in the study of individual typology differences has increased in the last years, and as a result, new instruments have been developed to measure this typology.

Different questionnaires have been developed in attempt to estimate the phase position of individual behavior characteristics in humans. The most used instruments to evaluate chronotype are the Morningness-Eveningness Questionnaire, or MEQ (Horne *et al.*, 1976) and the Composite Scale of Morningness, or CSM (Caci *et al.*, 2009b; Smith *et al.*, 1989). Other assessment tools have been developed: the Circadian Type Inventory, (Folkard *et al.*, 1979) the Lark-Owl Chronotype Indicator, LOCI (Roberts *et al.*, 1999); and the Munich Chronotype Questionnaire, MCTQ (Roenneberg *et al.*, 2003b). Some physiological, biochemical, and psychological variables (such as mood, alertness, drowsiness, task performance, cortisol, etc.) show circadian rhythms and, as a consequence, have been used as gold standards to validate these questionnaires. It is widely observed that individual differences in morningness reflect fundamental biological differences in the phase of physiological and biochemical circadian rhythms (Kerkhof, 1985). Therefore, the chronotype is an indirect measurement of circadian rhythms defined in terms of the degree to which individuals prefer to be active during the day (phenotype). While these rhythms tend to be

fairly consistent across individuals, individual differences have been observed, which do not depend upon periodic influences from the environment.

To consider only the external influences on the internal rhythm, we would have to find the same pattern of rhythm in all individuals of the same environment. However, studies have shown a distribution pattern very close to a normal curve, thus this rhythmicity is thought to be mainly endogenous, although it can be disturbed by external conditions (i.e., night and shift work)(Caci *et al.*, 1999). In addition to that, the distribution observed using MEQ is likely to be biased by several factors, such as age, latitude, and social habits (Benedito-Silva *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 2002). As a consequence, many studies have pointed out that age and gender are both responsible for the difference observed in the results on morningness and eveningness throughout life. In adults, the trend toward morningness increases with age (Carrier *et al.*, 1997; Duffy *et al.*, 2002; Paine *et al.*, 2006; Park *et al.*, 1998; Reinberg *et al.*, 2001; Taillard *et al.*, 2004), and women show a greater trend toward morningness than men in their rhythm expression (Adan *et al.*, 2002).

The individual chronotype is a human trait, and its characterization is always based on self-reported preference in timing of activity and the personally preferred behavioral circadian rhythm. Some of the criticisms aimed at these questionnaires include the fact that the total score may not be appropriate to measure a multidimensional construct. With this in mind, new questionnaires have been developed. However, instead of solving this paradigm, we created more problems, since we now have many questionnaires to choose for measuring diurnal preference using different cutoff points. Moreover, the impact of the endogenous circadian oscillator, individual lifestyle, presence of some diseases and the consequence of it masking

effects on the circadian rhythms, and there is uncertainty about the impact on these measurements. In attempt to understand this concept and point out the difference and utility of the most used questionnaires, we conducted this review.

MATERIALS AND METHODS

To introduce the central theme of the present review, we searched for experimental, observational and double-blind controlled randomized clinical trials. We used the MEDLINE (1960 to January 2011) and Cochrane sites in our search strategy to locate the studies. Our language choices were English, Portuguese, Spanish, French and Italian. For this article compilation, we used the following keywords: 'morningness'; 'morning-type'; and 'chronotype'. We found 437 articles based on the above search approach. We excluded the articles that were retrieved in the search strategy at several levels, and this was the reason for the reduction in the number of articles. The inclusion criterion adopted was the presence of questionnaire to measure chronotype or eveningness/morningness dimension or morningness/eveningness preferences in the abstract (Table 1 summarizes the articles covering topics featured in the present review).

The Evolution of Circadian Typology Study

The twentieth century saw a great increase in interest in and research on all questions about biological rhythmicity. The numbers of studies have increased in the last years, as can be seen in Figure 1.

The first author considered as establishing the field of chronobiology is Julien-Joseph Virey, based on his doctoral thesis, completed in 1814. He pointed out that biological rhythms have to be innate in origin and controlled by living clocks entrained by periodic environmental changes, such as the day-night alternation in light and darkness (Reinberg *et al.*, 2001). The

beginning of modern research into chronotypes is attributed to O. Öquist, who wrote his thesis in 1970 entitled *Kartläggning av individuella dygnsrytmer*, or "Charting Individual Circadian Rhythms". Afterwards, Olov Östberg modified Öquist's questionnaire, and in 1976, together with Jim Horne, published the Morningness/Eveningness Questionnaire, MEQ (Horne *et al.*, 1976), which is still used and referred to in research on this topic. Researchers in many countries have worked on validating MEQ with regard to their local cultures (Paine *et al.*, 2006). Several other assessment tools have been subsequently developed: the Circadian Type Inventory (Folkard *et al.*, 1979); the Composite Scale of Morningness (Smith *et al.*, 1989); the Lark-Owl Chronotype Indicator, LOCI (Roberts *et al.*, 1999); and the Munich Chronotype Questionnaire, MCTQ (Roenneberg *et al.*, 2003b). Among these instruments, we chose the most widely noted in the literature to discuss in this review.

The concept of chronotype

Chronotype is an attribute of human beings reflecting the individual circadian phase that reveals what time of the day their physical functions, hormone levels, body temperature, cognitive faculties, eating and sleeping pattern are active, change or reach a certain level. Phase differences, measured in a period of 24 hours in these variables, reflect differences among individuals, called chronotype, and it has a normal distribution in a general population.

This phenomenon is commonly reduced to sleeping habits, referring to people as morning-type or evening-type. Usually, the morning-type is described as a person who wakes up early and is more alert in the first part of the day; on the other hand, the evening-type is

more alert at the beginning of the afternoon and would rather go to bed late at night. We can find in the literature another definition referring the term "chronotype" to sleep phase. According to this definition, a single phase reference point is used to determine the circadian rhythm's entrainment of the endogenous timing system to a period of 24 hours. The terms "early type" or "lark" are used to describe a person who usually gets up early in the morning and goes to bed early in the evening and the terms "late type" or "owl" for a person who has trouble falling asleep at night and getting up early during the day.

There is some discussion around the concept of chronotype in the literature (Roenneberg *et al.*, 2007b); some authors describe it as a phase of entrainment (the relationship between external and internal time), and when people differ in this trait, they are referred to as different chronotypes (Roenneberg *et al.*, 2007a). The argument is that the morningness-eveningness score represents preferences instead of the measurement of phase of entrainment and, therefore, does not strictly measure chronotype (Roenneberg *et al.*, 2007a). The differences in estimates of circadian rhythm parameters have been reviewed by Kerkhof (Kerkhof, 1985). He summarized studies where more than two measurements were made per day, which have explicitly taken into account the diurnal typification of their subjects. The presence or absence of differences between morningness or eveningness were evaluated using four different measures: the phase position of the peak value of the particular variable, the amplitude, the level and the shape of its temporal variation. According to this review, these differences for some of studies could only be estimated because of the method of analysis or because the study only partially covered the 24 hours of the day (Kerkhof, 1985). Thus, the determination of a chronotype should take into account the measurement of different rhythms in each subject. Even using different scales that have already been established up to this

moment, it is not possible to perform this measurement, and it only permits the indirect evaluation of the position of the stage at which each subject is in relation to others or an external rhythm. Therefore, chronotype is an indirect measurement of circadian rhythm (phenotype).

Development of this construct

The beginning of the scientific study of human circadian rhythms was marked by the observation made by Wuth in 1931, who distinguished two sleep patterns in individuals. The first one was described in individuals who are fatigued in the evening, go to bed early, soon fall asleep and aroused fully alert in the morning. The other type represented individuals who performed at their best in the evening, go to bed relatively late, and thus feel fatigued at waking time. Winterstein, in 1932, also observed that "evening sleepers" and "morning sleepers" responded differently to sleep constraints. The theoretical perspective of individual differences in circadian rhythm was established by Freeman & Hovland in 1934 and Kleitman in 1939, who had indentified two categories: morning and evening types, concluding that physiological variations during the 24-h circadian cycle affect task performance (Kerkhof, 1985). Folkard (Folkard *et al.*, 1979) has proposed that inter- individual differences in daily peak times of performance are not very evident and that the differences found by Freeman and Hovland and by Kleitman were only apparent because comparisons were mostly between the peak times of different types of psychological performance tasks rather than regarding intra-test comparisons. Daily human behavior has mainly been assessed by questionnaires designed to associate individuals with temporal preferences called''morningness–eveningness''.

Öquist, in 1970, developed a Swedish language morningness-eveningness questionnaire to distinguish between these two extremes. Östberg modified Öquist's questionnaire for use in a circadian rhythm study of food intake and oral temperature. Östberg in 1973 re-designed the questionnaire for use in a shift-work population. An English version of the Morningness - Eveningness Questionnaire was published by Horne and Östberg in 1976 (Horne *et al.*, 1976). The criterion of individual differences in the circadian variation of oral temperature was used by Horne and Östberg as an external validation of the Morningness-Eveningness Questionnaire (MEQ). They found that morning types had a significantly earlier peak time of oral temperature than evening types and also tended to have a higher daytime temperature and a lower post peak temperature. Afterwards, several other scales of morningness – eveningness have been developed, although MEQ still has widespread usage, as seen in the literature (Figure 2).

Horne and Ostberg Morningness/Eveningness Questionnaire (MEQ)

The first validated questionnaire developed to assess morningness-eveningness dimensions was developed by Horne and Ostberg in 1976 and was called the Morningness/Eveningness Questionnaire (MEQ) (Horne *et al.*, 1976). It was used to estimate phase tendencies in circadian rhythm from self-description, and was designed to identify morning and evening types.

MEQ consists of 19 questions in a Likert-type format regarding the time that individuals get up and go to bed, preferred times for physical and mental activity, and also the

subjective alertness of the individual. The questions asked are mostly subjective, relating sleep and activity times to a personal ‘‘feeling best rhythm’’, to the habits of others (e.g.,‘‘I get up later than most people’’), or to hypothetical situations (e.g.,‘‘Approximately, what time would you get up if you were entirely free to plan your day?’’). Some questions ask for given ranges of time (e.g., at what time in the evening do you feel tired and as a result in the need of sleep?). The degree of morningness/eveningness is expressed as a score showing individual preferences, which ranges from 16 to 86, the higher the score the stronger the morningness preference is. The original publication divided the score into five groups: definitely morning type (70-86), moderately morning type (59-69), neither type (42-58), moderately evening type (31-41), and definitely evening type (16 to 33). The external validation of MEQ has been made by measuring oral temperature using 150 people between 18 and 32 years. MEQ was originally validated (Horne *et al.*, 1976) in a young adult population (18-32 years), and subsequent surveys have confirmed a distribution that is skewed toward eveningness in this age group (Adan *et al.*, 2002; Chelminski *et al.*, 1999). In the validation, morning types showed a significantly earlier peak time of temperature than evening types, and the intermediate type had a peak temperature between these groups (Horne *et al.*, 1976).

With respect to sleep parameters, the evening type usually went to bed on overage 99 min later than the morning type; the morning type got up on overage 114 min earlier than the evening type. Bed time and waking time were both significantly correlated with morningness-eveningness (-0.67 and -0.79 respectively). The MEQ score was correlated with actual behavioral and physiological rhythmicity for body temperature (Baehr *et al.*, 2000; Duffy *et al.*, 2001), melatonin (Duffy *et al.*, 1999) and cortisol (Bailey *et al.*, 2001). In most studies, MEQ has been used to determine the tendency towards morning, evening, or neither type

(Archer *et al.*, 2003; Katzenberg *et al.*, 1998; Pedrazzoli *et al.*, 2000). A revision of the scoring of the MEQ was done by Jacques Taillard et al. in 2004, using people over the age of 50 (Taillard *et al.*, 2004). A bed time of 23:30 may be indicative of a morning type within a student population, but may be more related to an evening type in the 40-50 years age group.

Munich Chronotype Questionnaire (MCTQ)

The Munich Chronotype Questionnaire (MCTQ) was developed to assess individual sleep phase based on individual daily sleep times (Roenneberg *et al.*, 2003b). MCTQ asks people questions about their sleep times on work days and on free days separately. Chronotype is calculated based on the midpoint between sleep onset and waking up (mid-sleep) as the phase reference point for sleep on free days (MSF) on which there are no work or social obligations (Roenneberg *et al.*, 2004). As most subjects accumulate sleep debt on work days, except for the extreme early chronotypes, who compensate on free days, the mid-sleep times on free days need to be corrected for the sleep deficit accumulated during the work week (Roenneberg *et al.*, 2004).

According to the authors, MCTQ provides a quantitative measure of chronotype as a continuous variable, and not on sleep preferences (Allebrandt *et al.*, 2008). As a result, MSFsc is not categorical (based on scores), but has a population-specific continuous distribution, with early and late chronotypes on either tails of its distribution. Therefore, population specific thresholds can be defined to categorize chronotypes.

MCTQ was correlated (Zavada *et al.*, 2005) with MEQ (Horne *et al.*, 1976), showing that mid-sleep times assessed with MCTQ correlated well with the sleep preference score assessed with MEQ (r = -0.73). The main difference between these two instruments is that MEQ determines morningness or eveningness preferences, based on the time of the day that respondents say they prefer to allocate periods of activity and rest, rather than their effective sleep-wake times (Sack *et al.*, 2007), and MCTq assesses the mid-sleep phase of sleep on free days.

Composite Scale of Morningness (CSM)

The Composite Scale of Morningness (CSM) is an effort to extract the best items from three morningness questionnaires (Smith *et al.*, 1989). It is composed of 13 questions, in a Likert-type format, used to determine an individual's preference for different activities and how easy it is to wake up in the morning (e.g., times to get up and to go to sleep, how easy to rise at 06:00). The scale includes nine items from the Morningness/Eveningness Questionnaire (MEQ) (Horne *et al.*, 1976) and four items from the Diurnal Type Scale (DTS) (Torsvall *et al.*, 1980). The total CSM scores range from 13 to 55(Smith *et al.*, 1989). The original cutoffs points were set at the 10th and 90th percentiles and resulted in three categories according to the CS scores: evening types CS≤22; intermediate types 23≤CS≤43; and morning types CS≥44 (Smith *et al.*, 1989).

The internal consistency of CSM showed alpha =0.87 and demonstrated psychometric properties that are comparable to MEQ and DTS. CSM has good psychometric properties

when used with students or working samples. Additionally, the CSM scores were found to be stable over time and did not change when subjects were exposed to night and shift work. The scale reliability found in a French sample of nursing students (n = 356; mean age 25.60 ± 6.10; min 18 and max 54 yo) observed by Caci et al. (Caci *et al.*, 1999) was close to the values of 0.87 reported by Smith et al. (Smith *et al.*, 1989). Greenwood in Australia confirmed the good psychometric properties of CSM when used on samples of students or individuals working on rotating shifts (Greenwood, 1994).

Endogenous nature of morningness-eveningness

The endogenous nature of morningness-eveningness was demonstrated in several studies providing scientific evidence for the validity of the concept of diurnal type (Baehr *et al.*, 2000; Duffy *et al.*, 2001; Gibertini *et al.*, 1999; Kerkhof *et al.*, 1996; Mongrain *et al.*, 2004). Studies using selected morning type and evening type agree on the existence of differences in physiological and behavioral functions during early and late hours. Morning types tend to adopt an earlier sleep schedule and to show earlier diurnal peaks of alertness and performance (Kerkhof *et al.*, 1980). Physiological markers of the endogenous circadian rhythmicity, including body temperature and melatonin secretion rhythms, also show an earlier phase in morning type individuals compared to evening types (Baehr *et al.*, 2000; Bailey *et al.*, 2001; Duffy *et al.*, 1999). The morningness-eveningness questionnaire designed by Horne and Ostberg (Horne *et al.*, 1976) was evaluated against individual difference in the circadian variation of peak time of oral temperature, which was significantly correlated with the morningness-eveningness preferences. Kerkhof et al. (Kerkhof *et al.*, 1996) selected two

groups of subjects, morning types and evening types, and monitored during usual sleep-wake conditions and using a laboratory constant routine procedure. Under both conditions significant differences were observed in the circadian phases of body temperature and subjective alertness. The data for alertness showed evidence of a pronounced 24-h periodicity. The group difference in sleep-wake behavior, monitored using actigraphy, showed that the t_{max} (actigraphy) values significantly differed between the two groups and was correlated with the mid-sleep times (Spearman rank correlation 0.77 $P < 0.001$). The difference between the mean t_{max} for oral temperature of the two groups amounted to 4.6 h. A comparison between the t_{min} (rectal temperature) values of the morning types and evening types showed a mean difference of 2.6 h. In a constant routine (CR) the t_{min} (rectal temperature) occurred on average at 4:38 and 6:45 h for the morning types and evening types respectively. In this study, there was evidence that early phase and late phase individuals were correlated with the original morning type and evening type groups.

Gibertini et al. (Gibertini *et al.*, 1999) examined the relationship between circadian rhythm characteristics of the pineal hormone melatonin and individual differences in circadian type evaluated using CSM. Circadian type was strongly related to the melatonin acrophase but not to amplitude or time of year of assessment. Also, morning types evidenced a more rapid decline in melatonin levels after the peak than did evening types. Baehr et al. (Baehr *et al.*, 2000) observed that a later circadian temperature rhythm phase (Tmin) was associated with a later sleep schedule and greater eveningness on MEQ. The daily body temperature minimum occurred at about 4 a.m. for morning types but at about 6 a.m. for evening types. This minimum occurred at approximately the middle of the eight hour sleep period for morning types, but closer to waking in evening types. Evening types had a lower nocturnal temperature.

The temperature minimum occurred about a half hour earlier in women than in men. Duffy et al. (Duffy *et al.*, 2001) examined the relationship between the circadian timing system, intrinsic period, and two aspects of behavior: the preference for morning or evening activity patterns and the timing of usual awakening. They found a significant negative correlation between intrinsic circadian period and self-assessed morningness-eveningness score ($r = -0.60$, $p < 0.02$) and a significant positive correlation between intrinsic circadian period and usual wake time ($r = 0.50$, $p < 0.05$) and also between core body temperature phase ($r = 0.72$, $p < 0.03$), suggesting that this aspect of circadian physiology (intrinsic period) may play a role in determining these behavioral traits. Individuals with shorter periods will have circadian phases relatively early within their sleep-wake/ light-dark cycles, whereas those with longer periods will have phases relatively late within the sleep-wake/light-dark cycle. The circadian rhythm of sleep propensity in normal young men is such that the peak drive for sleep from the circadian pacemaker occurs near the core body temperature minimum (Dijk *et al.*, 1999). Morning types, whose core body temperature minimum occurs near the middle of the habitual sleep episode, are waking at a time when the drive from circadian timing system for sleep should be decreasing, whereas the circadian rhythms of alertness and performance are rising. In contrast, evening types are waking shortly after their core body temperature minimum, at a time when the drive for sleep from the circadian system should be high and the circadian rhythms of alertness and performance are low (Duffy *et al.*, 2001).

Circadian phase was estimated by Mongrain et al. (Mongrain *et al.*, 2004) in the chronobiology laboratory using two markers: core body temperature minimum (Tmin) and dim-light melatonin onset (DLMO). This study showed that MEQ correctly identified the individual preference for morning or evening activity, but this preference was related to two

different circadian patterns. In the non-overlapping subgroups, this preference was closely linked to the endogenous circadian phase, as usually expected. However, in the overlapping subgroups, this preference was independent of the endogenous circadian phase and should be related to some other characteristic of the regulation of the sleep-wake cycle. In both subgroups, the significant difference between MEQ scores, bedtimes, and wake times were maintained in the expected direction. In the subgroup with non-overlapping circadian phases, phase angles were shorter in evening type subjects, in accordance with previous studies. However, in the overlapping subgroup, phase angles were significantly longer in evening types compared to morning types. According to these results, the morningness-eveningness preference identified by the MEQ score refers to two distinct mechanisms: one associated with a difference in circadian period and phase of entrainment and the other associated with chronobiological aspects of sleep regulation.

There are individual differences in the human circadian system under stable circadian conditions, such as during experimental studies in which subjects lived isolated from external cues, and the rhythmicity of physiological variables persist with a period slightly deviating from 24 hours. However, through exposure to the daily cycle of light and dark, it is entrained to a 24-h period (Miller *et al.*, 1996). Therefore, rhythmicity is thought to be endogenous (in free running conditions the rhythms adopt their intrinsic period of around 25 hours). Along the same line, the observation of the disturbances of the circadian system during transmeridian air travel or during shift work, resulting in a phase shift in the internal variables in relation to external conditions, can be used as proof that these variables do not depend primarily on the periodic influences from the environment conditions. Under normal conditions, the

endogenous rhythm is entrained by the zeitgeber. Exogenous factors such as the level of physical activity influence the characteristics of rhythms (masking).

Limitations of the scales used to measure chronotypes

The term "chronotype" refers to the difference in phase and has been assessed mainly by questionnaires designed to associate individuals with tendencies that were coined "morningness" or "eveningness" (Horne *et al.*, 1976). The questions used are mostly subjective, relating sleep and activity times to a personal "feeling best rhythm" (Horne *et al.*, 1976), or they ask subjects to assess hypothetical situations (e.g.,"Considering only your own feeling best rhythm, at what time would you get up if you were entirely free to plan your day?") (Smith *et al.*, 1989). Additionally, "morningness" scores correlate with the experimentally measured timing of the individual's circadian rhythms, for example, temperature, melatonin, or cortisol (Bailey *et al.*, 2001; Dijk *et al.*, 1999; Duffy *et al.*, 2001). However, there are some criticisms about these scales, since they do not explicitly assess free days and workdays separately, nor do they ask for actual sleep times or exposure to outdoor light (Roenneberg *et al.*, 2003b). Therefore, a new questionnaire has been developed to quantitatively assess the timing of sleep within the 24-h day (sleep phase), arguing that it represents a qualitative assessment instead of subjective self-rating of chronotype as we can see in the other scales. Previously, Duffy et al. (Duffy *et al.*, 2001) investigated the relationship between intrinsic circadian period and diurnal preference (morning or evening activity patterns and the timing of usual waking). They found a significant correlation between intrinsic circadian period and both diurnal preference and usual wake time, and a significant negative

correlation between intrinsic circadian period and self-assessed morningness-eveningness score. Taking into account all this information, we can affirm that even the assessment of chronotype is done using subjective questions or using the timing of mid-sleep within the 24-h day, i.e., it gives an estimate of a person's phase. Along with considering an objective measurement of the internal phase, there is a need for an output of the circadian clock that can be consistently measured by novel techniques such as those now under development which can measure the τ of clock gene expression in tissue cultures from skin biopsies (Brown *et al.*, 2005).

To date, the most commonly used questionnaire concerning daily preference is the Morningness/Eveningness Questionnaire (MEQ). However, the MEQ score does not seem to be consistent when investigating samples of different age. The cutoffs determined in the original publication (Horne *et al.*, 1976) are based on a sample of young people (18 and 32 years). Recently, Taillard et al. (Taillard *et al.*, 2004) validated the MEQ in a middle aged population of French workers (mean of age: 51.2 SD 3.2 years). They actually found that only three groups can be defined from this sample and they suggested new cutoffs to determine groups (Evening type: ≤ 52, Neither type: 53 – 64, Morning type: ≥ 65). The MEQ score thus seems to be inconsistent between younger and older age groups and also between populations (Caci *et al.*, 2005a). Thus, the use of percentiles as cut-off is arbitrary, and according to the sample, it is possible that the same subject can be classified as a different type according to the distribution of the sample. When Paine et al. (Paine *et al.*, 2006) compared the frequency of morningness-eveningness using the MEQ criteria of Horne and Ostberg (Horne *et al.*, 1976), morning types predominated, whereas the MEQ criteria of Taillard et al. (Taillard *et al.*, 2004) provided a more balanced population distribution of chronotypes. After controlling for

ethnicity, gender, and socio-economic status, participants aged 30 to 34 years were more likely to be definitively evening type ($p < 0.05$) and less likely to be morning type ($p < 0.01$, or definitively morning type, $p < 0.05$) compared to those aged 45 to 49 years. Using the criteria of Horne and Ostberg (Horne *et al.*, 1976), 49.8% of the total population were morning types (10.2% definitively morning type), while only 5.6% had an evening type preference (0.7% definitively evening type), and 20.2% evening type. Using these new score cutoffs proposed by Taillard et al. (Taillard *et al.*, 2004), the prevalence estimates suggest that approximately one quarter of the population ages 30 to 49 years report either a morning type preference (24.7%, 10.19% definitively morning type) or an evening type preference (26.4%, 11.50% definitively evening type) (Paine *et al.*, 2006). Caci et al. (Caci *et al.*, 2009b) as well compared the frequencies of the three-category chronotypes using criteria proposed by the authors of MEQ (below 42, 42-58, above 58), rMEQ (below 12, between 12 and 17, above 17), and CSM (10th percentile/90th percentile). Using CSM and MEQ, the proportions of subjects similarly categorized were 95.0%, 75.3% and 85.7% for Evening-type, Neither-type and Morning-type subjects, respectively. Probably because CSM was based on MEQ, there is then a high probability of overestimation. Using the CSM and the rMEQ, the proportions were 95.0%, 74.1% and 53.1%; and using the MEQ and the rMEQ, the proportions were 84.6%, 84.4% and 45.8%. This study emphasizes the recurrent problem of cutoff scores: the available values for both instruments (MEQ and CSM) result in a very poor concordance of chronotypes. Therefore, this casts serious doubt on the coarsely categorized scores used to reflect the position of an individual along the morningness continuum (Caci *et al.*, 2009b).The problem related to a classification can be attributed to the sample distribution, as was observed in Greenwood's work using CSM (Greenwood, 1994). The sample was negatively skewed (-0.22 $p<0.05$),

indicating that the distribution differed significantly from normal, and consequently, it does have an influence on the proportion of individuals classified as being evening, intermediate or morning types. Using the original CSM scores suggested by Smith (Smith *et al.*, 1989), the cutoffs resulted in 2.4% evening types; 84.4% intermediate types and 13.2% morning types (Greenwood, 1994). Hence, normative scores standardized in such a way that they reflect the effects of age, gender and culture are needed for the total score and the factor scores (Caci *et al.*, 2009b).

Another problem is related to the assessment of chronotype in shift work. Depending on schedules applied, people have to change their sleeping habits weekly by several hours, and consequently the measurement of diurnal preference may be masked by work activity. Additionally, the psychometric adequacy of this scale is questionable (Smith *et al.*, 1989). Torsvall and Akerstedt (Torsvall *et al.*, 1980) constructed a shift work scale based on sleep preferences (on free and work days). One of the criticisms by Torsvall and Akerstedt (Torsvall *et al.*, 1980) on this topic is that MEQ has items that are inappropriate for workers on irregular schedules. The external validity of the Horne and Ostberg (Horne *et al.*, 1976) questionnaire used a self-report (e.g., perceived alertness) and objective (e.g., oral temperature) measures; however, it does not take in to account the masking effect caused by work schedule activity.

The MEQ score distributions also showed cultural influences. The mean scores were significantly different between Japanese and Korean workers. The mean score of MEQ in Japanese workers (56.2) was statistically higher than Korean workers (49.1) in all age groups and is likely to be the result of the difference in social conditions and culture between the two countries (Park *et al.*, 1998). Adan et al. (Adan *et al.*, 2005) studied CSM in a Spanish sample of

students, and reported that the subjects were classified as evening-type using scores lower or equal to 21, as neither-type, scores between 22 and 39, and as morning-type, scores greater or equal to 40. This research proposed that new criteria should be applied, such as the 20th and 80th percentiles to select moderate evening-type and morning-type, respectively.

Meal timing is considered an important socio-environmental synchronizer of circadian rhythms and influences human metabolism; the temporal distribution of food intake also has an influence on human performance. Costa et al. (1987) have determined the usual mealtimes during work and free days in a population of 670 subjects. The times of the two main meals showed a high stability, both on work and free days. However, they found a progressive advance of the breakfast time. Morning types anticipate meal and sleeping times in comparison to evening types, both while working and, above all, on free days.

The diurnal evolution of alertness can be influenced by the degree of morningness. The Morning-types and evening-types were studied in young and good sleepers. They differed only during the morning: evening-types rated lower self-alertness on waking than did morning-types (Clodore *et al.*, 1987). Subjective and objective sleepiness is greater in evening-type subjects than in morning-type subjects, especially in the morning (Andrade *et al.*, 1992; Baehr *et al.*, 2000; Clodore *et al.*, 1987; Ishihara *et al.*, 1985; Taillard *et al.*, 2001; Volk *et al.*, 1994).

The influence of age on the distribution of MEQ scores was observed by Carrier et al. (Carrier *et al.*, 1997). They concluded that morningness-eveningness was significantly correlated with age, with increasing age associated with higher morningness levels. There is evidence for changes associated with development and aging. Delayed sleep times common among

teenagers are thought to be attributable, at least in part, to developmental changes in the mechanisms regulating sleep timing (Carskadon *et al.*, 1993). Conversely, there is a trend for people to become more morning types in later adulthood (Carrier *et al.*, 1997), typically beginning at around age 50 years.

The sex difference should be taken into account for morningness-eveningness studies in workers. A significant difference was found between male and female students (Motohashi, 1988). It appears that the irregular working schedule did not affect the morningness-eveningness preference in the hospital nurse sample. As shown by Motohashi (Motohashi, 1988) and reported by Ishihara et al. (Ishihara *et al.*, 1985), female populations seem to be more the morning type than male populations. Therefore, sex difference should be taken into account for morningness-eveningness studies in workers.

CONCLUSION

The individual circadian phase preferences, also called chronotype, are an attribute of human beings; they reflect whether they are alert and prefer to be active, early or late in the day. Phase differences reflect chronotype differences among individuals, and they display a normal distribution in a general population. Most people are neither evening nor morning types but lie somewhere in between with extreme morning and evening types. MEQ is a well-documented questionnaire and the one most widely used in chronobiology and sleep research. Even though MEQ has been validated against biologic variables and sleep diaries of morning and evening participants, it is still criticized, and alternative measures have been developed. Nevertheless, it has shown to have adequate internal consistency properties (Chelminski *et al.*, 1999; Smith *et al.*, 1989). The Torsvall and Akerstedt questionnaire (Torsvall *et al.*, 1980) and the Folkard, Monk, and Lobban questionnaire (Folkard *et al.*, 1979) did not show better results in terms of psychometric evaluation (internal and inter-item measurement properties) than the MEQ initially did (Smith *et al.*, 1989). The composite questionnaire (Smith *et al.*, 1989) gave a better psychometric evaluation than did MEQ. To our knowledge, the composite questionnaire has never been validated by physiological markers of the biological clock. The final criticism of MEQ is its length. Adan and Almirall (Adan *et al.*, 1992) developed a shortened MEQ (5 items) that has adequate inter-item correlations (Chelminski *et al.*, 1999). However, it was validated in a population mostly comprising young students. Paine (Paine *et al.*, 2006) concurs with Taillard (Taillard *et al.*, 2004) that the original MEQ cutoffs (Horne *et al.*, 1976) do not provide a useful definition of chronotypes in middle-aged adults. The Munich

Chronotype Questionnaire (MCTQ) (Roenneberg *et al.*, 2003b) is a new method assessing chronotype using a self-reported time of mid-sleep during work and free days. The sleep habits of evening types described in previous studies using MEQ (Taillard *et al.*, 1999; Taillard *et al.*, 2001) coincide in many respects with those found by MCTQ (Zavada *et al.*, 2005). However, this new instrument has some limitations. The first refers to the need of strict criteria for exclusion from the sample, which does not allow for widespread use in all populations. Second, the calculations used to assess the stage of sleep and sleep debt for corrections necessary before obtaining the final ranking of the individual, along with the dependence of population distribution make it difficult to be used in studies which the distribution is unknown. Also, it is not yet validated in a shift work samples. Variability of scores across age distributions and irregular schedules needs to be accounted to choose the adequate instrument to measure chronotype. Depending of the subject of the study, sometimes only one question based on the self-evaluation of chronotype would seem to be able to classify the participants efficiently on the morning/evening continuum. With this type of classification, Roenneberg et al. (Roenneberg *et al.*, 2003b) found more evening types than morning types in a general population. The use of percentiles as cutoff is arbitrary, and according to the sample, it is possible that the same subject can be classified as a different type according to the distribution of the sample. In conclusion, the measurement of phase of entrainment , therefore, does not strictly measure chronotype; rather it is an estimation of it. In addition, the term chronotype does not strictly refer to the sleep phase.

REFERENCES

Adan A (1994) Chronotype and personality factors in the daily consumption of alcohol and psychostimulants. *Addiction* 89:455-462.

Adan A and Almirall H (1992) The influence of age, work schedule and personality on morningness dimension. *Int J Psychophysiol* 12:95-99.

Adan A, Caci H and Prat G (2005) Reliability of the Spanish version of the Composite Scale of Morningness. *Eur Psychiatry* 20:503-509.

Adan A, Fabbri M, Natale V and Prat G (2006) Sleep Beliefs Scale (SBS) and circadian typology. *J Sleep Res* 15:125-132.

Adan A, Lachica J, Caci H and Natale V (2010a) Circadian typology and temperament and character personality dimensions. *Chronobiol Int* 27:181-193.

Adan A and Natale V (2002) Gender differences in morningness-eveningness preference. *Chronobiol Int* 19:709-720.

Adan A, Natale V, Caci H and Prat G (2010b) Relationship between circadian typology and functional and dysfunctional impulsivity. *Chronobiol Int* 27:606-619.

Ahn YM, Chang J, Joo YH, Kim SC, Lee KY and Kim YS (2008) Chronotype distribution in bipolar I disorder and schizophrenia in a Korean sample. *Bipolar Disord* 10:271-275.

Allebrandt KV and Roenneberg T (2008) The search for circadian clock components in humans: new perspectives for association studies. *Braz J Med Biol Res* 41:716-721.

Amschler DH and McKenzie JF (2005) Elementary students' sleep habits and teacher observations of sleep-related problems. *J Sch Health* 75:50-56.

An M, Huang J, Shimomura Y and Katsuura T (2009) Time-of-day-dependent effects of monochromatic light exposure on human cognitive function. *J Physiol Anthropol* 28:217-223.

Andrade MM, Benedito-Silva AA and Menna-Barreto L (1992) Correlations between morningness-eveningness character, sleep habits and temperature rhythm in adolescents. *Braz J Med Biol Res* 25:835-839.

Antunes Lda C, da Jornada MN, Ramalho L and Hidalgo MP (2010) Correlation of shift work and waist circumference, body mass index, chronotype and depressive symptoms. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 54:652-656.

Archer SN, Robilliard DL, Skene DJ, Smits M, Williams A, Arendt J and von Schantz M (2003) A length polymorphism in the circadian clock gene Per3 is linked to delayed sleep phase syndrome and extreme diurnal preference. *Sleep* 26:413-415.

Archer SN, Viola AU, Kyriakopoulou V, von Schantz M and Dijk DJ (2008) Inter-individual differences in habitual sleep timing and entrained phase of endogenous circadian rhythms of BMAL1, PER2 and PER3 mRNA in human leukocytes. *Sleep* 31:608-617.

Ayalon L, Borodkin K, Dishon L, Kanety H and Dagan Y (2007) Circadian rhythm sleep disorders following mild traumatic brain injury. *Neurology* 68:1136-1140.

Bae SM, Park JE, Lee YJ, Cho IH, Kim JH, Koh SH, Kim SJ and Cho SJ (2010) Gender difference in the association between adult attention deficit hyperactivity disorder symptoms and morningness-eveningness. *Psychiatry Clin Neurosci* 64:649-651.

Baehr EK, Revelle W and Eastman CI (2000) Individual differences in the phase and amplitude of the human circadian temperature rhythm: with an emphasis on morningness-eveningness. *J Sleep Res* 9:117-127.

Bailey SL and Heitkemper MM (1991) Morningness-eveningness and early-morning salivary cortisol levels. *Biol Psychol* 32:181-192.

Bailey SL and Heitkemper MM (2001) Circadian rhythmicity of cortisol and body temperature: morningness-eveningness effects. *Chronobiol Int* 18:249-261.

Barbosa FF and Albuquerque FS (2008) Effect of the time-of-day of training on explicit memory. *Braz J Med Biol Res* 41:477-481.

Barclay NL, Eley TC, Buysse DJ, Archer SN and Gregory AM (2010a) Diurnal preference and sleep quality: same genes? A study of young adult twins. *Chronobiol Int* 27:278-296.

Barclay NL, Eley TC, Maughan B, Rowe R and Gregory AM (2010b) Associations between diurnal preference, sleep quality and externalizing behaviours: a behavioural genetic analysis. *Psychol Med* 41:1029-1040.

Benedito-Silva A, Menna-Barreto L, Cipolla-Neto J, Marques N and Tenreiro S (1998) Latitude and social habits as determinants of the distribution of morning and evening types in Brazil. *Biol Rhythm Res* 29.

Blomeke B, Golka K, Griefahn B and Roemer HC (2008) Arylalkylamine N-acetyltransferase (AANAT) genotype as a personal trait in melatonin synthesis. *J Toxicol Environ Health A* 71:874-876.

Bohle P and Tilley AJ (1989) The impact of night work on psychological well-being. *Ergonomics* 32:1089-1099.

Bohle P and Tilley AJ (1993) Predicting mood change on night shift. *Ergonomics* 36:125-133.

Bohle P, Tilley AJ and Brown S (2001) Psychometric evaluation of the early/late preferences scale. *Ergonomics* 44:887-900.

Borisenkov MF, Perminova EV and Kosova AL (2010) Chronotype, sleep length, and school achievement of 11- to 23-year-old students in northern European Russia. *Chronobiol Int* 27:1259-1270.

Broms U, Kaprio J, Hublin C, Partinen M, Madden PA and Koskenvuo M (2010) Evening types are more often current smokers and nicotine-dependent-a study of Finnish adult twins. *Addiction* 106:170-177.

Brown FM (1993) Psychometric equivalence of an improved Basic Language Morningness (BALM) scale using industrial population within comparisons. *Ergonomics* 36:191-197.

Brown SA, Fleury-Olela F, Nagoshi E, Hauser C, Juge C, Meier CA, Chicheportiche R, Dayer JM, Albrecht U and Schibler U (2005) The period length of fibroblast circadian gene expression varies widely among human individuals. *PLoS Biol* 3:e338.

Bruni O, Russo PM, Ferri R, Novelli L, Galli F and Guidetti V (2008) Relationships between headache and sleep in a non-clinical population of children and adolescents. *Sleep Med* 9:542-548.

Burgess HJ and Fogg LF (2008) Individual differences in the amount and timing of salivary melatonin secretion. *PLoS One* 3:e3055.

Caci H, Bouchez J and Bayle FJ (2009a) Inattentive symptoms of ADHD are related to evening orientation. *J Atten Disord* 13:36-41.

Caci H, Deschaux O, Adan A and Natale V (2009b) Comparing three morningness scales: age and gender effects, structure and cut-off criteria. *Sleep Med* 10:240-245.

Caci H, Mattei V, Bayle FJ, Nadalet L, Dossios C, Robert P and Boyer P (2005a) Impulsivity but not venturesomeness is related to morningness. *Psychiatry Res* 134:259-265.

Caci H, Nadalet L, Staccini P, Myquel M and Boyer P (1999) Psychometric properties of the French version of the composite scale of morningness in adults. *Eur Psychiatry* 14:284-290.

Caci H, Robert P and Boyer P (2004) Novelty seekers and impulsive subjects are low in morningness. *Eur Psychiatry* 19:79-84.

Caci H, Robert P, Dossios C and Boyer P (2005b) Morningness-Eveningness for Children Scale: psychometric properties and month of birth effect. *Encephale* 31:56-64.

Campos M and Martino M (2004) Chronobiologyc aspects of sleep-wake cycle and anxiety levels of nurses working on different shifts

Rev Esc Enferm USP 38:415-421.

Carrier J, Monk TH, Buysse DJ and Kupfer DJ (1997) Sleep and morningness-eveningness in the 'middle' years of life (20-59 y). *J Sleep Res* 6:230-237.

Carrier J, Paquet J, Morettini J and Touchette E (2002) Phase advance of sleep and temperature circadian rhythms in the middle years of life in humans. *Neurosci Lett* 320:1-4.

Carskadon MA, Vieira C and Acebo C (1993) Association between puberty and delayed phase preference. *Sleep* 16:258-262.

Cevoli S, Nicodemo M, Grimaldi D, Leonardi L, Montagna P, Cortelli P and Pierangeli G (2010) Chronotypes in menstrual migraine: a case-control study. *Neurol Sci* 31 Suppl 1:S163-164.

Chelminski I, Ferraro FR, Petros TV and Plaud JJ (1999) An analysis of the "eveningness-morningness" dimension in "depressive" college students. *J Affect Disord* 52:19-29.

Choub A, Mancuso M, Coppede F, LoGerfo A, Orsucci D, Petrozzi L, DiCoscio E, Maestri M, Rocchi A, Bonanni E, Siciliano G and Murri L (2010) Clock T3111C and Per2 C111G SNPs do not influence circadian rhythmicity in healthy Italian population. *Neurol Sci* 32:89-93.

Chung KF and Cheung MM (2008) Sleep-wake patterns and sleep disturbance among Hong Kong Chinese adolescents. *Sleep* 31:185-194.

Chung MH, Chang FM, Yang CC, Kuo TB and Hsu N (2009) Sleep quality and morningness-eveningness of shift nurses. *J Clin Nurs* 18:279-284.

Clodore M, Benoit O, Foret J, Touitou Y, Touron N, Bouard G and Auzeby A (1987) Early rising or delayed bedtime: which is better for a short night's sleep? *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 56:403-411.

Costa G (1993) Evaluation of workload in air traffic controllers. *Ergonomics* 36:1111-1120.

Costa G, Lievore F, Casaletti G, Gaffuri E and Folkard S (1989) Circadian characteristics influencing interindividual differences in tolerance and adjustment to shiftwork. *Ergonomics* 32:373-385.

Diaz-Morales JF, Ferrari JR and Cohen JR (2008) Indecision and avoidant procrastination: the role of morningness-eveningness and time perspective in chronic delay lifestyles. *J Gen Psychol* 135:228-240.

Diaz-Morales JF and Gutierrez Sorroche M (2008) Morningness-eveningness in adolescents. *Span J Psychol* 11:201-206.

Diaz-Morales JF and Sanchez-Lopez MP (2005) Composite scales of morningness and preferences: preliminary validity data in Peruvian undergraduates. *Ergonomics* 48:354-363.

Diaz Morales JF and Sanchez-Lopez MP (2004) Composite and preferences Scales of Morningness: reliability and factor invariance in adult and university samples. *Span J Psychol* 7:93-100.

Digdon NL (2010) Circadian preference and college students' beliefs about sleep education. *Chronobiol Int* 27:297-317.

Dijk DJ and Duffy JF (1999) Circadian regulation of human sleep and age-related changes in its timing, consolidation and EEG characteristics. *Ann Med* 31:130-140.

Dockray S and Steptoe A (2010) Chronotype and diurnal cortisol profile in working women: Differences between work and leisure days. *Psychoneuroendocrinology*.

Duffy JF and Czeisler CA (2002) Age-related change in the relationship between circadian period, circadian phase, and diurnal preference in humans. *Neurosci Lett* 318:117-120.

Duffy JF, Dijk DJ, Hall EF and Czeisler CA (1999) Relationship of endogenous circadian melatonin and temperature rhythms to self-reported preference for morning or evening activity in young and older people. *J Investig Med* 47:141-150.

Duffy JF, Rimmer DW and Czeisler CA (2001) Association of intrinsic circadian period with morningness-eveningness, usual wake time, and circadian phase. *Behav Neurosci* 115:895-899.

Dumont M, Benhaberou-Brun D and Paquet J (2001) Profile of 24-h light exposure and circadian phase of melatonin secretion in night workers. *J Biol Rhythms* 16:502-511.

Eastman CI, Hoese EK, Youngstedt SD and Liu L (1995) Phase-shifting human circadian rhythms with exercise during the night shift. *Physiol Behav* 58:1287-1291.

El-Sheikh M, Buckhalt JA, Granger DA, Erath SA and Acebo C (2007) The association between children's sleep disruption and salivary interleukin-6. *J Sleep Res* 16:188-197.

Emens JS, Yuhas K, Rough J, Kochar N, Peters D and Lewy AJ (2009) Phase angle of entrainment in morning- and evening-types under naturalistic conditions. *Chronobiol Int* 26:474-493.

Ezzatian P, Pichora-Fuller MK and Schneider BA (2010) Do circadian rhythms affect adult age-related differences in auditory performance? *Can J Aging* 29:215-221.

Fernandez-Mendoza J, Vela-Bueno A, Vgontzas AN, Olavarrieta-Bernardino S, Ramos-Platon MJ, Bixler EO and De la Cruz-Troca JJ (2009) Nighttime sleep and daytime functioning correlates of the insomnia complaint in young adults. *J Adolesc* 32:1059-1074.

Ferraz E, Borges MC and Vianna EO (2008) Influence of nocturnal asthma on chronotype. *J Asthma* 45:911-915.

Fleig D and Randler C (2009) Association between chronotype and diet in adolescents based on food logs. *Eat Behav* 10:115-118.

Folkard S, Monk TH and Lobban MC (1979) Towards a predictive test of adjustment to shift work. *Ergonomics* 22:79-91.

Foret J, Touron N, Benoit O and Bouard G (1985) Sleep and body temperature in "morning" and "evening" people. *Sleep* 8:311-318.

Friedman L, Zeitzer JM, Kushida C, Zhdanova I, Noda A, Lee T, Schneider B, Guilleminault C, Sheikh J and Yesavage JA (2009) Scheduled bright light for treatment of insomnia in older adults. *J Am Geriatr Soc* 57:441-452.

Fukuda H, Takahashi M, Miki K, Haratani T, Kurabayashi L, Hisanaga N, Arito H, Takahashi H, Egoshi M and Sakurai M (1999) Shift work-related problems in 16-h night shift nurses (1): Development of an automated data processing system for questionnaires, heart rate, physical activity and posture. *Ind Health* 37:219-227.

Furlani R and Ceolim MF (2005) [Sleep patterns of first-year nursing students]. *Rev Bras Enferm* 58:320-324.

Gaspar-Barba E, Calati R, Cruz-Fuentes CS, Ontiveros-Uribe MP, Natale V, De Ronchi D and Serretti A (2009) Depressive symptomatology is influenced by chronotypes. *J Affect Disord* 119:100-106.

Gau SF and Soong WT (2003) The transition of sleep-wake patterns in early adolescence. *Sleep* 26:449-454.

Gau SS and Merikangas KR (2004) Similarities and differences in sleep-wake patterns among adults and their children. *Sleep* 27:299-304.

Gau SS, Shang CY, Merikangas KR, Chiu YN, Soong WT and Cheng AT (2007) Association between morningness-eveningness and behavioral/emotional problems among adolescents. *J Biol Rhythms* 22:268-274.

Gau SS, Soong WT and Merikangas KR (2004) Correlates of sleep-wake patterns among children and young adolescents in Taiwan. *Sleep* 27:512-519.

Giannotti F, Cortesi F, Sebastiani T and Ottaviano S (2002) Circadian preference, sleep and daytime behaviour in adolescence. *J Sleep Res* 11:191-199.

Gibertini M, Graham C and Cook MR (1999) Self-report of circadian type reflects the phase of the melatonin rhythm. *Biol Psychol* 50:19-33.

Giglio LM, Magalhaes PV, Andersen ML, Walz JC, Jakobson L and Kapczinski F (2010) Circadian preference in bipolar disorder. *Sleep Breath* 14:153-155.

Greenwood KM (1994) Long-term stability and psychometric properties of the Composite Scale of Morningness. *Ergonomics* 37:377-383.

Griefahn B, Kunemund C, Golka K, Thier R and Degen G (2002) Melatonin synthesis: a possible indicator of intolerance to shiftwork. *Am J Ind Med* 42:427-436.

Griefahn B and Robens S (2008) The cortisol awakening response: a pilot study on the effects of shift work, morningness and sleep duration. *Psychoneuroendocrinology* 33:981-988.

Griefahn B and Robens S (2010) Alterations of the cortisol quiescent period after experimental night work with enforced adaptation by bright light and its relation to morningness. *Eur J Appl Physiol* 108:719-726.

Hakkarainen R, Johansson C, Kieseppa T, Partonen T, Koskenvuo M, Kaprio J and Lonnqvist J (2003) Seasonal changes, sleep length and circadian preference among twins with bipolar disorder. *BMC Psychiatry* 3:6.

Harada T, Hirotani M, Maeda M, Nomura H and Takeuchi H (2007) Correlation between breakfast tryptophan content and morning-evening in Japanese infants and students aged 0-15 yrs. *J Physiol Anthropol* 26:201-207.

Harada T and Inoue M (1999) Do majoring subjects affect the morningness-eveningness preference by students? *J Hum Ergol (Tokyo)* 28:49-53.

Harada T, Morisane H and Takeuchi H (2002) Effect of daytime light conditions on sleep habits and morningness-eveningness preference of Japanese students aged 12-15 years. *Psychiatry Clin Neurosci* 56:225-226.

Hasher L, Chung C, May CP and Foong N (2002) Age, time of testing, and proactive interference. *Can J Exp Psychol* 56:200-207.

Hasler BP, Allen JJ, Sbarra DA, Bootzin RR and Bernert RA (2010) Morningness-eveningness and depression: preliminary evidence for the role of the behavioral activation system and positive affect. *Psychiatry Res* 176:166-173.

Hatonen T, Forsblom S, Kieseppa T, Lonnqvist J and Partonen T (2008) Circadian phenotype in patients with the co-morbid alcohol use and bipolar disorders. *Alcohol Alcohol* 43:564-568.

Hidalgo MP and Caumo W (2002) Sleep disturbances associated with minor psychiatric disorders in medical students. *Neurol Sci* 23:35-39.

Hidalgo MP, Caumo W, Posser M, Coccaro SB, Camozzato AL and Chaves ML (2009) Relationship between depressive mood and chronotype in healthy subjects. *Psychiatry Clin Neurosci* 63:283-290.

Hilliker NA, Muehlbach MJ, Schweitzer PK and Walsh JK (1992) Sleepiness/alertness on a simulated night shift schedule and morningness-eveningness tendency. *Sleep* 15:430-433.

Hofstra WA, Gordijn MC, van Hemert-van der Poel JC, van der Palen J and De Weerd AW (2010) Chronotypes and subjective sleep parameters in epilepsy patients: a large questionnaire study. *Chronobiol Int* 27:1271-1286.

Horne JA and Ostberg O (1976) A self-assessment questionnaire to determine morningness-eveningness in human circadian rhythms. *Int J Chronobiol* 4:97-110.

Huang J, Katsuura T, Shimomura Y and Iwanaga K (2006) Diurnal changes of ERP response to sound stimuli of varying frequency in morning-type and evening-type subjects. *J Physiol Anthropol* 25:49-54.

Hur YM (2007) Stability of genetic influence on morningness-eveningness: a cross-sectional examination of South Korean twins from preadolescence to young adulthood. *J Sleep Res* 16:17-23.

Ice GH (2005) Factors influencing cortisol level and slope among community dwelling older adults in Minnesota. *J Cross Cult Gerontol* 20:91-108.

Ishihara K, Miyasita A, Inugami M, Fukuda K and Miyata Y (1987) Differences in sleep-wake habits and EEG sleep variables between active morning and evening subjects. *Sleep* 10:330-342.

Iskra-Golec I (1993) The relationship between circadian, personality, and temperament characteristics and attitude towards shiftwork. *Ergonomics* 36:149-153.

Johansson C, Willeit M, Smedh C, Ekholm J, Paunio T, Kieseppa T, Lichtermann D, Praschak-Rieder N, Neumeister A, Nilsson LG, Kasper S, Peltonen L, Adolfsson R, Schalling M and Partonen T (2003) Circadian clock-related polymorphisms in seasonal affective disorder and their relevance to diurnal preference. *Neuropsychopharmacology* 28:734-739.

Jones KH, Ellis J, von Schantz M, Skene DJ, Dijk DJ and Archer SN (2007) Age-related change in the association between a polymorphism in the PER3 gene and preferred timing of sleep and waking activities. *J Sleep Res* 16:12-16.

Katzenberg D, Young T, Finn L, Lin L, King DP, Takahashi JS and Mignot E (1998) A CLOCK polymorphism associated with human diurnal preference. *Sleep* 21:569-576.

Kerkhof GA (1982) Event-related potentials and auditory signal detection: their diurnal variation for morning-type and evening-type subjects. *Psychophysiology* 19:94-103.

Kerkhof GA (1985) Inter-individual differences in the human circadian system: a review. *Biol Psychol* 20:83-112.

Kerkhof GA, Korving HJ, Willemse-vd Geest HM and Rietveld WJ (1980) Diurnal differences between morning-type and evening-type subjects in self-rated alertness, body temperature and the visual and auditory evoked potential. *Neurosci Lett* 16:11-15.

Kerkhof GA and Van Dongen HP (1996) Morning-type and evening-type individuals differ in the phase position of their endogenous circadian oscillator. *Neurosci Lett* 218:153-156.

Kerkhof GA, Van Dongen HP and Bobbert AC (1998) Absence of endogenous circadian rhythmicity in blood pressure? *Am J Hypertens* 11:373-377.

Kim S, Dueker GL, Hasher L and Goldstein D (2002) Children's time of day preference: age, gender and ethnic differences. *Pers Individ Dif* 33:1083-1090.

Kim SJ, Lee YJ, Kim H, Cho IH, Lee JY and Cho SJ (2010) Age as a moderator of the association between depressive symptoms and morningness-eveningness. *J Psychosom Res* 68:159-164.

Korczak AL, Martynhak BJ, Pedrazzoli M, Brito AF and Louzada FM (2008) Influence of chronotype and social zeitgebers on sleep/wake patterns. *Braz J Med Biol Res* 41:914-919.

Korompeli A, Sourtzi P, Tzavara C and Velonakis E (2009) Rotating shift-related changes in hormone levels in intensive care unit nurses. *J Adv Nurs* 65:1274-1282.

Koskenvuo M, Hublin C, Partinen M, Heikkila K and Kaprio J (2007) Heritability of diurnal type: a nationwide study of 8753 adult twin pairs. *J Sleep Res* 16:156-162.

Kripke DF, Rex KM, Ancoli-Israel S, Nievergelt CM, Klimecki W and Kelsoe JR (2008) Delayed sleep phase cases and controls. *J Circadian Rhythms* 6:6.

Kripke DF, Shadan FF, Dawson A, Cronin JW, Jamil SM, Grizas AP, Koziol JA and Kline LE (2010) Genotyping sleep disorders patients. *Psychiatry Investig* 7:36-42.

Kroz M, Feder G, von Laue H, Zerm R, Reif M, Girke M, Matthes H, Gutenbrunner C and Heckmann C (2008) Validation of a questionnaire measuring the regulation of autonomic function. *BMC Complement Altern Med* 8:26.

Kudielka BM, Federenko IS, Hellhammer DH and Wust S (2006) Morningness and eveningness: the free cortisol rise after awakening in "early birds" and "night owls". *Biol Psychol* 72:141-146.

Lahti TA, Leppamaki S, Lonnqvist J and Partonen T (2008) Transitions into and out of daylight saving time compromise sleep and the rest-activity cycles. *BMC Physiol* 8:3.

LeBourgeois MK, Giannotti F, Cortesi F, Wolfson AR and Harsh J (2005) The relationship between reported sleep quality and sleep hygiene in Italian and American adolescents. *Pediatrics* 115:257-265.

Lee HJ, Kim L, Kang SG, Yoon HK, Choi JE, Park YM, Kim SJ and Kripke DF (2010a) PER2 variation is associated with diurnal preference in a Korean young population. *Behav Genet* 41:273-277.

Lee KY, Song JY, Kim SH, Kim SC, Joo EJ, Ahn YM and Kim YS (2010b) Association between CLOCK 3111T/C and preferred circadian phase in Korean patients with bipolar disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 34:1196-1201.

Leonhard C and Randler C (2009) In sync with the family: children and partners influence the sleep-wake circadian rhythm and social habits of women. *Chronobiol Int* 26:510-525.

Lima PF, Medeiros AL and Araujo JF (2002) Sleep-wake pattern of medical students: early versus late class starting time. *Braz J Med Biol Res* 35:1373-1377.

Lund HG, Reider BD, Whiting AB and Prichard JR (2010) Sleep patterns and predictors of disturbed sleep in a large population of college students. *J Adolesc Health* 46:124-132.

Madokoro S, Nakagawa H, Misaki K, Ihara H, Ito T and Isaki K (1997) Nocturnal melatonin profiles before and one year after beginning shift-work. *Psychiatry Clin Neurosci* 51:17-22.

Martynhak BJ, Louzada FM, Pedrazzoli M and Araujo JF (2010) Does the chronotype classification need to be updated? Preliminary findings. *Chronobiol Int* 27:1329-1334.

Matchock RL and Mordkoff JT (2009) Chronotype and time-of-day influences on the alerting, orienting, and executive components of attention. *Exp Brain Res* 192:189-198.

Matsumoto K and Morita Y (1987) Effects of nighttime nap and age on sleep patterns of shift workers. *Sleep* 10:580-589.

Matsuura N, Hayashi M and Hori T (2002) Comparison of sleep/wake habits of university students with or without a habit of self-awakening. *Psychiatry Clin Neurosci* 56:223-224.

May CP, Hasher L and Foong N (2005) Implicit memory, age, and time of day: paradoxical priming effects. *Psychol Sci* 16:96-100.

Mecacci L and Zani A (1983) Morningness-eveningness preferences and sleep-waking dairy data of morning and evening types in student and worker samples. *Ergonomics* 26:1147-1153.

Megdal SP and Schernhammer ES (2007) Correlates for poor sleepers in a Los Angeles high school. *Sleep Med* 9:60-63.

Meliska CJ, Martinez LF, Lopez AM, Sorenson DL, Nowakowski S and Parry BL (2011) Relationship of morningness-eveningness questionnaire score to melatonin and sleep timing, body mass index and atypical depressive symptoms in peri- and post-menopausal women. *Psychiatry Res*.

Meyrer R, Demling J, Kornhuber J and Nowak M (2009) Effects of night shifts in bipolar disorders and extreme morningness. *Bipolar Disord* 11:897-899.

Miller JD, Morin LP, Schwartz WJ and Moore RY (1996) New insights into the mammalian circadian clock. *Sleep* 19:641-667.

Mishima K, Tozawa T, Satoh K, Saitoh H and Mishima Y (2005) The 3111T/C polymorphism of hClock is associated with evening preference and delayed sleep timing in a Japanese population sample. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 133B:101-104.

Mitchell PJ, Hoese EK, Liu L, Fogg LF and Eastman CI (1997) Conflicting bright light exposure during night shifts impedes circadian adaptation. *J Biol Rhythms* 12:5-15.

Mongrain V, Carrier J and Dumont M (2005) Chronotype and sex effects on sleep architecture and quantitative sleep EEG in healthy young adults. *Sleep* 28:819-827.

Mongrain V, Carrier J and Dumont M (2006a) Circadian and homeostatic sleep regulation in morningness-eveningness. *J Sleep Res* 15:162-166.

Mongrain V, Carrier J and Dumont M (2006b) Difference in sleep regulation between morning and evening circadian types as indexed by antero-posterior analyses of the sleep EEG. *Eur J Neurosci* 23:497-504.

Mongrain V and Dumont M (2007) Increased homeostatic response to behavioral sleep fragmentation in morning types compared to evening types. *Sleep* 30:773-780.

Mongrain V, Lavoie S, Selmaoui B, Paquet J and Dumont M (2004) Phase relationships between sleep-wake cycle and underlying circadian rhythms in Morningness-Eveningness. *J Biol Rhythms* 19:248-257.

Mongrain V, Paquet J and Dumont M (2006c) Contribution of the photoperiod at birth to the association between season of birth and diurnal preference. *Neurosci Lett* 406:113-116.

Monk TH, Begley AE, Billy BD, Fletcher ME, Germain A, Mazumdar S, Moul DE, Shear MK, Thompson WK and Zarotney JR (2008) Sleep and circadian rhythms in spousally bereaved seniors. *Chronobiol Int* 25:83-98.

Monk TH, Buysse DJ, Kennedy KS, Pods JM, DeGrazia JM and Miewald JM (2003) Measuring sleep habits without using a diary: the sleep timing questionnaire. *Sleep* 26:208-212.

Monk TH, Buysse DJ, Welsh DK, Kennedy KS and Rose LR (2001) A sleep diary and questionnaire study of naturally short sleepers. *J Sleep Res* 10:173-179.

Monk TH and Kupfer DJ (2007) Which aspects of morningness-eveningness change with age? *J Biol Rhythms* 22:278-280.

Monk TH, Reynolds CF, 3rd, Buysse DJ, Hoch CC, Jarrett DB, Jennings JR and Kupfer DJ (1991) Circadian characteristics of healthy 80-year-olds and their relationship to objectively recorded sleep. *J Gerontol* 46:M171-175.

Motohashi Y (1988) Sex difference in the morningness-eveningness preference in student and hospital nurse samples. *Ind Health* 26:245-249.

Murray G, Allen NB and Trinder J (2003) Seasonality and circadian phase delay: prospective evidence that winter lowering of mood is associated with a shift towards Eveningness. *J Affect Disord* 76:15-22.

Murray G, Michalak EE, Levitt AJ, Levitan RD, Enns MW, Morehouse R and Lam RW (2006) O sweet spot where art thou? Light treatment of Seasonal Affective Disorder and the circadian time of sleep. *J Affect Disord* 90:227-231.

Nakade M, Takeuchi H, Kurotani M and Harada T (2009a) Effects of meal habits and alcohol/cigarette consumption on morningness-eveningness preference and sleep habits by Japanese female students aged 18-29. *J Physiol Anthropol* 28:83-90.

Nakade M, Takeuchi H, Taniwaki N, Noji T and Harada T (2009b) An integrated effect of protein intake at breakfast and morning exposure to sunlight on the circadian typology in Japanese infants aged 2-6 years. *J Physiol Anthropol* 28:239-245.

Natale V and Adan A (1999) Season of birth modulates morningness-eveningness preference in humans. *Neurosci Lett* 274:139-141.

Natale V, Adan A and Chotai J (2002) Further results on the association between morningness-eveningness preference and the season of birth in human adults. *Neuropsychobiology* 46:209-214.

Natale V, Adan A and Fabbri M (2009) Season of birth, gender, and social-cultural effects on sleep timing preferences in humans. *Sleep* 32:423-426.

Natale V, Adan A and Scapellato P (2005a) Are seasonality of mood and eveningness closely associated? *Psychiatry Res* 136:51-60.

Natale V, Martoni M and Cicogna P (2003) Effects of circadian typology on sleep-wake behavior of air traffic controllers. *Psychiatry Clin Neurosci* 57:539-541.

Natale V, Sansavini A, Trombini E, Esposito MJ, Alessandroni R and Faldella G (2005b) Relationship between preterm birth and circadian typology in adolescence. *Neurosci Lett* 382:139-142.

Natvik S, Bjorvatn B, Moen BE, Mageroy N, Sivertsen B and Pallesen S (2010) Personality factors related to shift work tolerance in two- and three-shift workers. *Appl Ergon* 42:719-724.

Negriff S and Dorn LD (2009) Morningness/Eveningness and menstrual symptoms in adolescent females. *J Psychosom Res* 67:169-172.

Negriff S, Dorn LD, Pabst SR and Susman EJ (2010) Morningness/eveningness, pubertal timing, and substance use in adolescent girls. *Psychiatry Res* 185:408-413.

Nielsen T (2010) Nightmares associated with the eveningness chronotype. *J Biol Rhythms* 25:53-62.

O'Connor PJ and Davis JC (1992) Psychobiologic responses to exercise at different times of day. *Med Sci Sports Exerc* 24:714-719.

Oginska H, Fafrowicz M, Golonka K, Marek T, Mojsa-Kaja J and Tucholska K (2010) Chronotype, sleep loss, and diurnal pattern of salivary cortisol in a simulated daylong driving. *Chronobiol Int* 27:959-974.

Ong JC, Huang JS, Kuo TF and Manber R (2007) Characteristics of insomniacs with self-reported morning and evening chronotypes. *J Clin Sleep Med* 3:289-294.

Ong JC, Kuo TF and Manber R (2008) Who is at risk for dropout from group cognitive-behavior therapy for insomnia? *J Psychosom Res* 64:419-425.

Pabst SR, Negriff S, Dorn LD, Susman EJ and Huang B (2009) Depression and anxiety in adolescent females: the impact of sleep preference and body mass index. *J Adolesc Health* 44:554-560.

Paine SJ, Gander PH and Travier N (2006) The epidemiology of morningness/eveningness: influence of age, gender, ethnicity, and socioeconomic factors in adults (30-49 years). *J Biol Rhythms* 21:68-76.

Park YM, Matsumoto K, Seo YJ, Shinkoda H and Park KP (1998) Effects of aging on morningness-eveningness and sleep habits in Korean and Japanese workers. *Psychiatry Clin Neurosci* 52:245-246.

Pedrazzoli M, Ling L, Finn L, Kubin L, Young T, Katzenberg D and Mignot E (2000) A polymorphism in the human timeless gene is not associated with diurnal preferences in normal adults. *Sleep Res Online* 3:73-76.

Pereira DS, Tufik S, Louzada FM, Benedito-Silva AA, Lopez AR, Lemos NA, Korczak AL, D'Almeida V and Pedrazzoli M (2005) Association of the length polymorphism in the human Per3 gene with the delayed sleep-phase syndrome: does latitude have an influence upon it? *Sleep* 28:29-32.

Petru R, Wittmann M, Nowak D, Birkholz B and Angerer P (2005) Effects of working permanent night shifts and two shifts on cognitive and psychomotor performance. *Int Arch Occup Environ Health* 78:109-116.

Punduk Z, Gur H and Ercan I (2005) A reliability study of the Turkish version of the mornings-evenings questionnaire. *Turk Psikiyatri Derg* 16:40-45.

Querrioux-Coulombier G and Gil R (1991) Diurnal variations of the composition of cognitive evoked potentials. *Neurophysiol Clin* 21:75-84.

Rajajarvi E, Antila M, Kieseppa T, Lonnqvist J, Tuulio-Henriksson A and Partonen T (2010) The effect of seasons and seasonal variation on neuropsychological test performance in patients with bipolar I disorder and their first-degree relatives. *J Affect Disord* 127:58-65.

Randler C and Bilger S (2009) Associations among sleep, chronotype, parental monitoring, and pubertal development among German adolescents. *J Psychol* 143:509-520.

Randler C and Schaal S (2010) Morningness-eveningness, habitual sleep-wake variables and cortisol level. *Biol Psychol* 85:14-18.

Rea MS, Bierman A, Figueiro MG and Bullough JD (2008) A new approach to understanding the impact of circadian disruption on human health. *J Circadian Rhythms* 6:7.

Reid KJ, Chang AM, Dubocovich ML, Turek FW, Takahashi JS and Zee PC (2001) Familial advanced sleep phase syndrome. *Arch Neurol* 58:1089-1094.

Reinberg AE, Lewy H and Smolensky M (2001) The birth of chronobiology: Julien Joseph Virey 1814. *Chronobiol Int* 18:173-186.

Roberts RD and Kyllonen PC (1999) Morningness-eveningness and intelligence: early to bed, early to rise will likely make you anything but wise! *Pers Individ Dif* 27:1123-1133.

Roemer HC, Griefahn B, Kuenemund C, Blaszkewicz M and Gerngross H (2003) The reliability of melatonin synthesis as an indicator of the individual circadian phase position. *Mil Med* 168:674-678.

Roenneberg T, Kuehnle T, Juda M, Kantermann T, Allebrandt K, Gordijn M and Merrow M (2007) Epidemiology of the human circadian clock. *Sleep Med Rev* 11:429-438.

Roenneberg T, Kuehnle T, Pramstaller PP, Ricken J, Havel M, Guth A and Merrow M (2004) A marker for the end of adolescence. *Curr Biol* 14:R1038-1039.

Roenneberg T and Merrow M (2007) Entrainment of the human circadian clock. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 72:293-299.

Roenneberg T, Wirz-Justice A and Merrow M (2003) Life between clocks: daily temporal patterns of human chronotypes. *J Biol Rhythms* 18:80-90.

Roepke SE and Duffy JF (2010) Differential impact of chronotype on weekday and weekend sleep timing and duration. *Nat Sci Sleep*:213-220.

Rosenthal L, Day R, Gerhardstein R, Meixner R, Roth T, Guido P and Fortier J (2001) Sleepiness/alertness among healthy evening and morning type individuals. *Sleep Med* 2:243-248.

Rufiange M, Dumont M and Lachapelle P (2002) Correlating retinal function with melatonin secretion in subjects with an early or late circadian phase. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43:2491-2499.

Russo PM, Bruni O, Lucidi F, Ferri R and Violani C (2007) Sleep habits and circadian preference in Italian children and adolescents. *J Sleep Res* 16:163-169.

Rybak YE, McNeely HE, Mackenzie BE, Jain UR and Levitan RD (2006) An open trial of light therapy in adult attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Clin Psychiatry* 67:1527-1535.

Rybak YE, McNeely HE, Mackenzie BE, Jain UR and Levitan RD (2007) Seasonality and circadian preference in adult attention-deficit/hyperactivity disorder: clinical and neuropsychological correlates. *Compr Psychiatry* 48:562-571.

Sack RL, Auckley D, Auger RR, Carskadon MA, Wright KP, Jr., Vitiello MV and Zhdanova IV (2007) Circadian rhythm sleep disorders: part I, basic principles, shift work and jet lag disorders. An American Academy of Sleep Medicine review. *Sleep* 30:1460-1483.

Satoh K, Mishima K, Inoue Y, Ebisawa T and Shimizu T (2003) Two pedigrees of familial advanced sleep phase syndrome in Japan. *Sleep* 26:416-417.

Schneider AM and Randler C (2009) Daytime sleepiness during transition into daylight saving time in adolescents: Are owls higher at risk? *Sleep Med* 10:1047-1050.

Schubert E and Randler C (2008) Association between chronotype and the constructs of the Three-Factor-Eating-Questionnaire. *Appetite* 51:501-505.

Selvi Y, Aydin A, Boysan M, Atli A, Agargun MY and Besiroglu L (2010) Associations between chronotype, sleep quality, suicidality, and depressive symptoms in patients with major depression and healthy controls. *Chronobiol Int* 27:1813-1828.

Selvi Y, Gulec M, Agargun MY and Besiroglu L (2007) Mood changes after sleep deprivation in morningness-eveningness chronotypes in healthy individuals. *J Sleep Res* 16:241-244.

Serretti A, Gaspar-Barba E, Calati R, Cruz-Fuentes CS, Gomez-Sanchez A, Perez-Molina A and De Ronchi D (2010) 3111T/C clock gene polymorphism is not associated with sleep disturbances in untreated depressed patients. *Chronobiol Int* 27:265-277.

Shinkoda H, Matsumoto K, Park YM and Nagashima H (2000) Sleep-wake habits of schoolchildren according to grade. *Psychiatry Clin Neurosci* 54:287-289.

Shohet KL and Landrum RE (2001) Caffeine consumption questionnaire: a standardized measure for caffeine consumption in undergraduate students. *Psychol Rep* 89:521-526.

Silva A, Queiroz SS, Winckler C, Vital R, Sousa RA, Fagundes V, Tufik S and de Mello MT (2010) Sleep quality evaluation, chronotype, sleepiness and anxiety of Paralympic Brazilian athletes: Beijing 2008 Paralympic Games. *Br J Sports Med*.

Smith C, Folkard S, Schmieder RA, Parra LF, Spelten E, Almiral H, Sem RN, Sahu S, Perez LM and Tisak J (2002) Investigation of morning¯evening orientation in six countries using the preferences scale. *Personal Individ Dif* 32.

Smith CS, Reilly C and Midkiff K (1989) Evaluation of three circadian rhythm questionnaires with suggestions for an improved measure of morningness. *J Appl Psychol* 74:728-738.

Smith L, Tanigawa T, Takahashi M, Mutou K, Tachibana N, Kage Y and Iso H (2005) Shiftwork locus of control, situational and behavioural effects on sleepiness and fatigue in shiftworkers. *Ind Health* 43:151-170.

Steele MT, Ma OJ, Watson WA and Thomas HA, Jr. (2000) Emergency medicine residents' shiftwork tolerance and preference. *Acad Emerg Med* 7:670-673.

Steele MT, Ma OJ, Watson WA, Thomas HA, Jr. and Muelleman RL (1999) The occupational risk of motor vehicle collisions for emergency medicine residents. *Acad Emerg Med* 6:1050-1053.

Steele MT, McNamara RM, Smith-Coggins R and Watson WA (1997) Morningness-eveningness preferences of emergency medicine residents are skewed toward eveningness. *Acad Emerg Med* 4:699-705.

Strang-Karlsson S, Kajantie E, Pesonen AK, Raikkonen K, Hovi P, Lahti J, Heinonen K, Jarvenpaa AL, Eriksson JG, Andersson S and Paavonen EJ (2010) Morningness propensity in young adults born prematurely: the Helsinki study of very low birth weight adults. *Chronobiol Int* 27:1829-1842.

Sugawara J, Hamada Y, Nishijima T and Matsuda M (2001) Diurnal variations of post-exercise parasympathetic nervous reactivation in different chronotypes. *Jpn Heart J* 42:163-171.

Susman EJ, Dockray S, Schiefelbein VL, Herwehe S, Heaton JA and Dorn LD (2007) Morningness/eveningness, morning-to-afternoon cortisol ratio, and antisocial behavior problems during puberty. *Dev Psychol* 43:811-822.

Taillard J, Moore N, Claustrat B, Coste O, Bioulac B and Philip P (2006) Nocturnal sustained attention during sleep deprivation can be predicted by specific periods of subjective daytime alertness in normal young humans. *J Sleep Res* 15:41-45.

Taillard J, Philip P and Bioulac B (1999) Morningness/eveningness and the need for sleep. *J Sleep Res* 8:291-295.

Taillard J, Philip P, Chastang JF and Bioulac B (2004) Validation of Horne and Ostberg morningness-eveningness questionnaire in a middle-aged population of French workers. *J Biol Rhythms* 19:76-86.

Taillard J, Philip P, Chastang JF, Diefenbach K and Bioulac B (2001) Is self-reported morbidity related to the circadian clock? *J Biol Rhythms* 16:183-190.

Taillard J, Philip P, Coste O, Sagaspe P and Bioulac B (2003) The circadian and homeostatic modulation of sleep pressure during wakefulness differs between morning and evening chronotypes. *J Sleep Res* 12:275-282.

Takeuchi H, Morisane H, Iwanaga A, Hino N, Matsuoka A and Harada T (2002) Morningness-eveningness preference and mood in Japanese junior high school students. *Psychiatry Clin Neurosci* 56:227-228.

Tamm AS, Lagerquist O, Ley AL and Collins DF (2009) Chronotype influences diurnal variations in the excitability of the human motor cortex and the ability to generate torque during a maximum voluntary contraction. *J Biol Rhythms* 24:211-224.

Tonetti L, Adan A, Caci H, De Pascalis V, Fabbri M and Natale V (2010) Morningness-eveningness preference and sensation seeking. *Eur Psychiatry* 25:111-115.

Tonetti L, Fabbri M and Natale V (2009) Season of birth and personality in healthy young adults. *Neurosci Lett* 452:185-188.

Torsvall L and Akerstedt T (1980) A diurnal type scale. Construction, consistency and validation in shift work. *Scand J Work Environ Health* 6:283-290.

Van der Klaauw AA, Biermasz NR, Pereira AM, van Kralingen KW, Dekkers OM, Rabe KF, Smit JW and Romijn JA (2008a) Patients cured from craniopharyngioma or nonfunctioning pituitary macroadenoma (NFMA) suffer similarly from increased daytime somnolence despite normal sleep patterns compared to healthy controls. *Clin Endocrinol (Oxf)* 69:769-774.

Van der Klaauw AA, Dekkers OM, Pereira AM, van Kralingen KW and Romijn JA (2007) Increased daytime somnolence despite normal sleep patterns in patients treated for nonfunctioning pituitary macroadenoma. *J Clin Endocrinol Metab* 92:3898-3903.

Van der Klaauw AA, Pereira AM, van Kralingen KW, Rabe KF and Romijn JA (2008b) Somatostatin analog treatment is associated with an increased sleep latency in patients with long-term biochemical remission of acromegaly. *Growth Horm IGF Res* 18:446-453.

Velissaris D, Karamouzos V, Polychronopoulos P and Karanikolas M (2009) Chronotypology and melatonin alterations in minimal hepatic encephalopathy. *J Circadian Rhythms* 7:6.

Vernet C and Arnulf I (2009) Idiopathic hypersomnia with and without long sleep time: a controlled series of 75 patients. *Sleep* 32:753-759.

Volk S, Dyroff J, Georgi K and Pflug B (1994) Subjective sleepiness and physiological sleep tendency in healthy young morning and evening subjects. *J Sleep Res* 3:138-143.

Waage S, Moen BE, Pallesen S, Eriksen HR, Ursin H, Akerstedt T and Bjorvatn B (2009) Shift work disorder among oil rig workers in the North Sea. *Sleep* 32:558-565.

Waterhouse J, Edwards B, Nevill A, Carvalho S, Atkinson G, Buckley P, Reilly T, Godfrey R and Ramsay R (2002) Identifying some determinants of "jet lag" and its symptoms: a study of athletes and other travellers. *Br J Sports Med* 36:54-60.

Waterhouse J, Weinert D, Minors D, Folkard S, Owens D, Atkinson G, Nevill A and Reilly T (2000) Estimates of the daily phase and amplitude of the endogenous component of the circadian rhythm of core temperature in sedentary humans living nychthemerally. *Biol Rhythm Res* 31:88-107.

Werner H, Lebourgeois MK, Geiger A and Jenni OG (2009) Assessment of chronotype in four- to eleven-year-old children: reliability and validity of the Children's Chronotype Questionnaire (CCTQ). *Chronobiol Int* 26:992-1014.

Wesensten NJ and Badia P (1992) Time of day and semantic category effects on late components of the visual ERP. *Biol Psychol* 33:173-193.

Willis TA, O'Connor DB and Smith L (2005) The influence of morningness-eveningness on anxiety and cardiovascular responses to stress. *Physiol Behav* 85:125-133.

Wood J, Birmaher B, Axelson D, Ehmann M, Kalas C, Monk K, Turkin S, Kupfer DJ, Brent D, Monk TH and Nimgainkar VL (2009) Replicable differences in preferred circadian phase between bipolar disorder patients and control individuals. *Psychiatry Res* 166:201-209.

Wyatt JK, Stepanski EJ and Kirkby J (2006) Circadian phase in delayed sleep phase syndrome: predictors and temporal stability across multiple assessments. *Sleep* 29:1075-1080.

Yang CK, Kim JK, Patel SR and Lee JH (2005) Age-related changes in sleep/wake patterns among Korean teenagers. *Pediatrics* 115:250-256.

Yang L, Hasher L and Wilson DE (2007) Synchrony effects in automatic and controlled retrieval. *Psychon Bull Rev* 14:51-56.

Zavada A, Gordijn MC, Beersma DG, Daan S and Roenneberg T (2005) Comparison of the Munich Chronotype Questionnaire with the Horne-Ostberg's Morningness-Eveningness Score. *Chronobiol Int* 22:267-278.

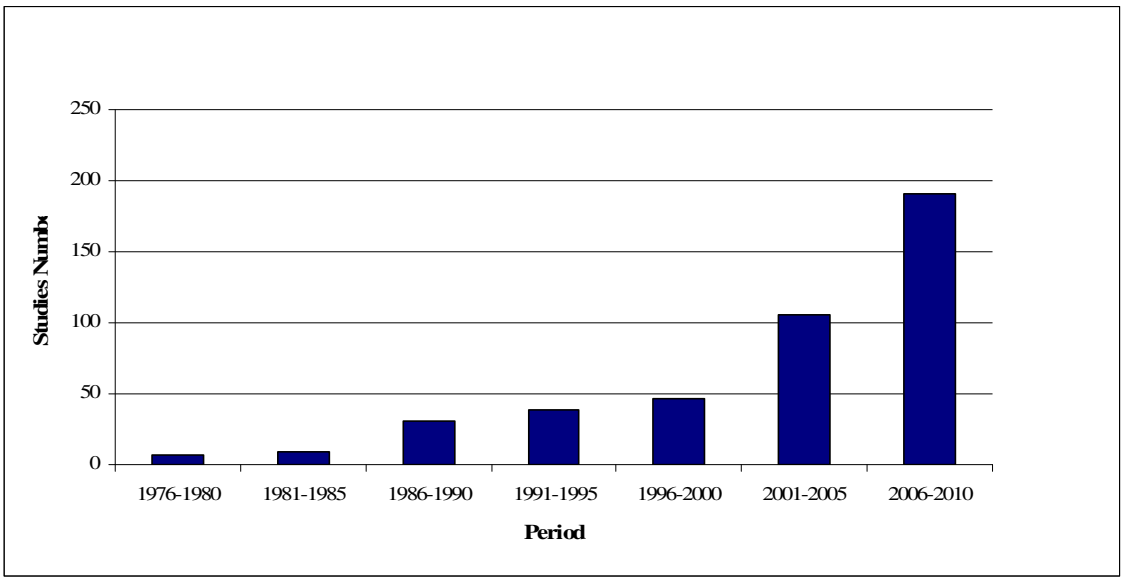


Figure 1. Number of studies found using the descriptors: 'morningness', 'morning-type' and 'chronotype'. Each bar represents a five-year period.

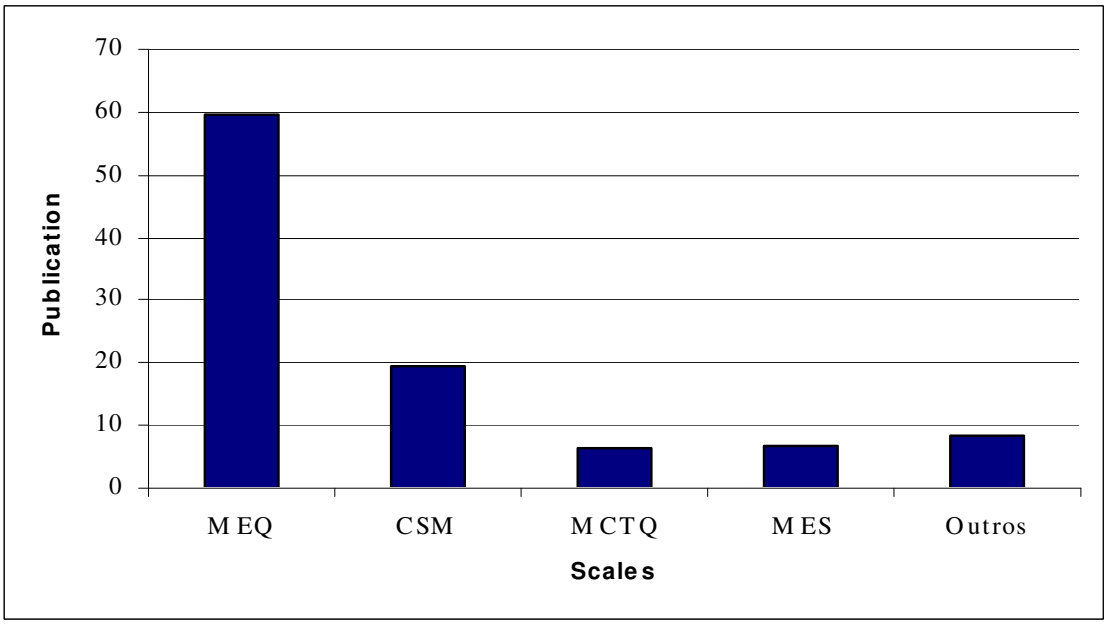


Figure 2. Number of studies using each scale to evaluate chronotype, published in the last decades. Each bar represents the percentage of the studies in relation the total scales found in the literature using the descriptors noted in this review.

Table 1. Overview of studies with scales used to identify typology of morningness / eveningness and sample characteristics

Author and year	Scale used in the study	Sample	Sample size	Age mean and range
(Adan *et al.*, 1992)	MEQ	Workers and University students	908	24.88 ± 6.37 (17 to 50)
(Adan, 1994)	MEQ	176 Students and 361 workers	537	25.31 ± 2.87 (21 to 30)
(Adan *et al.*, 2005)	CSM	Undergraduate students	391 (132 men and 259 women)	19.94 ± 2.22 years (17 to 33)
(Adan *et al.*, 2006)	MEQr	Undergraduate students	510 (182 men and 328 women)	22.80 ± 4.14 years (18 to 33)
(Adan *et al.*, 2010a)	MEQr	Undergraduate students	862 - 362 were men and 500 women	21.94 ± 2.64 years (18 to 30)
(Adan *et al.*, 2010b)	MEQ	Undergraduate students	850 (396 men and 454 women)	21.98 ± 2.86 years(18 to 33)
(Ahn *et al.*, 2008)	CSM	Patients with bipolar I disorder (BDI), schizophrenia (SZ), and control individuals.	300	-
(Amschler *et al.*, 2005)	MESC	Children and teachers	199 (113 women and 85 men)	-
(An *et al.*, 2009)	MEQ	Undergraduate students	12 (men)	20.92 ± 1.08 years
(Antunes Lda *et al.*, 2010)	MEQ	Daily workers and shift workers	27	25 to 60 years
(Archer *et al.*, 2003)	MEQ	Volunteers	484	-
(Archer *et al.*, 2008)	Sleep diaries	Healthy subjects	24	25.0 ± 3.5 years
(Ayalon *et al.*, 2007)	MEQ	Patients with minor traumatic brain injury (mTBI)	15 (12 men and 3 women)	Mean 26 years (17 to 45)
(Bae *et al.*, 2010)	MEQ	Adults with attention deficit hyperactivity disorder (ADHD)	344 subjects (134 men, 210 women)	43.53 ± 14.15 years
Baehr, EK (2000)(Baehr *et al.*, 2000)	MEQ	Simulated night-shift work	172 (101 men and 71 women)	Men 18 to 41 (25.2 ± 5.3 years) and women 18 to 43 (25.1 ± 5.4 years)

Author and year	Scale used in the study	Sample	Sample size	Age mean and range
(Bailey *et al.*, 1991)	MEQ	Healthy adults	20 (16 women and 4 men)	23 to 39 years
(Barbosa *et al.*, 2008)	MEQ	Undergraduate students	68 (28 men and 40 women)	21 ± 2 years (18 to 25)
(Barclay *et al.*, 2010a)	MEQ	Twins	1556	-
(Barclay *et al.*, 2010b)	MEQ	Twins	1102	Mode 20 years (18 to 27)
(Blomeke *et al.*, 2008)	MEQ	Healthy young male Caucasians	54 (men)	-
(Bohle *et al.*, 1989)	MEQ	Undergraduate students	60	18.9 years (17 to 30)
(Bohle *et al.*, 1993)	MEQ	Nurses	97	-
(Bohle *et al.*, 2001)	CSM	Undergraduate students	670	22.5 years (16 to 37)
(Borisenkov *et al.*, 2010)	MCTQ	Students	1101 - 655 girls and 446 boys	16.1 ± 3.1 years (11 to 23)
(Broms *et al.*, 2010)	Single-item assessment ME based on the Diurnal Type scale ('Will you try to estimate towhat extent you are a morning or evening person?')	Twins	23 289	-
(Brown, 1993)	CSM	Shift workers and fixed schedule day workers	150	-
(Bruni *et al.*, 2008)	MESC and CSM	Undergraduate students	1073 (50.9% men)	10.56 ± 0.50 years (8 to 15)

Author and year	Scale used in the study	Sample	Sample size	Age mean and range
(Burgess *et al.*, 2008)	MEQ	Healthy subjects	170 (85 women and 85 men)	-
(Caci *et al.*, 1999)	CSM	Students	356 (53 men and 303 women)	Men 26.49 ± 4.91 (18 to 54) and women 25.45 ± 6.29 years (18 to 54)
(Caci *et al.*, 2004)	CSM	Undergraduate students	129	22.82 ± 3.51 years (18 to 37)
(Caci *et al.*, 2005b)	CSM	Undergraduate students	552 (194 men and 358 women).	-
(Caci *et al.*, 2009a)	MEQ and CSM	Undergraduate students and parents of children referred to a specialized consultation	354	-
(Caci *et al.*, 2009b)	MEQ and CSM	Students	456	-
(Campos *et al.*, 2004)	MEQ	Nurses	40	25 to 57 years
(Carrier *et al.*, 1997)	MEQ	Healthy subjects	110 (58 women and 52 men)	20 to 59 years
(Carrier *et al.*, 2002)	MEQ	Young and middle-aged	27	25 to 58 years
(Cevoli *et al.*, 2010)	MEQ	Patients with ICHD-II diagnosis of pure menstrual migraine and menstrually related migraine and healthy controls	93 patients and 85 controls	-
(Chelminski *et al.*, 1999)	MEQ	Students	1617 (1041 women and 576 men)	18 to 53 years
Choub, A (2010)(Choub *et al.*, 2010)	MEQ	Italian volunteers	219 (105 men and 114 women)	22 to 56 years
(Chung *et al.*, 2008)	MESC	Adolescents	1629	12 to 19 years
(Chung *et al.*, 2009)	MEQ	Nurses	137	21 to 58 years

Author and year	Scale used in the study	Sample	Sample size	Age mean and range
(Clodore *et al.*, 1987)	MEQ	healthy male volunteers	12	25 ± 2.3 years
(Costa *et al.*, 1989)	CTQ	Shift workers	24	31.9 years (22 to 48)
(Costa, 1993)	MEQ	Traffic controller	20	40·0 ± 5·9 years (32 and 59)
(Diaz Morales *et al.*, 2004)	CSM	Young undergraduates and adults.	329 (247 women and 82 men)	31.78 ± 14.18 years (19 to 62)
(Diaz-Morales *et al.*, 2005)	CSM	Students	139 - 109 women and 30 men	21.73 ± 2.63 years (18 to 29)
(Diaz-Morales *et al.*, 2008a)	CSM	Regular workers	509 (254 women and 255 men)	49.78 ± 6.14 years (31 to 67)
(Diaz-Morales *et al.*, 2008b)	MESC	Students	600	14.3 ± 1.4 years (12 to 16)
(Digdon, 2010)	CSM	Students	499 (355 women, 104 men, and 40 who did not specify sex)	21.21 ± 5.50 years
(Dockray *et al.*, 2010)	CSM	Workers at University College London and nearby institutions.	187 (women)	21 to 61 years
(Duffy *et al.*, 2001)	MEQ	Healthy subjects	17 (men)	23.5 ± 3 years (20 to 30)
(Duffy *et al.*, 2002)	MEQ	Older	13	67.4 ± 3.2 years
(Dumont *et al.*, 2001)	MEQ	Night nurses	30 (27 women, 3 men)	36.0 ± 8.5 years (26 to 55)
(Eastman *et al.*, 1995)	MEQ	Healthy subjects	16 (10 men, 6 women)	Median 26 years (19 to 41)
(El-Sheikh *et al.*, 2007)	MESC	Children	64 (36 girls and 28 boys)	8.75 ± 0.55 years
(Emens *et al.*, 2009)	MEQ	Morning-and evening-type subjects	66 (47 women and 19 men)	19 to 64 years
(Ezzatian *et al.*, 2010)	MEQ	Younger and older adults	103 (65 younger and 38 older adults)	-

Author and year	Scale used in the study	Sample	Sample size	Age mean and range
(Fernandez-Mendoza *et al.*, 2009)	MEQ	Undergraduate students	1238	18.85 ± 1.45years (16 to 25)
(Ferraz *et al.*, 2008)	MEQ	asthmatics and non-asthmatics	200 (100 asthmatics and 100 non-asthmatics)	-
(Fleig *et al.*, 2009)	MCTQ	Adolescents	150 (96 girls and 54 boys)	13.23 ± 1.54 years (11 to 17)
(Foret *et al.*, 1985)	MEQ	Young adults	19	20 to 26 years
(Friedman *et al.*, 2009)	MEQ	Older	51 (36 women, 15 men)	63.6 ± 7.1 years
(Fukuda *et al.*, 1999)	MEQ	Nurses	40	-
(Furlani *et al.*, 2005)	MEQ	Undergraduate students	44 (25 men and 19 woman)	27 students 19,5 ± 1,8, and 17 students 18,7 ± 0,5
(Gaspar-Barba *et al.*, 2009)	MEQ	Patients with Major Depressive Disorder	100 (79 women and 21 men)	34 ± 11.74 years (18–60)
(Gau *et al.*, 2003)	MESC	Students	1547 (811 boys and 736 girls)	10 to 14 years
(Gau *et al.*, 2004b)	MESC	Children and their parents	1547 students and 1509 of their parents	12.01 ± 1.46 years (10 to 16)
(Gau *et al.*, 2004a)	CSM and MESC	Children and their parents	1335 students and 1479 of their parents	12.0 ± 1.5 years (10 to 16)
(Gau *et al.*, 2007)	MESC	Students and Their mothers	1332	-
(Giannotti *et al.*, 2002)	MESC	Students	1747	E 17.1 years and M 16.8 years

Author and year	Scale used in the study	Sample	Sample size	Age mean and range
(Gibertini *et al.*, 1999)	MESC	Young adults	117 (95 men and 22 women)	22.9 ± 3.9 (18 to 34); meanand women (ages 20–36; mean 25.2; S.D. 5.1)
(Giglio *et al.*, 2010)	Single question of assessment of circadian type (When do you typically perform best? morning, afternoon, or evening)	Outpatients with Bipolar Disorder	81	-
(Griefahn *et al.*, 2002)	MEQ	Subjects in constant routine	34 men	16 to 32 years
(Griefahn *et al.*, 2008)	MEQ	Students	16 (men)	(19—27 years)
(Griefahn *et al.*, 2010)	MEQ	Volunteers	49 (men)	-
(Hakkarainen *et al.*, 2003)	MEQ	Twins	67	-
(Harada *et al.*, 1999)	DTS	Students	417	-
(Harada *et al.*, 2002)	DTS	Students	826 (415 women and 411 men)	12–15 years old.
(Harada *et al.*, 2007)	DTS	Students	1055	0 to 15 years
(Hasher *et al.*, 2002)	MEQ	Younger and older adults	96	Younger adults (ages 18-32 years) and older adults (ages 58-78)
(Hasler *et al.*, 2010)	MEQ	Depressed and non-depressed subjects	208 (140 women)	Mean age=19.23 years, range=17 to 33

Author and year	Scale used in the study	Sample	Sample size	Age mean and range
(Hatonen *et al.*, 2008)	MEQ	Patients with bipolar disorder	148	-
(Hidalgo *et al.*, 2002)	MEQ	Medical students	342 (199 men and 143 women)	18 to 35 years.
(Hidalgo *et al.*, 2009)	MEQ	Volunteers	200 (118 women and 82 men)	18 to 99 years (mean ± , 34.35 16.39 years).
(Hilliker *et al.*, 1992)	MEQ	Volunteers	15 (11 women and 4 men)	41 years (32 to 53)
(Hofstra *et al.*, 2010)	MEQ	Epilepsy patients	200	-
(Horne *et al.*, 1976)	MEQ	Volunteers	48	18 to 32 years
(Huang *et al.*, 2006)	MEQ	Undergraduate students	13 (men)	Mean age 22.5, ± 2.8 yrs.
(Hur, 2007)	CSM	Twins	977	9–23 years
(Ice, 2005)	BALM	Older	48	76 ± 6 years old.
(Ishihara *et al.*, 1985)	MEQ	Undergraduate students	1459 (1061 men and 398 women)	19.5 ± 1.2 years
(Iskra-Golec, 1993)	MEQ	Shift workers	162	-
(Johansson *et al.*, 2003)	MEQ	Outpatient psychiatric services and met the DSM-IV criteria for depressive or bipolar disorder with the seasonal (winter) pattern.	159 (129 women and 30 men)	-
(Jones *et al.*, 2007)	MEQ	Visitors to the London Science Museum	2001: 484 (217 men and 267 women); 2004: 1106 (490 men and 616 women)	18 and 81 years.
(Katzenberg *et al.*, 1998)	MEQ	Middle-aged adults	410	50.0 ± 7.9 years
(Kerkhof *et al.*, 1980)	MEQ	Adults (9 extreme morning types and 9 extreme evening types)	18 (8 women)	-

Author and year	Scale used in the study	Sample	Sample size	Age mean and range
(Kerkhof, 1982)	MEQ	Students	28	-
(Kerkhof *et al.*, 1998)	MEQ	Adults normotensive, healthy subjects	25 (15 men and 10 women)	Aged 19 to 28 years, mean 6 ± 22.8 6 2.8 years
(Kim *et al.*, 2002)	MESC and MEQ	Students	989	8 - 16 years
(Kim *et al.*, 2010)	MEQ	Volunteers	361 (220 women and 141 men)	42.8±13.2 (age range: 19–79) years
(Korczak *et al.*, 2008)	MEQ	Volunteers	32	The mean age was 19.62 ±1.85 years.
(Korompeli *et al.*, 2009)	CSM	Nurses	32	-
(Koskenvuo *et al.*, 2007)	DTS	Twins	8753	-
(Kripke *et al.*, 2008)	MEQ and BALM	DSPD participants and controls	426 (205 patients and 221 controls)	-
(Kripke *et al.*, 2010)	BALM	Sleep Disorders Patients	359 (33% women and 67% men)	Age 21 to 92 years, with a mean age of 57.4 (± 13.9) years.
(Kroz *et al.*, 2008)	MEQr	Patients with breast cancer, with colorectal cancer, with diabetes mellitus, with coronary heart disease, with rheumatological conditions, with Hashimoto's disease, with multiple morbidities and healthy people.	440	-
(Kudielka *et al.*, 2006)	MEQ	Young adults	112 (men)	-
(Lahti *et al.*, 2008)	MEQ	Healthy participants	9 (8 women and 1 man)	20–40
(LeBourgeois *et al.*, 2005)	MESC	Adolescents	1348	12 to 17 years

Author and year	Scale used in the study	Sample	Sample size	Age mean and range
(Lee *et al.*, 2010a)	CSM	Medical students	299 (191 men and 108 women)	22.9 (± 2.14, range of age = 18–32) years.
(Lee *et al.*, 2010b)	CSM	Patients with bipolar disorder	260 (111 men and 149 women)	(35.5 ± 12.4)
(Leonhard *et al.*, 2009)	CSM and MCTQ	Women pregnant and non-pregnant with or without children	179 (women)	-
(Lima *et al.*, 2002)	MEQ	Medical students	27 (13 men and 14 women)	20.2 ± 2.0 years.
(Lund *et al.*, 2010)	MEQ	Students	1125 (420 men and 705 women)	17 to 24 years
(Madokoro *et al.*, 1997)	MEQ	Nurses	7 women	-
(Martynhak *et al.*, 2010)	MEQ	Undergraduate students	1509	
(Matchock *et al.*, 2009)	MEQ	Undergraduate students	80 (23 men and 57 women)	21.6 years (18 to 28 years)
(Matsumoto *et al.*, 1987)	MEQ	Shift workers	16 (men)	54.4 years (48 to 61)
(Matsuura *et al.*, 2002)	MEQ	Students	643 (354 men and 289 women)	19.1 ± 1.7
(May *et al.*, 2005)	MEQ	Students and older volunteers	36 students and 48 volunteers	students 18 to 23 years and volunteers 60 to 75 years
(Mecacci *et al.*, 1983)	MEQ	Students and workers	475	25.1 ± 3.9 years (20 to 30)
(Megdal *et al.*, 2007)	MEQ	Students	585	-
(Meliska *et al.*, 2011)	MEQ	Depressed patients and controls	29 (19 normal control subjects and 10 depressed)	46 to 72 years

Author and year	Scale used in the study	Sample	Sample size	Age mean and range
(Meyrer *et al.*, 2009)	MEQ	Case report: A patient with bipolar II disorder and extreme morning type followed a stable work schedule for a significant period of time, maintaining a stable mood.	-	-
(Mishima *et al.*, 2005)	MEQ	Healthy Japanese adults	421 (116 men and 305 women)	35.5 years (20 to 58)
(Mitchell *et al.*, 1997)	MEQ	Healthy subjects	32 (16 women, 16 men)	24.7 ± 4.6 years
(Mongrain *et al.*, 2004)	MEQ	Most subjects were students without a summer job ; the others were between jobs , worked in the after-noon , or worked at home with their own schedule.	24	(Mtypes: 24.7 ± 1.5 years; E types: 23.4 ± 0.7 years).
(Mongrain *et al.*, 2005)	MEQ	Healthy volunteers	24	-
(Mongrain *et al.*, 2006c)	MEQ	Young adults	1591 (1102 women and 489 men)	17 to 35 years
(Mongrain *et al.*, 2006a)	MEQ	Morning-type and evening-type participants	24	(MEQ scores 59–71; age 24.7 ± 1.5 years; six women) and 12 evening types (MEQ scores 27–40; age 23.4 ± 0.7 years; six women).

Author and year	Scale used in the study	Sample	Sample size	Age mean and range
(Mongrain *et al.*, 2006b)	MEQ	Young adults	24	19 to 34 years
(Mongrain *et al.*, 2007)	MEQ	Morning-type and evening-type participants	24	19 to 34 years
(Monk *et al.*, 1991)	MEQ	Older adults (ninth decade) and young controls (third decade).	64 - older (16 men and 18 women) and young 30 (21 men and 9 women)	Older 83.1 years and young 25.5 years
(Monk *et al.*, 2001)	CSM	Short sleepers and controls	24 (12 controls)	40.4 ± 10.0 years (10 to 50)
(Monk *et al.*, 2003)	CSM	Healthy subjects	100 (47 men and 53 women)	33.6 years (20 to 59)
(Monk *et al.*, 2007)	MEQ	Study A: middle-aged and young. Study B: older and younger.	Study A: 150 (72 men and 78 women) Study B: 106 older adults (47 men and 59 women) and 100 younger adults (40 men and 60 women)	Study A 35.0 ± 11.2 years (20 to 60); Study B older adults 83.1 ± 4.2 years (65 to 93) and younger adults 26.9 ± 4.5 years (19 to 38)
(Monk *et al.*, 2008)	CSM	Spousally bereaved seniors	28 (24 women and 4men)	72.3 ± 6.4 years (60 to 84)
(Motohashi, 1988)	MEQ	Students and nurses	248 students (110 men and 138 women) 138 hospital nurses (all women)	Students 20.9 ± 2.8 years and nurses 28.3 ± 8.6 years
(Murray *et al.*, 2003)	MEQ	Adults	244	-
(Murray *et al.*, 2006)	MEQ	Outpatients	-	18 to 65 years
(Nakade *et al.*, 2009b)	DTS	Children	744 (359 men and 385 women)	2 to 6 years
(Nakade *et al.*, 2009a)	DTS	Students	800 (women)	18 to 29 years

Author and year	Scale used in the study	Sample	Sample size	Age mean and range
(Natale *et al.*, 1999)	MEQ	Undergraduate students	1584 (415 men and 1169 women).	21:52 ± 3:12 years (18 to 34)
(Natale *et al.*, 2002)	MEQ	Undergraduate students	3709	17 to 34 years
(Natale *et al.*, 2003)	CSM	Air traffic controllers	18 (men)	34.00 years (22 to 49).
(Natale *et al.*, 2005a)	MEQ	Undergraduate students	1715	-
(Natale *et al.*, 2005b)	MESC and CSM	Adolescents and controls	Survey 1: 265; survey 2: 358	-
(Natale *et al.*, 2009)	MEQ	Undergraduate students	5720 (3,877 women and 1,843 men)	22.23 ± 2.98 years
(Natvik *et al.*, 2010)	DTS	Nurses - (rotating and shift work)	2048	-
(Negriff *et al.*, 2009)	MESC	Adolescents	264 (women)	-
(Negriff *et al.*, 2010)	MESC	Adolescents	262 (women)	-
(Nielsen, 2010)	MEQ	Respondents	3978	26.5 ± 11.6 years (10 to 69)
(O'Connor *et al.*, 1992)	MEQ	Adults males recruited by notices placed on campus bulletin boards	12	23,2 ± 3,9 years
(Oginska *et al.*, 2010)	CQ	Healthy, male, volunteers	21 (men)	27.9 ± 4.9 years
(Ong *et al.*, 2007)	CSM	Patients who attended a cognitive-behavior therapy for insomnia (CBT-I).	312	-
(Ong *et al.*, 2008)	CSM	Patients who attended a cognitive-behavior therapy for insomnia (CBT-I).	528 (57.8% of the sample were women).	47.9 ± 14.3 years
(Pabst *et al.*, 2009)	MESC	Adolescents	264 (women)	14.9 ± 2.2 years

Author and year	Scale used in the study	Sample	Sample size	Age mean and range
(Paine *et al.*, 2006)	MEQ	Populational base study	2526	30 to 34 years
(Park *et al.*, 1998)	MEQ	Workers	2291 (1727 men and 564 women)	Korean workers 36.3 ± 7.9 years; Japanese workers 42.2 ± 12.6 years
(Pedrazzoli *et al.*, 2000)	MEQ	Middle-aged adults	528 (295 men)	50.3 ± 7.8 years
(Pereira *et al.*, 2005)	MEQ	Volunteers	1089	25.85 ± 7.1 years
(Petru *et al.*, 2005)	MEQ	Workers	44 (men)	39 years (21 to 58)
(Punduk *et al.*, 2005)	MEQ	The majority of them were students.	618 (291 women and 327 men)	23.0 ± 5.4 years (18 to 57)
(Querrioux-Coulombier *et al.*, 1991)	MEQ	Volunteers	12 (6 women and 6 men)	18 to 25 years
(Rajajarvi *et al.*, 2010)	MEQ	Bipolar disorder (BD) patients their relatives and controls	32 patients, 40 relatives and 50 controls	Patients: 50.67 ± 7.58 years: Relatives: 55.08 ± 13.69 years; and controls: 57.13 ± 14.57 years
(Randler *et al.*, 2009)	CSM	Students	784 (353 girls, 395 boys)	15.18 ± 2.14 years (11 to 20)
(Randler *et al.*, 2010)	CSM	Adolescents and young adults	57 nuclear families	Adolescents 14.02 ± 0.77, years (13 to 16) and adults 23.94 ± 3.77 years (20 to 39)
(Rea *et al.*, 2008)	MEQ	Nurses - (rotating and shift work)	43	-
(Reid *et al.*, 2001)	MEQ	Members of a single family	32	-
(Roberts *et al.*, 1999)	MEQ AND CSM	United States Air Force, sixth week of basic training.	420 (73 women)	20.20 ± 2.30 years 17 to 34)

Author and year	Scale used in the study	Sample	Sample size	Age mean and range
(Roemer *et al.*, 2003)	MEQ	Undergraduate	51 (34 men and 17 women)	16 - 32 years
(Roepke *et al.*, 2010)	MCTQ and MEQ	Visitors to the Museum of Science in Boston	145	-
(Rosenthal *et al.*, 2001)	MEQ	Volunteers	56 (32 men and 24 women)	27 ± 7 years
(Rufiange *et al.*, 2002)	MEQ	Undergraduate students	569	-
(Russo *et al.*, 2007)	MESC	Children and adolescents (students)	1073 (50.8% men and 49.2% women)	10.6 ± 0.50 years (8 to 14)
(Rybak *et al.*, 2006)	MEQ	Adults with clinical diagnosis of ADHD	29 (15 men and 14 women)	18 to 60 years
(Rybak *et al.*, 2007)	MEQ	Adults with attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD)	29	-
(Satoh *et al.*, 2003)	MEQ	Japanese families with advanced sleep phase syndrome	14	-
(Schneider *et al.*, 2009)	CSM	Adolescents	469 (251 girls and 218 boys)	13.5 ± 2.2, years (10 to 20)
(Schubert *et al.*, 2008)	CSM	Undergraduate students	335 (197 women and 138 men).	23.15 ± 2.72 years (17 to 42)
(Selvi *et al.*, 2007)	MEQ	Undergraduate students	60	25.4 ± 4.9 years (18 to 30)
(Selvi *et al.*, 2010)	MEQ	Patients episode of major depressive disorder	80	18 to 65 years
(Serretti *et al.*, 2010)	MEQ	Major depressive disorder patients	100 (79 women and 21 men)	34 ± 11.74 years (18 to 60)
(Shinkoda *et al.*, 2000)	MEQ	Undergraduate students	-	-
(Shohet *et al.*, 2001)	MEQ	Undergraduate students	691 (59.2% women and 34.8% men)	21 years
(Silva *et al.*, 2010)	MEQ	Paralympic athletes	27 (16 men and 11 women)	-

Author and year	Scale used in the study	Sample	Sample size	Age mean and range
(Smith *et al.*, 1989)	CSM MEQ and DTS	Undergraduate students	501	-
(Smith *et al.*, 2005)	single-item assessment ME (Which one of these types do uou believe yourself to be currently?)	Shift workers	613	32,8 ± 9,4 years
(Steele *et al.*, 1997)	Single question using a four-point scale that ranged from‘‘definite morningtype’’to‘ ‘definite evening type.’’	Emergency medicine residents	2614 (75 % men)	Median 29 years (23 to 55)
(Steele *et al.*, 1999)	Single question using a four-point scale that ranged from‘‘definite morningtype’’to‘ ‘definite evening type.’’	Emergency medicine residents	1035 (75 % men)	Median 30 years
(Steele *et al.*, 2000)	Single question using a four-point scale that ranged from‘‘definite morningtype’’to‘ ‘definite evening type.’’	Emergency medicine residents	1035 (75 % men)	Median 30 years

Author and year	Scale used in the study	Sample	Sample size	Age mean and range
(Strang-Karlsson *et al.*, 2010)	MEQ	Young adults born prematurely at very low birth weight (VLBW) and controls born at term	184 VLBW and 93 controls	18 to 32 years
(Sugawara *et al.*, 2001)	MEQ	Students	37 (men)	33 years (23 to 55)
(Susman *et al.*, 2007)	MESC	Children and adolescents (students)	111 (55 girls and 56 boys)	Girls 10.49 years, ± 1.51 years (8 to 12), and boys 11.44 years, ± 1.63 years (9 to 13)
(Taillard *et al.*, 1999)	MEQ	Drivers	2007	17 to 81 years
(Taillard *et al.*, 2001)	MEQ	Non shift workers	1165	51.3 ± 3.3 years
(Taillard *et al.*, 2003)	MEQ	Students or workers.	18 (men)	21.4 ± 1.9 years
(Taillard *et al.*, 2004)	MEQ	Workers	566	51.2 ± 3.2 years (44–58)
(Taillard *et al.*, 2006)	MEQ	Young adults	18 (men)	21.4 ± 1.9 years
(Takeuchi *et al.*, 2002)	DTS	Students	1339 (690 boys and 649 girls)	12 to 15 years
(Tamm *et al.*, 2009)	MEQ	Healthy volunteers	23 (7 women, 16 men)	19 to 54 years
(Tonetti *et al.*, 2009)	MEQ	Young adults	419 (249 women and 170 men)	24.0 ± 3.1 years (18 to 30)
(Tonetti *et al.*, 2010)	MEQr	Undergraduate students	1041 (633 women and 408 men)	22.83 ± 2.92 years (18 to 30)
(van der Klaauw *et al.*, 2007)	MCTQ	Adult patients in remission of NFMA	76 (41 men)	63 years (37 to 87)
(Van der Klaauw *et al.*, 2008b)	MCTQ	Adult patients with acromegaly and controls	62 (32 men) Patients and 98 controls (40 men)	61 years (33 to 88)

Author and year	Scale used in the study	Sample	Sample size	Age mean and range
(Van der Klaauw *et al.*, 2008a)	MCTQ	Patients previously treated for craniopharyngioma and controls	27 (14 men, 8 patients diagnosed at childhood)	53 years (27 to 80)
(Velissaris *et al.*, 2009)	MEQ	Cirrhotic patients	26 (20 men and 6 women)	65.1 ± 10.7 years in men and 62.8 ± 3.4 years in women.
(Vernet *et al.*, 2009)	MEQ	Patients with idiopathic hypersomnia and controls.	105 (75 and 30 controls)	34 ± 12 years
(Waage *et al.*, 2009)	CSM	Shift workers	103	39.8 years
(Waterhouse *et al.*, 2000)	CSM	Healthy female subjects	15	-
(Waterhouse *et al.*, 2002)	CSM	Athletes, trainers or administrators, and academics.	85 (54 men)	32.1 ± 13.0 years
(Werner *et al.*, 2009)	CCTQ	Children	152 (75 women and 77 men)	6.70 ± 1.5 years (4 to 11)
(Wesensten *et al.*, 1992)	CSM	Undergraduate students	11	20.1 years (18 to 26)
(Willis *et al.*, 2005)	CSM	Undergraduate students	60 (32 men, 28 women)	21.9 ± 4.21 years (18 to 35)
(Wood *et al.*, 2009)	CSM	Adults with bipolar disorder (BP) and controls.	318 (190 cases and 128 controls).	-
(Wyatt *et al.*, 2006)	MEQ	Patients with delayed sleep phase syndrome (DSPS) and controls	16	18 to 30 years
(Yang *et al.*, 2005)	MESC	Students	-	13.7 ± 2.4 years
(Yang *et al.*, 2007)	MEQ	Older	Experiment 1: 53 Experiment 2: 46	Experiment 1: 67.89, ± 4.19 years (60 to 76); Experiment 2: 66.24, ± = 4.51 years (60 to 78)

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

13 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Os estudos anteriores que investigaram a relação entre a tipologia circadiana e o distúrbio do humor foram focados em populações de doentes, utilizando o Questionário de Matutinidade e Vespertinidade (MEQ) para avaliar a preferência de matutinidade e vespertinidade.

Nesse estudo a tipologia cronotípica foi aferida pela fase de sono em uma população essencialmente rural. A grande vantagem dessa abordagem é que podemos controlar os fatores de confusão, como idade, sexo, exposição à luz e sua heterogeneidade socioeconômica.

A utilização do questionário de Cronotipo de Munique permitiu avaliar a dessincronização entre os ritmos internos e externos nos indivíduos estudados. O meio período de sono, utilizado como indicador cronobiológico foi capaz de distinguir os grupos de indivíduos que apresentaram maiores níveis de sintomas depressivos. Observou-se que um atraso de fase no período de sono foi capaz de predizer um maior nível nos escores da BECK.

Conforme demonstrado, foi observada uma dependência entre as variáveis de idade e gênero tanto para a fase de sono, quanto para a distribuição dos escores da depressão.

Embora o desenho do presente estudo não permita o estabelecimento de causa e efeito, deixa clara a evidência de que o atraso de fase circadiana do sono esteve relacionado a uma maior diferença entre as fases de sono nos dias livres comparando-os aos dias de trabalho. Isto gera a hipótese de que a relação entre os sintomas depressivos e a tipologia circadiana pode

estar sendo mediada através do jet lag social (diferença entre os dias livres e de obrigações sociais). Esses resultados sugerem que a relação do cronotipo com o risco de sintomas depressivos pode ser explicada no domínio do relógio circadiano interno, tendo como perspectiva a regulação, através da diferença entre os períodos de sono nos dias de trabalho e nos dias livres. O que nos permite postular que o grupo com maiores níveis de sintomas depressivos não se diferencia apenas nos parâmetros cronobiológicos (como vem sendo estabelecido em outros estudos), mas também pelo fato de apresentar uma maior diferença entre a ritmicidade interna e externa nos indivíduos pesquisados.

Neste novo modelo, os indivíduos, perante rupturas ambientais ou condições de vida persistentes que perturbam as suas rotinas sociais, alteram a exposição aos *zeitgebers*, provocando um desalinhamento entre os fatores endógenos e os fatores exógenos da ritmicidade biológica. Deste modo, a exposição destes indivíduos a situações de periodicidade ambiental diferentes da ritmicidade interna do organismo leva à ocorrência de alterações nos ritmos biológicos. Tais alterações surgem como tentativa de adaptação aos novos estímulos e corresponderiam também a um desalinhamento dos ritmos circadianos internos.

As alterações em indivíduos com predisposições biológicas e psicológicas podem induzir a mudanças bioquímicas e fisiológicas e, por consequência, pode desencadear uma doença afetiva. A depressão, por sua vez, mantém o desalinhamento porque, ela própria, é responsável pela alteração de *zeitgebers*, como a diminuição dos contatos sociais e redução do tempo de exposição à luz. Perpetuando, dessa forma, a situação de desalinhamento instalada.

Esse modelo torna-se importante na prática dos cuidados relacionados ao processo de saúde e doença, principalmente na atenção primária, aliada às recomendações terapêuticas atuais. Os resultados apresentados, além de permitirem avançar nos conhecimentos desta área, também sugerem a importância de um ajustamento do modelo cronobiológico do ritmo circadiano.

ANEXOS

ANEXO I

METODOLOGIA

METODOLOGIA

Objetivos

Avaliar o perfil cronobiológico de uma amostra populacional de descendência caucasiana européia residente no Vale do Taquari.

Objetivos Específicos

Avaliar numa amostra populacional do Vale do Taquari:

a) a influência cultural e ambiental da latitude na distribuição dos cronotipos;

b) a influência dos cronotipos na saúde e bem-estar humano;

c) a relação do fenótipo circadiano com traços de personalidade e reações em situações de estresse.

Contribuir com amostras para um estudo de associação da variabilidade genética

interindividual com o fenótipo circadiano e o comportamento de sono.

Outras variáveis serão levadas em consideração em relação à distribuição do fenótipo circadiano:

a) exposição à luz;

b) estilo de vida;

c) condições gerais de saúde;

d) qualidade de vida e

e) qualidade de sono.

Delineamento

Delineamento geral – estudo transversal.

Amostragem

O Rio Grande do Sul é um dos estados mais europeizados do Brasil, tem sua população derivada, sobretudo da imigração e colonização européia do século XIX. Os principais

imigrantes foram os italianos, seguidos dos alemães e açorianos, somados aos ameríndios, portugueses continentais e escravos africanos. Podemos citar entre os grupos de imigrantes minoritários: espanhóis, poloneses, russos, árabes, japoneses, argentinos, uruguaios, entre outros. 84,7% da população é composta de população de cor branca, 5,2% de negros, 10,4% de pardos e 0,4 de amarelos e indígenas (IBGE, 2007).

Imigração alemã: A população do Rio Grande do Sul não passava de 100 mil pessoas no ano da Independência do Brasil, composta por estancieiros e seus escravos, sendo a grande maioria concentrada na região dos pampas ou na região de Porto Alegre. O Imperador Dom Pedro I resolveu atrair imigrantes para a região. O major Antonio Schaffer foi mandado para a Alemanha e ficou responsável por encontrar pessoas que estivessem dispostas a emigrar para o Brasil. Nos arredores de Hamburgo, o major agrupou 9 famílias, ao todo 39 pessoas que, após vários dias de viagem, chegaram ao Rio de Janeiro e mais tarde foram encaminhadas para o Rio Grande do Sul (http://pt.wikipedia.org/wiki/Imagem:Kolonien_Suedbrasilien.png). Os primeiros alemães chegaram ao que seria atualmente a cidade de São Leopoldo, a 25 de julho de 1824. Nos primeiros seis anos, entraram no Rio Grande do Sul 5.350 alemães. Apesar de abandonados pelo governo brasileiro, os colonos se expandiram por toda a região do Vale do Rio dos Sinos, mantendo-se distantes dos estancieiros gaúchos que estavam à procura de mão-de-obra barata para criar o gado.

Os primeiros colonos vieram de Holstein, Hamburgo, Mecklemburgo e Hannover. Depois, passaram a predominar os oriundos de Hunsrück e do Palatinado. Além desses, vieram da Pomerânia, Vestfália e de Württemberg.

Nos primeiros 50 anos de colonização, foram introduzidos mais de 30 mil alemães no Rio Grande do Sul. Eles se agruparam em diversas colônias rurais, dependendo da região de origem. Porém, com o passar do tempo, houve a mistura de alemães das mais diversas partes da Alemanha. As colônias nasceram principalmente na beira de rios, e ali nascia um novo Rio Grande do Sul, totalmente diferente do mundo gaúcho. Os colonos alemães criaram em terras brasileiras o ambiente que deixaram na Alemanha, mantendo a língua alemã e as tradições germânicas. Mas, com o decorrer da colonização, inevitavelmente os colonos alemães passaram a ter contato com a população gaúcha, ocorrendo o fenômeno do abrasileiramento desses imigrantes.

Na região do Vale dos Sinos, os alemães deram os primeiros passos da indústria brasileira. Ali foram criadas fábricas de sapatos, têxtil e de algodão, principalmente para o mercado regional. Após a Revolução Farroupilha fundaram as colônias nos vales dos rios Taquari, Pardo e Pardinho, fundando Santa Cruz do Sul e a Colônia Santa Ângelo. Às margens da Lagoa dos Patos fundaram São Lourenço do Sul e no inicio do século XX chegaram ao noroeste do estado, criando Ijuí, Santa Rosa, entre outras, para logo depois atravessarem o Rio Uruguai e migrarem para o oeste de Santa Catarina e Paraná, além de colônias no norte da Argentina e no Paraguai.

O Vale do Taquari, uma das regiões do Rio Grande do Sul colonizada por imigrantes alemães é composta de 36 municípios, nos quais se destaca o setor agropecuário. Está situado na região central do Estado, e sua população tem em torno de 320 mil habitantes, o que equivale a 2,97% da população gaúcha, sendo a grande maioria, descendentes de alemães, em menor proporção, de italianos e uma pequena parte de açorianos. O aparecimento da indústria

e o desenvolvimento de comércio e setor de serviços provocaram mudanças significativas nos últimos 30 anos. A expectativa de vida aumentou, sendo, no momento, de 73,6 anos. Segundo dados do IBGE referentes ao ano de 2000, o índice de alfabetização na região é de 93,27%. O PIB per capita de 2004 foi de R$17.002,00.

Os municípios selecionados para este projeto são: Progresso, Doutor Ricardo, Westfália, Arroio do Meio, Teutônia e Travesseiro. A população desses municípios é predominantemente de origem alemã e italiana, que habita as zonas rurais e pequenos povoados. O município de Progresso possui uma população de 6.667 habitantes, ocupa uma área de 270 Km^2. Em 1892 chegaram os primeiros imigrantes italianos para colonizar a região. O município de Travesseiro possui uma população de 2.372 habitantes, ocupa uma área de 95,376 km², a colonização predominante é alemã. O município de Dr Ricardo possui uma população de 2.151 habitantes, ocupa uma área de 110,28 km², sua população é predominantemente de origem alemã. O município de Westfália tem sua população estimada em de 2.900 habitantes, ocupa uma área de 62,5 km², a colonização predominante é alemã. Westfália se destaca no cenário regional pela extensa programação em seu calendário de eventos, em sua grande maioria relacionada com a cultura alemã. O município de Teutônia tem sua população estimada em 19.969 habitantes, ocupa uma área de 216 km². Os primeiros habitantes chegaram em maior número a partir de 1865, sendo imigrantes alemães oriundos da antiga colônia de São Leopoldo. Em 1868, mais imigrantes vieram da Alemanha, principalmente das regiões de Westfália, Pomerânia, Saxônia, Boêmia e Silésia. Os alemães adquiriam as terras e se dedicavam à agricultura. Posteriormente, pequenas indústrias foram criadas pelos imigrantes, principalmente calçadistas. O município de Arroio do Meio tem sua população estimada em de 18.086 habitantes, ocupa uma área de 153,78 km². O município

localiza-se às margens do Rio Taquari. Primitivamente, as terras do atual município foram habitadas apenas por índios. O povoamento da sede iniciou no ano de 1853, principalmente por alemães e portugueses. A principal atividade econômica desses municípios é a agropecuária: bovinocultura, suinocultura, avicultura, produção de ovos e leite. Na indústria o setor da alimentação é o mais importante. A qualidade de vida é considerada uma das melhores do Brasil.

Cálculo da Amostra

Este é um estudo de prevalência de base populacional com característica descritiva, que abrangerá pelo menos 20% da população dos municípios selecionados. Os indivíduos serão selecionados por sorteio de localidades ou ruas, totalizando 20% da população total elegível de cada município. Considerando que cerca de 70% da população do Vale do Taquari encontra-se na faixa etária de 12 a 65 anos, e sendo a população total dos municípios selecionados de 52.145, a população final a ser incluída foi estimada em aproximadamente 7.500 indivíduos.

Critérios de Inclusão

Neste estudo serão selecionados sujeitos entre 12 e 65 anos, residentes nos municípios do Vale do Taquari (Progresso, Doutor Ricardo, Westfália, Arroio do Meio, Teutônia e Travesseiro). Serão selecionados por sorteio de localidades ou ruas 20% da população total

elegível de cada um. Considerando que cerca de 70% da população do Vale do Taquari encontra-se nessa faixa etária, e que a população total dos municípios selecionados é de 52.145, a população final a ser incluída está estimada em aproximadamente 7.500 sujeitos. A seleção dos mesmos foi realizada considerando a descendência européia e o perfil de urbanização, optando-se pelos municípios com características predominantemente rurais.

O estudo está dividido em duas etapas de seleção. Na primeira etapa serão selecionados 7.500 sujeitos dos quais serão excluídos os que trabalham em ritmo de plantões e usam psicofármacos para dormir. Na segunda etapa, serão selecionados os sujeitos com cronotipo extremo (matutinos e vespertinos). Desses serão coletadas as informações sobre exposição à luz, etnia, estilo e qualidade de vida, condições gerais de saúde, qualidade de sono, estratégias de reações ao estresse e traços de personalidade. Além disso, será coletada amostra de sangue para posterior análise de genótipo. A informação sobre etnia será usada para a classificação dos grupos a serem investigados no estudo genético, uma vez que diferenças na composição étnica das populações podem levar a resultados falso-positivos (Allebrandt & Roenneberg, 2008).

Critérios de Exclusão

Serão excluídos sujeitos menores de 12 e maiores do que 65 anos. Também, aqueles impossibilitados de responder às questões por limitação cognitiva como por ex.: demência, trabalhadores em regime de plantão e em uso de psicofármacos. Adicionalmente foram excluídos aqueles indivíduos que se autodeclararam não descendentes de caucasianos.

Definição dos Fatores em Estudo

O genótipo e etnia serão considerados como fatores.

Definição dos desfechos

Na primeira etapa fazem parte dos desfechos primários o cronotipo, o impacto da cefaléia e o nível de sintomas depressivos. Na segunda etapa, fazem parte dos desfechos a qualidade de sono, estilo e qualidade de vida, condições gerais de saúde, estratégias de reação ao estresse e traços de personalidade.

Instrumentos de aferição

a) A tipologia cronotípica será estabelecida usando o Questionário de Cronotipo de Munique (Munich ChronoType Questionnaire MCTQ; anexo 1) (Roenneberg *et al.*, 2003b) - Esse instrumento estabelece a tipologia circadiana por meio de uma escala que avalia aspectos relacionados ao ritmo de dormir e acordar nos dias de trabalho e nos de "folga" ou finais de semana. Esse instrumento apresentou alto coeficiente de correlação como o Questionário de Matutinidade e Vespertinidade de Horne-Osberg (MEQ) no processo de validação (Zavada *et al.*, 2005). As principais vantagens de

usar o MCTQ residem no fato de apresentar boa correlação com o tempo de sono nos dias livres, que refletem o débito de sono acumulado nos dias de trabalho. Esse dado permite uma avaliação mais realística dos cronotipos individuais com suficiente acurácia para estudos genéticos populacionais (Roenneberg *et al.*, 2007a). Uma grande base de dados, de 65.000 sujeitos, permitiu estabelecer de modo acurado que o cronotipo avaliado pelo escore da MEQ é dependente da idade e sexo com um índice de correlação de r = -0,59.

b) A qualidade de sono do será aferida por meio do Questionário de Qualidade de Sono de Pittsburgh (Buysse et al., 1989) adaptada para o Português do Brasil.

c) A qualidade de vida e o estado de saúde serão avaliados por meio do WHOQOL (Chachamovich et al., 2008) adaptado para o português do Brasil.

d) As estratégias de reação às situações de estresse (adaptação comportamental ou cognitiva) serão avaliadas por meio do Inventário de Estratégias de controle de estresse (coping) adaptado para o português do Brasil por Savóia et. al., (Savoia, 1999).

e) O nível de sintomas depressivos será avaliado por meio do Inventário para Depressão de Beck (Gorenstein et al., 1996) é uma escala que avalia, principalmente, aspectos cognitivos relacionados à depressão (anexo 2). Apresenta 21 itens, cada um variando de 0 (neutro) a 3 (grau máximo de severidade). O escore varia de 0 a 63. Ausência de transtorno de humor = 1 – 10; transtorno de humor moderado = 11 – 16; transtorno depressivo clínico borderline = 17 – 20; depressão moderada = 21 – 30; depressão grave = 31 – 40; depressão severa = > 40.

f) A variabilidade genética dos indivíduos em relação a genes candidatos, relacionados ao relógio biológico, será realizado no Instituto de Cronobiologia da Universidade de Munique, na Alemanha. O primeiro estudo realizado pelo grupo de Munique considerou 160 polimorfismos (SNPs; single nucleotide polymorphisms) em 19 genes. As amostras adquiridas nesse projeto serão enviadas para a Alemanha para fazer a repetição do mesmo estudo, com a intenção de obter a validação dos resultados. O DNA será extraído do sangue usando o método de isolamento rápido de Lahiri e colaboradores (Lahiri et al., 1993). As atividades de laboratório, o design do estudo e o financiamento dos custos com a genotipagem serão responsabilidades do Grupo Alemão.

Procedimentos

a) Treinamento da equipe, constituída por três professores da UFRGS e duas professoras da UNIVATES. Incorporam-se à mesma, vinte alunos de iniciação cientifica da UNIVATES.

b) Reunião com os Prefeitos e Secretários de Saúde dos municípios envolvidos.

c) Coleta de dados na primeira fase – serão entrevistados aproximadamente 7500 sujeitos dos municípios eleitos. A alocação dos mesmos será por randomização das ruas ou linhas.

d) Os avaliadores se deslocarão até os locais de avaliação por meio de veículo da

UNIVATES e deverão estar devidamente identificados. A coleta acontecerá nos três turnos – manhã, tarde e noite.

e) Os indivíduos que participarão da pesquisa serão localizados por sorteio de linhas, ruas e municípios. A avaliação acontecerá, na residência dos sujeitos de pesquisa, em local que permita a privacidade ao sujeito de pesquisa, após a apresentação do estudo caso o sujeito forneça o consentimento livre e esclarecido, quando, na primeira fase, proceder-se-á à aplicação de um questionário para aferição de variáveis sócio-demográficas, o Questionário HIT-6 para aferir a presença de cefaléia e seu impacto na vida diária. Além disso, avaliar-se-á o nível de sintomas depressivos por meio do Inventário de Depressão de Beck.

f) Os dados coletados na primeira fase após serem analisados identificarão os sujeitos extremos caracterizados como matutinos e vespertinos. Os indivíduos classificados como indiferentes serão utilizados como grupo controle

g) A pesquisa de campo prosseguirá utilizando o segundo consentimento livre e esclarecido, com 15% e 20% da amostra inicial dos indivíduos selecionados como cronotipos extremos. Adiciona-se a esses, uma subamostra dos indivíduos intermediários, em igual número aos extremos, selecionada por proximidade geográfica aos mesmos

h) Os sujeitos que participarão da segunda etapa do estudo responderão aos seguintes instrumentos: questionário de qualidade de vida (WHOQOL), Questionário de Pittsburg para avaliar a qualidade de sono; teste de auto-eficácia e de hábitos de vida,

dados étnicos e de relações familiares para a construção de uma árvore genealógica.

i) Serão coletados de 5-10 ml de sangue em EDTA. O sangue deverá ser mantido refrigerado e depois da separação dos leucócitos, congelado à -20 à -80° C. A amostra do DNA e o controle de qualidade serão necessários para evitar o uso de DNA degradado ou contaminado, para isso utilizar-se-á o protocolo DNA in multiplex PCR protocols. A concentração do DNA versus proteína e RNA será determinada usando um fotômetro espectral altamente sensível, e a integridade do DNA será verificada em agarose gel.

Controle de Qualidade

As instruções para aplicar as escalas, bem como os sinônimos das palavras, constam num manual de instruções. Se necessário, o avaliador auxiliará o sujeito na leitura das questões durante a aplicação dos questionários. Também, todos os sujeitos responderão a um questionário estruturado para avaliar características demográficas, renda, e genealogia.

Aproximadamente 10% das entrevistas serão conferidas por um dos responsáveis pelo projeto por via telefônica quando possível ou contato pessoal. Serão selecionadas algumas variáveis demográficas para averiguar a confiabilidade da coleta de dados.

Os questionários serão avaliados semanalmente pelos coordenadores e por três auxiliares de pesquisa.

Processamento dos Dados e Análise Estatística

Os dados serão analisados por meio do programa SPSS. Utilizar-se-á a análise múltipla de covariância (MANCOVA), para comparar a interação entre os perfis fenotípicos com qualidade de sono, estado de saúde e qualidade vida e domínio das situações de estresse e adaptação. As análises de associação fenótipo-genótipo serão feitas considerando a estrutura familial dos indivíduos. Somente serão considerados SNPs em equilíbrio de Hardy-Weimberg e com uma freqüência alélica acima de 1%. Essas análises serão realizadas pelo grupo de Munique.

Aspectos Éticos

O protocolo segue as condições estabelecidas na Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde (CNS). Após os sujeitos serem informadas da finalidade do estudo, deverão consentir por escrito a sua participação. Em se tratando de menores de 18 anos o responsável legal deverá assinar conjuntamente o termo de consentimento de permissão de participação. O projeto será submetido à aprovação aos Comitês de Éticas da Universidade de Munique, UNIVATES e HCPA/UFRGS.

Descrição das Metas de Formação e Capacitação Almejadas

Com esta proposta temos como objetivo estimular, mediante projeto de pesquisa conjunto, o intercâmbio de docentes e pesquisadores entre o Brasil e a Alemanha. A execução deste projeto tem como meta principal a formação de profissionais qualificados para pesquisa clínica e experimental com ênfase nos estudos em cronobiologia. Contribuiremos com a formação de recursos humanos na pós-graduação, considerando a absorção de jovens doutores para atuarem nesse projeto, além de alunos de mestrado e doutorado. Devemos considerar também a participação de alunos de iniciação científica essenciais para a continuidade na formação de recursos humanos. Além disso, pretende-se a publicação de trabalhos em periódicos internacionais Qualis A. Adicionalmente, este intercâmbio contribuirá com a geração de conhecimentos em nível de pós-graduação senso stricto, colaborando com o desenvolvimento de um grupo em formação.

Adicionalmente, com este projeto espera-se solidificar uma linha de pesquisa interdisciplinar que integre o estudo dos ritmos biológicos, avaliado por meio dos perfis fenotípicos e genotípicos, com condições ambientais e culturais, estado de humor, qualidades de sono e de vida. Como resultado maior, buscamos contribuir com o desenvolvimento da pós-graduação e dos grupos de pesquisa envolvidos, colaborando tanto qualitativa quanto quantitativamente com o desempenho científico e tecnológico do País. A colaboração entre os três grupos com possível intercâmbio, poderá auxiliar no fortalecimento da competitividade internacional da pesquisa brasileira através da inovação e desenvolvimento regional inserido em uma política de desenvolvimento local.

Identificação das Linhas de Atuação na Área Pretendida

A justificativa deste estudo pauta-se na importância das repercussões na saúde da população de aspectos cronobiológicos em especial a característica de matutinidade/vespertinidade (cronotipo). Ressalta-se que é uma área que vem se desenvolvendo, mas ainda encontra-se incipiente. Considerando tais aspectos, ainda existe espaço para essa investigação. Estamos escolhendo uma população por apresentar características que facilitem o estudo da genotipagem pela sua homogeneidade, além do estudo da associação com indicadores de saúde. Essas informações poderão ser de grande valor para planejar intervenções específicas que possam melhorar a qualidade de vida e planejamento junto aos órgãos estatais de intervenções preventivas e de promoção à saúde.

Sendo o grupo composto de professores com Dedicação Exclusiva à Universidade, mas recém ingressos na mesma, o recurso financeiro será fundamental para o desenvolvimento deste projeto, que servirá de alavanca para o crescimento e intercâmbio internacional.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adicionadas no corpo principal da Tese, página 88.

ANEXO II

RESULTADOS

RESULTADOS

O presente trabalho foi realizado pelo núcleo de pesquisa de Cronobiologia do Hospital de Clinicas em colaboração com a Universidade de Munique na Alemanha *(Ludwig-Maximilians-University of Munich - LMU).*

Uma grande base de dados, de 6.500 sujeitos, foi gerada nesta fase e está sendo avaliada de acordo com os demais objetivos do projeto. A segunda fase de coleta de dados já está concluída e encontra-se em processo de análise do material biológico, os quais serão avaliados em estudos de associação com indicadores de saúde pelos integrantes deste trabalho.

Devido à importância dos sintomas subclínicos de depressão em saúde pública, neste estudo foi selecionada uma população geral onde foram avaliados os sintomas depressivos, utilizando a versão em português do Inventário de Depressão de Beck. Estudos prévios, realizados em nosso grupo, evidenciaram que a tipologia vespertina esteve associada a uma maior prevalência de sintomas depressivos. Para avaliar a hipótese de que a vespertinidade pode ser proposta como um fator de risco para depressão, foram investigadas as relações entre cronotipo e a manifestação de sintomas depressivos.

A maioria dos estudos anteriores que investigou essas relações foi focada sobre as populações urbanas e tem avaliado a preferência de matutinidade e vespertinidade, utilizando o Questionário de Matutinidade e Vespertinidade (MEQ). Nesse estudo a tipologia cronotípica foi aferida pela fase de sono em uma população essencialmente rural. A grande vantagem dessa abordagem é que podemos controlar os fatores de confusão, como idade, sexo, exposição à luz e sua heterogeneidade socioeconômica.

A escolha do MCTQ neste trabalho reside no fato deste apresentar boa correlação com o tempo de sono nos dias livres, que refletem o débito de sono acumulado nos dias de trabalho. Esse dado permite realizar uma avaliação mais precisa da interferência do débito de sono acumulado durante os dias de trabalho e sua relação com o processo de dessincronização interna como fator intrínseco nos processos de morbidade.

A seguir serão descritos os resultados gerais da amostra, a tipologia circadiana da fase de sono e os resultados das analises realizadas para estabelecer a relação entre sintomas depressivos, cronotipo e jet lag social.

Características Gerais da Amostra

Cidades pesquisadas

Ao final do estudo foram incluídas doze cidades do Vale do Taquari que apresentavam uma característica de descendência predominantemente caucasiana, com descendência européia. A figura 9 representa a distribuição percentual por cidade avaliada em relação ao total da amostra.

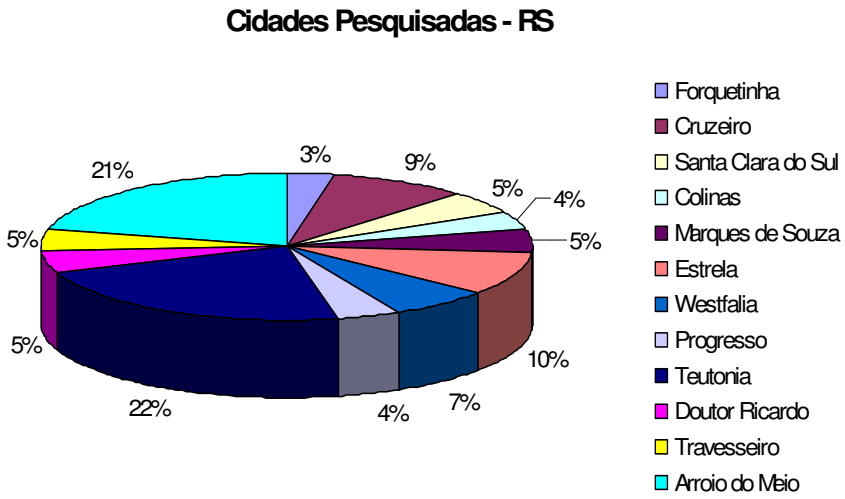


Figura 9. Distribuição percentual da amostra total pesquisada de acordo com as cidades pesquisadas no Vale do Taquari, Rio Grande do Sul, Brasil.

Características Gerais

As características gerais da mostra são mostradas na tabela 1. A partir dos dados

obtidos, pode-se perceber que a maioria dos entrevistados foi do sexo feminino 66,9% com uma idade média de 42 anos de idade.

O nível de escolaridade foi avaliado através da média de anos de estudo formal. Em média, os indivíduos pesquisados relataram menos que 7 anos de escola, correspondendo ao 1 grau incompleto. Do total da amostra apenas 25% dos indivíduos completaram o segundo grau ou iniciaram o estudo de nível superior.

Tabela 1. Características gerais da amostra

Variável	**População Geral N = 6.450**
Idade	42,03 ± 14,91
Gênero	
Masculino	2.132 (33,1)
Feminino	4.318 (66,9)
Educação Formal (anos)	6,79 ± 3,23
Fumante (sim)	774 (12)
IMC	25,46 ± 4,74
Doenças (sim)	2.377 (36,9)
Medicamentos (sim)	2.582 (40)
Exposição a Pesticidas (sim)	2.900 (45)
Dias de trabalho semanal	5,86 ± 1,88
Escores da escala de BECK	5,60 ± 5,64

Quanto à distribuição das faixas etárias, pode-se observar que 10% da amostra apresentou idade de 12 a 18 anos e 40% apresentou idade igual ou maior que 50 anos de idade.

A figura 10 mostra a distribuição nas diferentes faixas etárias avaliadas por gênero.

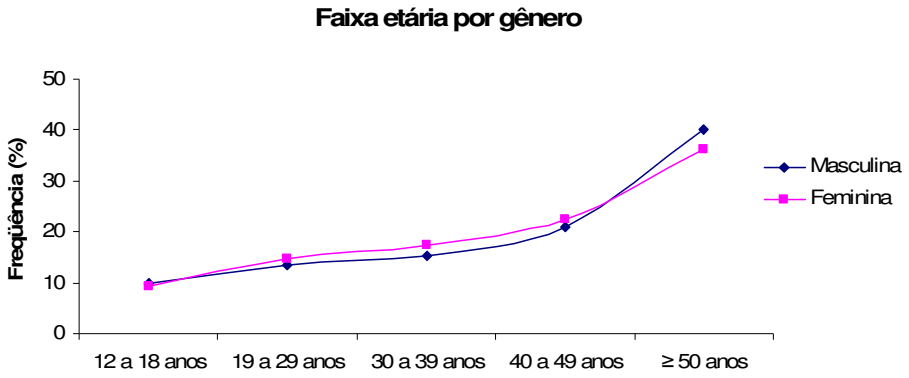


Figura 10. Distribuição percentual da amostra de acordo com a faixa etária e gênero.

A distribuição dos indivíduos quanto ao local de trabalho mostrou que a grande maioria apresenta uma atividade essencialmente agrária, representando 40% da população geral. Apenas 9% desta população apresentam atividade laboral relacionada à indústria e comércio (figura 11).

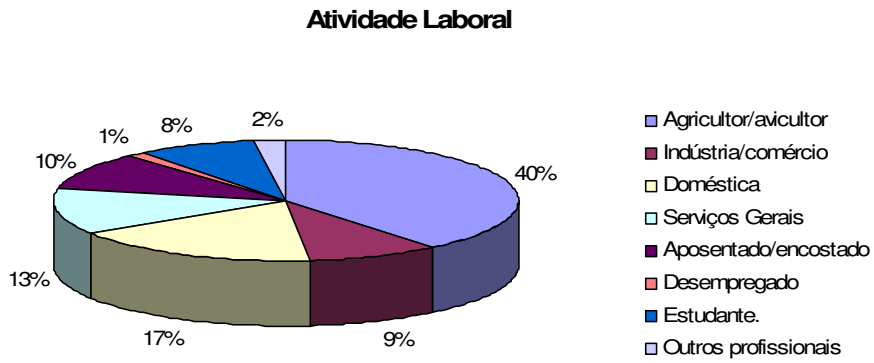


Figura 11. Distribuição percentual da amostra de acordo com a atividade laboral relatada.

Cinqüenta e nove por cento dos entrevistados informaram que possuem uma jornada de trabalho de 7 dias semanais relacionadas com a atividade rural. (figura 12).

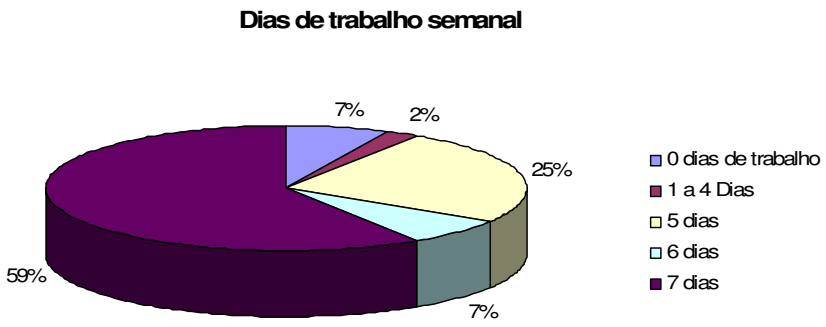


Figura 12. Distribuição percentual dos dias trabalhados semanalmente.

A prevalência de doenças segundo o autorelato dos indivíduos pesquisados foi de 36,9% (figura 13). A maior prevalência foi de hipertensão (34,59%), seguida dos distúrbios do metabolismo (10,39%), transtorno depressivo recorrente (7,21%) e diabetes (3,56%).

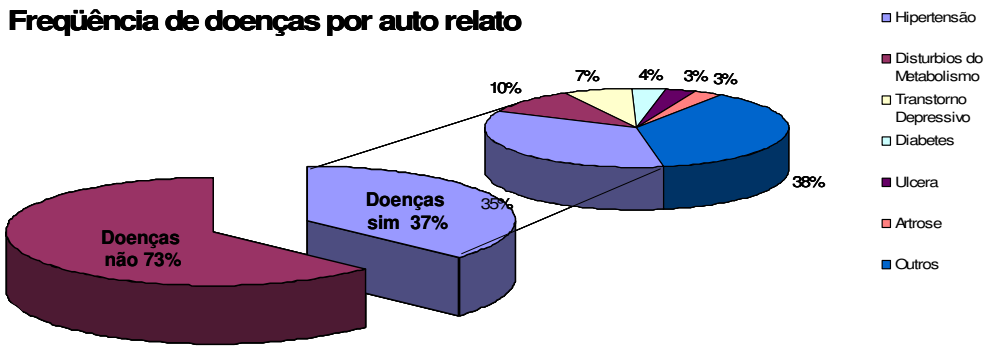


Figura 13. Freqüência de doenças autorelatadas na amostra total.

Tipologia Cronotipica da Amostra

A tipologia cronotípica foi estabelecida usando o Questionário de Cronotipo de Munique (Munich ChronoType Questionnaire MCTQ) que utiliza como marcador para estabelecer os diferentes cronotipos a meia fase do sono. O MCTQ é calculado utilizando os dados do ritmo de dormir e acordar nos dias livres e de trabalho, corrigindo para o débito de sono dos dias de trabalho, conforme descrito a baixo.

Seleção da Amostra para Avaliação do Cronotipo com o MCTQ

Considerando que o Questionário de Cronotipo de Munique utiliza o meio período de sono de cada individuo para mensurar os diferentes cronotipos da amostra, antes de determinar a tipologia circadiana e classificar os indivíduos pesquisados é necessário utilizar um critério de seleção que permita eliminar as possíveis causas externas com potencial para interferir na fase de sono dos indivíduos pesquisados. Utilizando os critérios estabelecidos pela equipe de Munique, na amostra pesquisada foram excluídos os indivíduos que estavam realizando trabalho em turnos rotativos ou noturno, em utilização de fármacos que interferiam no sono, como benzodiazepínicos, ou com atividade sobre o SNC e beta bloqueadores (tabela 2). Os sujeitos com tempo de sono < 3 h ou > 15 horas de sono também foram excluídos pela possibilidade de se tratar de patologias relacionadas ao sono.

Tabela 2. Grupos farmacológicos e fármacos excluídos da amostra, utilizando o critério de Classificação Anatômica Terapêutica (ATC)

Grupo farmacológico	Classificação Anatômica Terapêutica (ATC)
Benzodiazepínicos	N05CD, N05CF
Barbitúricos	N01AF, N01AG, N03AA, N05CA, N05CB, N05CX
Imipramina	N06AA02, N06AA03, N06AA06
Nortriptilina	N06AA10
Neurolepticos	N05AK
Fenotiazinas	N05AB, N05AC, N05AA
Fluoxetina	N06AB03
Sertralina	N06AB06
Paroxetina	N06AB05
ß-Bloqueadores, propranolol	C07, S01ED
Anfetamina	N06B

Tabela 3. Características da amostra antes e após a seleção

Variável	**População Geral N = 6.450**	**População Selecionada N = 4.051**	**Test (*Teste t; Man Whitney ou* X^2 *)**
Idade	42,03 ± 14,91	44,06 ± 13,39	-7,28**
Gênero			-0,02
Masculino	2.132 (33,1)	1.340 (33,1)	
Feminino	4.318 (66,9)	2.711 (66,9)	
Educação Formal (anos)	6,79 ± 3,23	6,90 ± 3,44	-1,55
Fumante (sim)	774 (12)	533 (13,2)	-1,77
IMC	25,46 ± 4,74	25,79 ± 4,67	-3,55**
Doenças (sim)	2.377 (36,9)	1.430 (35,3)	-1,63
Medicamentos (sim)	2.582 (40)	1.458 (36,0)	-4,11**
Exposição a Pesticidas (sim)	2.900 (45)	1.682 (41,5)	-3,47*
Dias de trabalho semanal	5,86 ± 1,88	5,86 ± 1,91	-0,28
Latência do sono dias de trabalho	16,90 ± 29,25	16,86 ± 29,91	0,76
Duração do Sono dias de trabalho	7,74 ± 1,31	7,76 ± 1,27	-0,99
Ponto médio de sono dias de trabalho	2,51± 1,42	2,32 ± 0,92	-2,29*
Latência do sono dias livres	15,39± 28,41	15,12 ± 28,82	0,47
Duração do Sono dias livres	8,22 ± 1,55	8,22 ± 1,46	-0,26
Ponto médio de sono dias livres	3,06 ± 1,50	3,02 ± 1,37	1,57
Tempo de exposição a luz	8,58 ± 3,05	8,73± 3,07	-2,52*
Escores da escala de BECK	5,60± 5,64	5,27 ± 5,26	-2,44*
Jet Lag Social	0,55± 1,38	0,74 ± 0,99	-8,48**
MSFscn	2,79 ± 1,44	2,76 ± 1,17	1,39

As características da amostra, antes e depois da seleção realizada, estão sumarizadas na tabela 3. Os parâmetros que apresentam uma relação com a faixa etária, como a presença de doenças e uso de medicações para o sono apresentaram uma diferença significativa após o processo de seleção da amostra. Assim como era de se esperar, os parâmetros relacionados ao

sono, utilizados pelo MCTQ para avaliar a tipologia circadiana também apresentaram diferença significativa (tabela 3).

Distribuição do MSFsc na Amostra

A distribuição da freqüência do MSFsc na amostra, mostrou uma curva de distribuição próxima do normal (figura 14). Considerando o horário local, o meio período de sono variou das 23:00 horas até 10:15 horas (hora local). A média do meio período de sono foi de 2,76 horas, com um desvio padrão de 1,17 horas. A figura 14 mostra a distribuição dos valores do meio período de sono encontrados nesta população essencialmente rural.

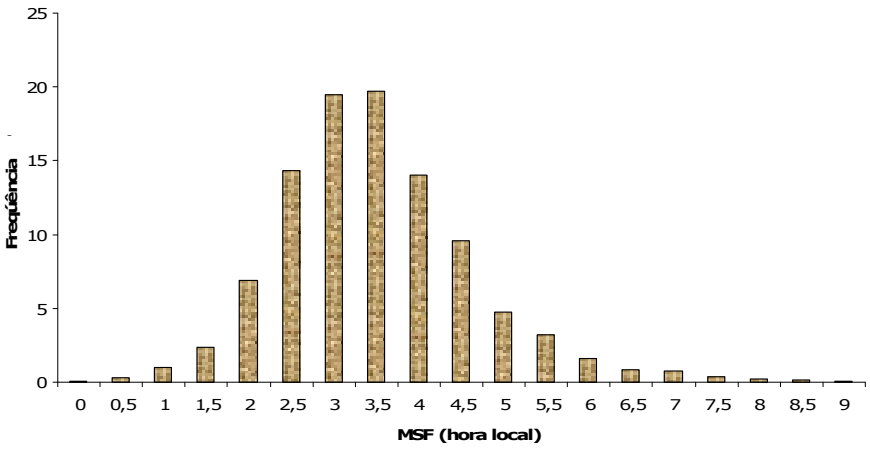


Figura 14. Distribuição da amostra de acordo com o ponto médio do sono nos dias livres da amostra avaliada.

Dependência da idade na Distribuição do MSFsc

A distribuição do MSFsc apresentou uma dependência direta com a idade, sendo que os indivíduos mais jovens da amostra apresentaram um maior MSFsc. Com o avanço da idade pode ser observado o atraso na fase de sono, observada pela redução do meio período de sono na amostra estudada (figura 15). O gênero apresentou uma ligeira diferença para os extremos de idade, sendo que na adolescência o gênero masculino apresentou um maior MSFsc em relação ao feminino. Esta relação é invertida na faixa etária acima dos 50 anos, onde o gênero masculino apresenta um menor MSFsc.

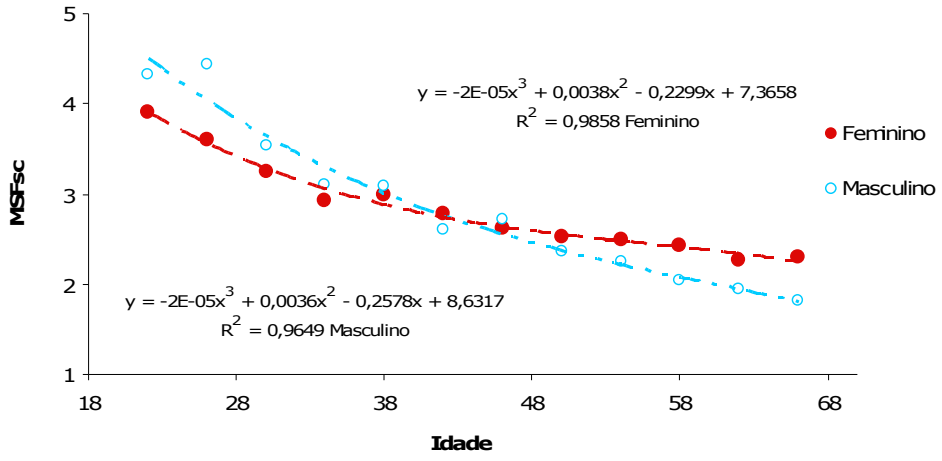


Figura 15. Distribuição das médias do MSFsc de acordo com a faixa etária e gênero da amostra avaliada.

Prevalência e Distribuição dos Sintomas Depresivos

Os níveis de sintomas depressivos foram avaliados por meio do Inventário para Depressão de Beck, validado para a língua portuguesa (Gorenstein *et al.*, 1996). Os resultados foram categorizados, conforme a tabela 4, utilizando os critérios estabelecidos para uma população geral (Lasa *et al.*, 2000). Aproximadamente 84% apresentaram escores ≤ 9 da amostra; enquanto que 15,65% foram classificados para a presença de sintomas depressivos, com um ponto de corte ≥ 10 na BECK.

Tabela 4. Prevalência de sintomas depressivos na amostra estudada

Classificação dos escores da BECK	**Homens % (N)**	**Mulheres % (N)**	**Total % (N)**
Sintomas depressivos mínimos ou ausentes (< 10)	90,75 (1.216)	81,19 (2.201)	84,35 (3.417)
Sintomas depressivos leves (10 a 16)	7,61 (102)	13,72 (372)	11,70 (474)
Sintomas depressivos moderados (17 a 29)	1,42 (19)	4,39 (119)	3,41 (138)
Sintomas depressivos severos (≥ 30)	0,22 (3)	0,70 (19)	0,54 (22)
Total	33,08 (1.340)	66,92 (2.711)	100 (4.051)

Dependência da idade na Distribuição dos Escores da BECK

A distribuição dos escores médios da BECK apresentou uma dependência direta com as variáveis de idade e gênero, mostrado na figura 16. O gênero feminino apresentou escores maiores para todas as idades em relação ao masculino, avaliado através do teste de Mann-Whitney *U*-Test, com valor de $p < 0{,}01$. Os indivíduos mais jovens apresentaram menores valores médios nos escores da BECK, marcados com uma diferença significativa a partir da faixa etária de 50 anos para ambos os gêneros (Mann-Whitney *U*-Test, $p < 0{,}001$).

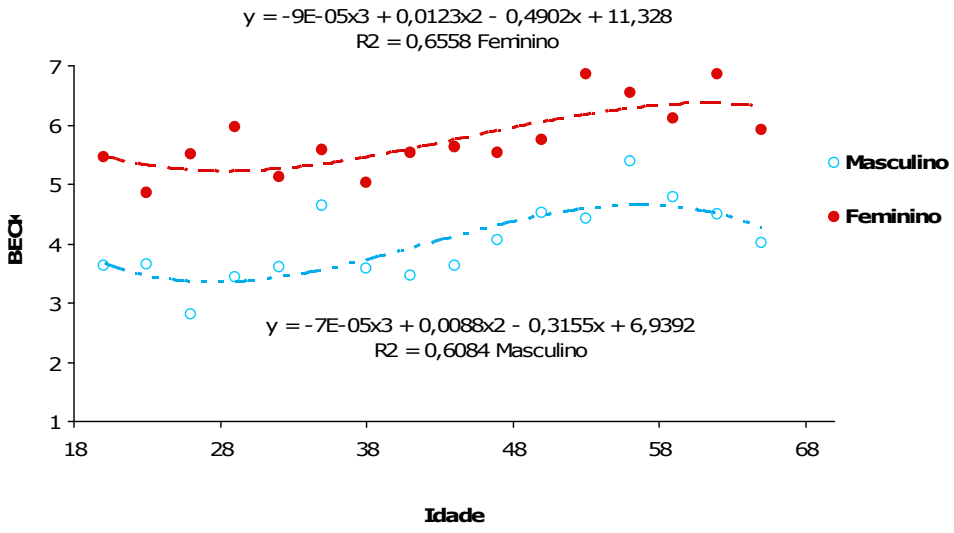


Figura 16. Distribuição das médias de sintomas depressivos de acordo com a faixa etária e gênero da amostra avaliada.

Os valores médios de sintomas depressivos de acordo com a idade e gênero apresentaram a seguinte distribuição (média ± desvio padrão): para a faixa de 18 a 30 anos, 5,4

± 0,24 (feminino, N = 634) e 3,4 ± 0,24 (masculino, N = 247); 31 a 40 anos, 5,3 ± 0,26 (feminino, N = 479) e 3,8 ± 0,30 (masculino, N = 210); 41 a 50 anos, 5,7 ± 0,21 (feminino, N = 631) e 4,0 ± 0,26 (masculino, N = 286), e para maiores de 50 anos, 6,5 ± 0,18 (feminino, N = 967) e 4,6 ± 0,17 (masculino, N = 597).

Classificação do Cronotipo Utilizando o MSFsc

O cronotipo do individuo avaliado é então utilizado para classificar de acordo com a distribuição MSFsc na população à qual ele pertence utilizando-se o critério de ponto de corte, separando a população em três partes. Os valores mais baixos do MSFsc correspondem ao tipo matutino (*early type*), enquanto que os valores maiores correspondem ao tipo vespertino (*late type*) (Roenneberg et al., 2004). De acordo com estes critérios, os resultados referentes a classificação da amostra foram assim divididos: N = 1.337 para o tipo matutino (*early type*), N = 1.365 para o tipo intermediário e N = 1.349 para o tipo vespertino (*late type*).

Abordagem Cronobiológica dos Sintomas Depresivos

A relação entre o cronotipo e o risco de sintomas depressivos foi avaliada nesta Tese buscando explorar um modelo de análise para explicar esta relação no domínio do relógio circadiano interno, tendo como perspectiva as condições de vida persistentes que perturbam as rotinas sociais, alterando a exposição aos *zeitgebers*, através da diferença entre os períodos de

sono nos dias de trabalho e nos dias livres, provocando um desalinhamento entre os fatores endógenos e os fatores exógenos da ritmicidade biológica.

Conforme demonstrados nos resultados prévios, foi observada a dependência entre as variáveis de idade e gênero tanto para a distribuição do MSFsc (figura 15), quanto para a distribuição dos escores da BECK (figura 16). Para minimizar a influência destas variáveis sobre as análises entre os sintomas depressivos e cronotipo, os dados deste estudo foram normalizados para as variáveis idade e gênero. Foram utilizados os conceitos matemáticos da função do valor x e sua correspondência por um elemento y, também denotado por f(x) para obter o valor normalizado de todos os individuos da amostra. Devido a existência de inúmeras funções matemáticas, diversos modelos foram testados durante o desenvolvimento desta tese. Na tabela 4 são apresentadas as equações utilizadas de acordo com o gênero, faixa etária e variável normalizada. Esta estratégia foi utilizada para o processo de normalização dos dados e eliminar a dependência destas variáveis sobre as análises subsequentes. Os escores de sintomas depressivos apresentaram uma variabilidade de acordo com a faixa etária, motivo pelo qual foram utilizadas curvas de normalização de acordo com a faixa etária.

Os valores da BECK, após a normalização, apresentaram uma distribuição próxima do normal (*skewness* = 1,09), variando de -35 a 77. Estes novos valores indicam a posição de cada indivíduo em relação aos valores médios de sintomas depressivos da população para um determinado sexo ou faixa etária.

Tabela 5. Equações matemáticas utilizadas para o ajuste das variáveis em estudo

Variáveis	Idade	Homens	Mulheres
IMC	18 to 65	y = 5E-05x3 – 0,0095x2 + 0,5461x + 16,279 R^2 = 0,8472	y = 4E-05x3 - 0,0067x2 + 0,4462x + 15,967 R^2 = 0,9731
MSFsas		y = -2E-05x3 + 0,0036x2 - 0,2578x + 8,6317 R^2 = 0,9649	y = -2E-05x3 + 0,0038x2 - 0,2299x + 7,3658 R^2 = 0,9858
AvSD		y = -5E-08x3 + 0,0009x2 - 0,0605x + 8,6903 R^2 = 0,9021	y = 2E-06x3 + 0,0005x2 - 0,07x + 9,4985 R^2 = 0,9709
BECK	18 to 29	y = 0,014x2 – 0,654x + 10,8 R^2 = 1	y = 0,0322x2 - 1,241x + 16,84 R^2 = 1
BECK	>= 30	y = -0,0004x3 + 0,0568x2 - 2,4935x + 39,117 R^2 = 0,9026	y = -0,0001x3 + 0,0164x2 - 0,6964x + 14,673 R^2 = 0,8156

Análise dos Sintomas Depressivos e Cronotipo

A comparação dos níveis de sintomas depressivos em relação à tipologia circadiana foi realizada com as variáveis normalizadas para idade e gênero. Na figura 17 é mostrada a distribuição das médias de sintomas depressivos em relação ao ponto médio do sono. A distribuição BECKas mostrou uma correlação não linear com o MSFsas (*Pearson* = 0,094; $p < 0,0001$). Essa correlação parabólica mostrou que os sintomas depressivos predominaram entre os indivíduos que deitam tarde, mas também os tipos matutinos apresentaram uma tendência de maior pontuação na escala BECK que os tipos intermediários.

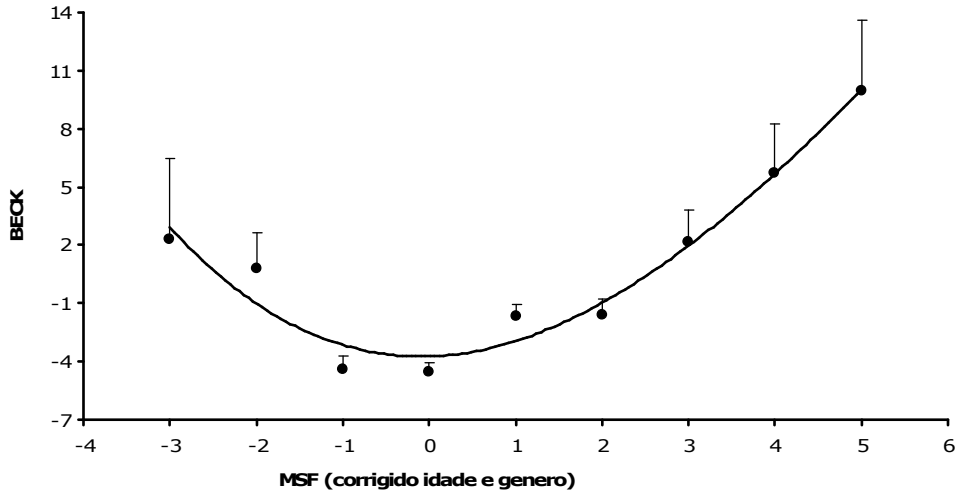


Figura 17. Distribuição das médias de sintomas depressivos (BECK) de acordo com o ponto médio do sono (MSF). Variáveis normalizadas para idade e gênero.

Comparando os valores médios da BECKas através de ANOVA de uma via, houve diferença significativa entre os cronotipos (Tabela 5). Os tipos vespertinos relatavam maiores sintomas de depressão quando comparados com os tipos intermediários, não houve diferença significativa para sintomas depressivos entre os tipos matutinos e os intermediários (Tabela 5; ANOVA: F = 23,14; $p < 0,0001$). Estes resultados permanecem significativos mesmo após a estratificação para os grupos de fumantes e não fumantes (N = 533; Kruskal-Wallis = 15,6; $p < 0,0001$, e N = 3.518, Kruskal-Wallis = 69,8, $p < 0,0001$, respectivamente).

Tabela 6. Comparações múltiplas utilizando a ANOVA de uma via

ANOVA de uma via		F	Diferença de médias	Erro Padrão	*p*	Intervalo de Confiança 95%	
Variável dependente: BECKas		23,14			$1,02\ E^{-10}$		
Tipo Intermediário	Tipo Matutino		- 0,49	0,70	0,77	- 2,13	1,16
	Tipo Vespertino		- 4,35	0,70	$6,69\ E^{-9}$	- 5,99	- 2,71
Variável dependente: BECKas		79,36			$1,54\ E^{-34}$		
Jet lag Social ≤ 2 h	Jet lag Social 2 to 4 h		- 12,23	1,05	$5,10\ E^{-9}$	- 14,69	- 9,78
	Jet lag Social ≥ 4 h		- 12,37	2,40	$8,04\ E^{-7}$	- 18,00	- 6.74

ANOVA de uma via seguida de teste de Tuckey . BECK = Inventário de depressão de Beck normalizado para idade e gênero. Os grupos matutinos (N = 1.337), intermediários (N = 1.365) e vespertinos (N = 1.349) foram definidos conforme descrito no texto.

Análise dos Sintomas Depressivos e Jet Lag Social

Duração do sono também difere marcadamente entre dias de trabalho e os dias livres, considerada como um comportamento dependente dos diferentes cronotipos. Em média, os indivíduos dormem 1 hora mais tarde nos dias livres, com indivíduos extremos podendo chegar a uma diferença de até 10 horas. Esta característica torna-se ainda mais evidente quando são avaliados os cronotipos vespertinos. Para fins de comparação, foram definidos três grupos de jet lag social (≤ 2 horas, N = 3674; 2 a 4 horas, N = 320, e > 4 horas, N = 57).

O jet lag social mostrou uma correlação positiva tanto com MSFsas (correlação de *Spearman* $r^2 = 0,381$, $p < 0,0001$) e BECKas (correlação de *Spearman* $r^2 = 0,297$, $p < 0,0001$). Como pode ser observado na figura 18, quanto maior o jet lag social, mais intenso foram os

sintomas depressivos. Os indivíduos que apresentaram jet lag social entre 0 e 2 horas (N = 3.674) relataram sintomas significativamente menores de depressão do que aqueles que apresentaram 2 a 4 horas (N = 320), ou mais de 4 horas (N = 57, ANOVA: F = 79,36, $p <$ 0,0001, Tabela 5). No entanto, os participantes com mais de 4 horas de jet lag social não relataram mais sintomas de depressão do que aqueles que têm 3 a 4 horas.

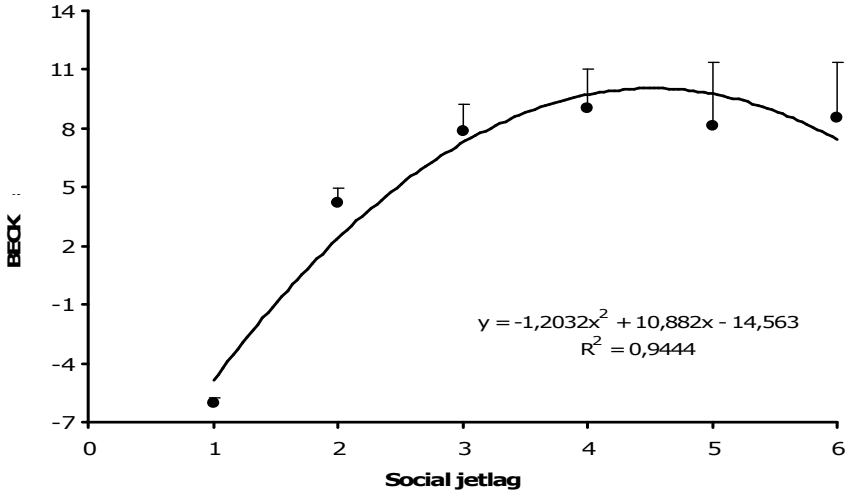


Figura 18. Distribuição das médias de sintomas depressivos de acordo com o jet lag social (diferença entre o ponto médio do sono dos dias livres em relação aos dias de trabalho). Variáveis normalizadas após correção para idade e gênero.

A correlação entre o nível de sintomas depressivos e o jet lag social, não ocorreu somente nos grupos vespertinos, mas também entre os tipos intermediários e matutinos (correlações de *Spearman* $r^2 = 0,233$, $p < 0,0001$; $r^2 = 0,275$, $p = 0,0001$ e $r^2 = 0,311$, $p <$ 0,0001, respectivamente).

Para completar a análise diferencial entre os níveis de sintomas depressivos, cronotipo e jet lag social foi utilizada a análise de regressão linear múltipla. O BECKsas foi utilizado como variável dependente utilizada para o controle de colinearidade e potenciais fatores de confusão. O modelo S*tep Wise* foi utilizado por permitir o controle de adição das possíveis variáveis de confusão no modelo. As variáveis MSF, jet lag social, fumo e tempo de exposição à luz foram fatores independentes capazes de predizer a presença de sintomas depressivos no modelo utilizado (r^2 = 0,103; F = 116,31; p < 0,0001).

Tabela 7 Regressão linear múltipla

Regressão Linear		F	R^2	Erro padrão	B	*T*	*p*	Intervalo de confiança 95%	
Passo 1		36,3	0, 009				$1,83E^{-09}$		
Variável	(Constante)			0, 291		-9, 046	$2,24E^{-19}$	-3,20	-2,06
	MSFsas			0, 243	0, 094	6, 025	$1,83E^{-09}$	0,98	1,94
Passo 2		187,6	0, 084				$1,25E^{-78}$		
Variável	(Constante)			0, 387		-19,47	$9,22E^{-81}$	-8,29	-6, 787
	MSFsas			0, 272	-0, 069	-3,98	$6,94E^{-05}$	-1,62	-0,55
	Jet Lag Social			0, 322	0, 321	18,32	$3,98E^{-72}$	5,27	6,53
Passo 3		126,7	0,086				$1,85E^{-78}$		
Variável	(Constante)			1,56		-2,73	$6,38E^{-03}$	-7,31	-1,20
	MSFsas			0,27	-0,07	-4,18	$3,04^{-05}$	-1,68	-0,60
	Jet Lag Social			0,32	0,32	18,43	$6,99E^{-73}$	5,31	6,58
	Fumo			0,82	-0,03	-2,17	0,03	-3,38	-0,17
Passo 4		116,3	0, 103				$4,96E^{-94}$		
Variável	(Constante)			1,80		2,17	0,03	0,38	7,45
	MSFsas			0,27	-0,07	-3,87	$1,13E^{-04}$	-1,58	-0,52
	Jet Lag Social			0,33	0,29	16,12	$1,08E^{-56}$	4,64	5,93
	Fumo			0,81	-0,04	-2,58	$9,99E^{-03}$	-3,68	-0,50
	Período de exposição à luz			0,09	-0,13	-8,82	$1,64E^{-18}$	-0,99	-0,63

*Regressão Linear Múltipla, modelo Entered/Removed foi usado utilizando os sintomas de depressão (BECKsas) como variável dependente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adicionadas no corpo principal da Tese, página 88.

Anexo III

OUTROS ARTIGOS PUBLICADOS

OUTROS ARTIGOS PUBLICADOS DURANTE O DOUTORADO

Schneider MLM, Vasconcellos, D.C., Dantas, G., **Levandovski, R**., Caumo, W., Allebrandt, K.V., Hidalgo, M.P.L. Morningness-eveningness, use of stimulants, and minor psychiatric disorder among undergraduate student. Int J Psychol. 2011Jun; 46 (1): 10-23.

Antunes LC, **Levandovski R**, Dantas G, Caumo W, Hidalgo MP. Obesity and shiftwork: chronobiological aspects. Nutr Res Rev. 2010 Jun;23(1):155-68. Epub 2010 Feb 2. Review. PubMed PMID: 20122305.

Caumo W, **Levandovski R**, Hidalgo MP. Preoperative anxiolytic effect of melatonin and clonidine on postoperative pain and morphine consumption in patients undergoing abdominal hysterectomy: a double-blind, randomized, placebo-controlled study. J Pain. 2009 Jan;10(1):100-8. Epub 2008 Nov 17. PubMed PMID: 19010741.

Levandovski R, Ferreira MB, Hidalgo MP, Konrath CA, da Silva DL, Caumo W. Impact of preoperative anxiolytic on surgical site infection in patients undergoing abdominal hysterectomy. Am J Infect Control. 2008 Dec;36(10):718-26. Epub 2008 Oct 3. PubMed PMID: 18834731.

ANEXO IV

APRESENTAÇOES EM CONGRESSOS INTERNACIONAIS

APRESENTAÇÕES EM CONGRESSOS INTERNACIONAIS

ABSTRACT SUBMISSION 1

26th Conference of the International Society for Chronobiology - ISC 2010 Vigo, Espanha

Category: Chronobiology in Southern Brazil

Type of presentention: Poster

AN EPIDEMIOLOGICAL STUDY OF SYMPTOMS OF DEPRESSION AND CHRONOTYPE USING THE MCTQ

Rosa Levandovski[1], Karla V. Allebrandt[2], Giovana Dantas[1], Till Roenneberg[2], Wolnei Caumo[3], Iraci Torres[3], Maria Paz Loayza Hidalgo[1]

[1]*Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, Faculdade de Medicina - Laboratório de Cronobiologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA)*
[2]*Ludwig-Maximilians-University of Munich, Department of Medical Psychology*
3 Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, Instituto de Ciências Básicas da Saúde – Laboratório de Cronobiologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA)

ABSTRACT

It has been indicated that the study of chronotypes may be relevant to understand the prognosis and etiology of affective disorders. However, chronotype relation to depression has not yet been investigated on epidemiological studies in large cohorts. **Objectives:** The aim of this study was to analyze the relation between chronotypes, assessed with the Munich ChronoType Questionnaire (MCTQ), and symptoms of depression in a rural population from Southern-Brazil. **Methods:** The BECK and the MCTQ were applied to 6,500 (66% females) subjects of aged 18 to 65 year old. **Results:** A one-way ANOVA with Tukey post-hoc test was used after adjusting all variables to age and sex. Later chronotypes associated with depression symptoms severity (F 9.19 $p<0.01$). Higher scores on the BECK scale were also correlated with longer average sleep duration (F 4.96 ; $p<0.01$). **Discussion:** The fact that there is a mismatch between the endogenous circadian timing of sleep and the social or environmental demands may contribute to the factors triggering the process of change in levels of depression observed in this study. It has been recognized that mood disorders are predictors for a number of illnesses. Therefore, understanding the temporal organization of individuals can contribute to improve the treatment of pathologies related to mood disturbance.

Conclusions: Later chronotypes associated with depression symptoms severity suggesting that an oscillation of temporal structure of day life could be related to mood disorders.

ABSTRACT SUBMISSION II

26th Conference of the International Society for Chronobiology - ISC 2010 Vigo, Espanha

Category: Chronobiology in Southern Brazil
Type of presentention: Poster

VALIDATION OF THE MCTQ IN A SAMPLE OF UNDERGRADUATE STUDENTS FROM SOUTHERN BRAZIL

Marilene Farias Alam[1], Karla V. Allebrandt, Mabel Mascarenhas Wiegand[1], Giovana Dantas[4] Rosa Levandovski[4], Euclydes Antônio dos Santos Filho[3], Rosana Mendonça de Souza[3], Maria Paz Loayza Hidalgo[4]

[1]*Universidade Federal de Pelotas (UFPel)*
[2]*Ludwig-Maximilans-University of Munich (LMU), Department of Medical Psychology*
[3]*Fundação Universidade Federal do Rio Grande(FURG)*
[4]*Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS / Laboratório de Cronobiologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA)*

ABSTRACT

Circadian typology is the individual difference that most clearly explains the variations in the rhythmic expression of biological or behavioral patterns. **Objectives: T**o analyze the relation between morningness/eveningness dimension, assessed by the Morningness-Eveningness Questionnaire (MEQ), and chronotype, assessed with the Munich Chronotype Questionnaire (MCTQ). **Methods:** This is a cross-sectional study. The MEQ and the MCTQ were applied to 173 undergraduate students (18 to 35 years old) from Southern Brazil. The correlation between MEQ score and MCTQ questions was analyzed by *Pearson* correlation test. **Results** Morningness/Eveningness Questionnaire showed normal distribution (Means 45.76 ± 10.31). Eveningness presented positive correlation with time to go to sleep (r 0.20; $p<0.01$); time to go to bed (r 0.39; $p<0.01$); time to asleep (r 0.33; $p<0.01$) and exposure to light in free days (r 0.19; $p<0.01$), and a negative correlation with time to wake up (r -0.22; $p<0.01$). **Discussion** Behavioral researches highlight the relevance of systematic application of knowledge on the maintenance of the human temporal organization in which the sleep/wake and other circadian rhythms are included. It is therefore relevant to have instruments to assess the circadian phenotype in human populations. **Conclusions:** We have seen a correlation between MEQ and MCTQ questions related to free days sleep times and environmental light exposure.

ABSTRACT SUBMISSION III

III World Congress of Chronobiology, Puebla, México. May 5-9, 2011

THE ASSOCIATION AMONG SLEEP QUALITY AND MID-SLEEP PHASE WITH USE OF ANTIHYPERTENSIVE DRUGS

Rosa Levandovski[1], Karla V. Allebrandt[2], Till Ronneberg[2], Maria Paz Loayza Hidalgo[3]

[1]*Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, Faculdade de Medicina - Laboratório de Cronobiologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA)*

[2]*Ludwig-Maximilians-University of Munich, Department of Medical Psychology*

3 Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, Departamento de Psiquiatria e Medicina Legal – Laboratório de Cronobiologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA)

ABSTRACT

Hypertension is one the most important clinical disorders in public health and has become a global epidemic disease. It is also a risk factor for a series of pathological conditions such as cardiovascular diseases, which are responsible for 17 million deaths per year (WHO). Recent studies have indicated that low sleep quality is a risk factor for adult hypertension. **Objective:** The objective of this study was to investigate the association of sleep quality and mid-sleep phase with the use of antihypertensive drugs. **Design**: Cross-sectional study. Participants: A total of 1047 subjects (351 men and 696 women) with an average age of 44 ± 12 years, living in a essentially rural area in south of Brazil (latitude 30). Assessments were performed in a period of one year. The population is a community of German descendants, significantly homogeneous in terms of culture, socio-economic level, biological factors, and daily exposure to environmental light. Main outcome measures: Sleep quality was evaluated using the Pittsburgh Scale (PSQI), and mid-sleep phase using the Munich Chronotype Questionnaire (MCTQ). An antihypertensive drug was measured by self-reported information through the use of standard drugs according to pharmacological ATC codes (adrenergic receptor agonists and antagonists, calcium channel blockers, beta blocking agents and diuretics). **Results:** In this study, 20.4% (N = 214) of the participants reported use of antihypertensive drugs. Subjects using antihypertensive drugs showed significantly lower mid-sleep phase (t test = -4.82: p< 0.0001), poor sleep quality (*Man Whitney test*; p< 0.0001), and higher BMI (*t test* 10.82; p<0.0001), and age (t test 14.69; p<0.0001) than those not using antihypertensive drugs. There were no difference between genders (*chi-square*; p=0.224), smoking status (*chi-square*; p=0.487), and sleep duration on free (*t test* -1.36: p=0.174) and work days (*t test* 0.35: p=0.582). A multilinear regression model was used to control colinearity and potential

confounding factors with self related antihypertensive drugs as a dependent variable. BMI, PSQI and mid-sleep phase were independent factors predicting the use of hypertension drugs ($r^2 = 0.25$, $F = 57.60$, $p<0.0001$). **Conclusion:** In this population we found a higher prevalence of the use of antihypertensive drugs, which points to the probability of an over diagnoses of hypertension. In spite of the fact that this was a cross-section study, there was a clear association of poor sleep quality, and an advanced mid-sleep phase with the use of antihypertensive drugs.

ABSTRACT SUBMISSION IV

XI Latin American Symposium of Chronobiology, Cholula, Puebla, Mexico May 4-5, 2011

THE ASSOCIATION AMONG SLEEP QUALITY AND MID-SLEEP PHASE WITH USE OF ANTIHYPERTENSIVE DRUGS

Rosa Levandovski[1], Karla V. Allebrandt[2], Till Ronneberg[2], Maria Paz Loayza Hidalgo[3]

[1]*Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, Faculdade de Medicina - Laboratório de Cronobiologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA)*
[2]*Ludwig-Maximilians-University of Munich, Department of Medical Psychology*
3 Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, Departamento de Psiquiatria e Medicina Legal – Laboratório de Cronobiologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA)

ABSTRACT

Objective: The objective of this study was to investigate the association of sleep quality and mid-sleep phase with the use of antihypertensive drugs. **Design:** Cross-sectional study. Participants: A total of 1047 subjects (351 men and 696 women) with an average age of 44 ± 12 years, living in a essentially rural area in south of Brazil.The population is a community of German descendants, significantly homogeneous in terms of culture, socio-economic level, biological factors, and daily exposure to environmental light. Main outcome measures: Sleep quality was evaluated using the Pittsburgh Scale (PSQI), and mid-sleep phase using the Munich Chronotype Questionnaire (MCTQ). An antihypertensive drug was measured by self-reported information through the use of standard drugs according to pharmacological ATC codes (adrenergic receptor agonists and antagonists, calcium channel blockers, beta blocking agents and diuretics). **Results:** In this study, 20.4% (N = 214) of the participants reported use of antihypertensive drugs. Subjects using antihypertensive drugs showed significantly lower mid-sleep phase (t test = - 4.82: p< 0.0001), poor sleep quality (*Man Whitney test*; p< 0.0001), and higher BMI (*t test* 10.82; p<0.0001), and age (t test 14.69; p<0.0001) than those not using antihypertensive drugs. There were no difference between genders (*chi-square*; p=0.224), smoking status (*chi-square*; p=0.487), and sleep duration on free (*t test* -1.36: p=0.174) and work days (*t test* 0.35: p=0.582). A multilinear regression model was used to control colinearity and potential confounding factors with self related antihypertensive drugs as a dependent variable. BMI, PSQI and mid-sleep phase were independent factors predicting the use of hypertension drugs (r^2 = 0.25, F = 57.60, p<0.0001). **Conclusion:** In spite of the fact that this was a cross-section study, there was a clear association of poor sleep quality, and an advanced mid-sleep phase with the use of antihypertensive drugs.

ANEXO V

INSTRUMENTOS

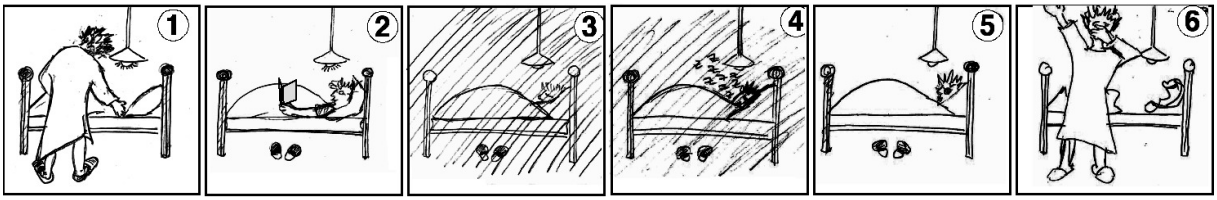
QUESTIONÁRIO DE CRONOTIPO DE MUNIQUE (MCTQ)

Responda todas as questões baseado no seu hábito de sono habitual. As respostas devem diferenciar os dias de trabalho dos dias livres, indicando o que ocorre na maioria dos dias e noites.

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

Sim ☐ Se responder "SIM": quantos dias por semana? 1☐ 2☐ 3☐ 4☐ 5☐ 6☐ 7☐

Não ☐



Use a escala das 24 horas, por exemplo, 23:00 em vez de 11:00!!!

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

Figura 1: Vou para a cama às _____ horas.

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

Figura 3: Às _____ horas, estou pronto para ir dormir.

Figura 4: Necessito de _____ minutos para adormecer.

Figura 5: Acordo às_____ horas.

Figura 6: Passados _____ minutos, levanto-me.

Você usa um despertador nos dias de trabalho? Sim ☐ Não ☐

Se responder "SIM", você acorda regularmente antes do alarme tocar? Sim ☐ Não ☐

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

Figura 1: Vou para a cama às _____ horas.

Figura 2: Algumas pessoas permanecem um tempo acordadas depois que vão se deitar!

Figura 3: Às _____ horas, estou pronto para ir dormir.

Figura 4: Necessito de _____ minutos para adormecer.

Figura 5: Acordo às_____ horas.

Figura 6: Passados _____ minutos acordo.

Os horários que mencionou acima são dependentes do despertador mesmo fora dos dias de trabalho? Sim ☐ Não ☐

Há uma razão pela qual você não possa escolher livremente os seus horários de sono fora dos dias de trabalho? Criança ou animal doméstico ☐ Hobbies ☐ Outro motivo ☐, por exemplo_____

Luz

Em média, quanto tempo por dia você passa exposto à luz do dia (ao ar livre)?

Nos Dias de Trabalho _____horas _____minutos

Fora dos dias de trabalho _____horas _____minutos

INSTRUMENTO II – Inventário de BECK

GRUPO DE PESQUISA EM CRONOFARMACOLOGIA DA DOR E DO COMPORTAMENTO

Nome:_____
Data da entrevista: ____/___/____ **Entrevistador:** _____
Prontuário HCPA:_____**Prontuário CONSULTÓRIO:**_____

Testagem: _____
Nº no Banco: _____

BDI – Inventário de Depressão de Beck

Instruções: Este questionário consiste em 21 grupos de afirmações. Depois de ler cuidadosamente cada grupo, faça um círculo em torno do número (0, 1, 2 ou 3) diante da afirmação, em cada grupo, que descreve melhor a maneira como você tem se sentido. Tome o cuidado de ler todas as afirmações antes de fazer a sua escolha.

1.
0 Não me sinto triste.
1 Eu me sinto triste.
2 Estou sempre triste e não consigo sair disso.
3 Estou tão triste ou infeliz que não consigo suportar.

2.
0 Não estou especialmente desanimado quanto ao futuro.
1 Eu me sinto desanimado quanto ao futuro.
2 Acho que nada tenho a esperar.
3 Acho o futuro sem esperança e tenho a impressão de que as coisas não podem melhorar.

3.
0 Não me sinto um fracasso.
1 Acho que fracassei mais do que uma pessoa comum.
2 Quando olho para trás, na minha vida, tudo o que posso ver é um monte de fracassos.
3 Acho que, como pessoa, sou um completo fracasso

4.
0 Tenho tanto prazer em tudo como antes.
1 Não sinto mais prazer nas coisas como antes.
2 Não encontro um prazer real em mais nada.
3 Estou insatisfeito ou aborrecido com tudo.

5.
0 Não me sinto especialmente culpado.
1 Eu me sinto culpado às vezes.
2 Eu me sinto culpado na maior parte do tempo.
3 Eu me sinto sempre culpado.

6.
0 Não acho que esteja sendo punido.
1 Acho que posso ser punido.
2 Creio que vou ser punido.
3 Acho que estou sendo punido.

7.
0 Não me sinto decepcionado comigo mesmo.
1 Estou decepcionado comigo mesmo.
2 Estou enojado de mim.
3 Eu me odeio.

8.
0 Não me sinto de qualquer modo pior que os outros.
1 Sou crítico em relação a mim devido a minhas fraquezas ou meus erros.
2 Eu me culpo sempre por minhas falhas.
3 Eu me culpo por tudo de mal que acontece.

9.
0 Não tenho quaisquer idéias de me matar.
1 Tenho idéias de me matar, mas não as executaria.
2 Gostaria de me matar.
3 Eu me mataria se tivesse oportunidade.

10.
0 Não choro mais que o habitual.
1 Choro mais agora do que costumava.
2 Agora, choro o tempo todo.
3 Costumava ser capaz de chorar, mas agora não consigo mesmo que o queira.

11.
0 Não sou mais irritado agora do que já fui.
1 Fico molestado ou irritado mais facilmente do que costumava.
2 Atualmente me sinto irritado o tempo todo.
3 Absolutamente não me irrito com as coisas que costumavam irritar-me.

12.
0 Não perdi o interesse nas outras pessoas.
1 Interesso-me menos do que costumava pelas outras pessoas.
2 Perdi a maior parte do meu interesse nas outras pessoas.
3 Perdi todo o meu interesse nas outras pessoas.

13.
0 Tomo decisões mais ou menos tão bem como em outra época.
1 Adio minhas decisões mais do que costumava.
2 Tenho maior dificuldade em tomar decisões do que antes.
3 Não consigo mais tomar decisões.

14.
0 Não sinto que minha aparência seja pior do que costumava ser.
1 Preocupo-me por estar parecendo velho ou sem atrativos.
2 Sinto que há mudanças permanentes em minha aparência que me fazem parecer sem atrativos.
3 Considero-me feio.

15.
0 Posso trabalhar mais ou menos tão bem quanto antes.
1 Preciso de um esforço extra para começar qualquer coisa.
2 Tenho de me esforçar muito até fazer qualquer coisa.
3 Não consigo fazer nenhum trabalho.

16.
0 Durmo tão bem quanto de hábito.
1 Não durmo tão bem quanto costumava.
2 Acordo uma ou duas horas mais cedo do que de hábito e tenho dificuldade para voltar a dormir.
3 Acordo várias horas mais cedo do que costumava e tenho dificuldade para voltar a dormir.

17.
0 Não fico mais cansado que de hábito.
1 Fico cansado com mais facilidade do que costumava.
2 Sinto-me cansado ao fazer quase qualquer coisa.
3 Estou cansado demais para fazer qualquer coisa.

18.
0 Meu apetite não está pior do que de hábito.
1 Meu apetite não é tão bom quanto costumava ser.
2 Meu apetite está muito pior agora.
3 Não tenho mais nenhum apetite.

19.
0 Não perdi muito peso, se é que perdi algum ultimamente.
1 Perdi mais de 2,5 Kg.
2 Perdi mais de 5,0 Kg.
3 Perdi mais de 7,5 Kg.

Estou deliberadamente tentando perder peso, comendo menos: ( ) SIM; ( ) NÃO

20.
0 Não me preocupo mais que o de hábito com minha saúde.
1 Preocupo-me com problemas físicos como dores e aflições ou perturbações no estômago ou prisão de ventre.
2 Estou muito preocupado com problemas físicos e é difícil pensar em outra coisa que não isso.
3 Estou tão preocupado com meus problemas físicos que não consigo pensar em outra coisa.

21.
0 Não tenho observado qualquer mudança recente em meu interesse sexual.
1 Estou menos interessado por sexo que costumava.
2 Estou bem menos interessado em sexo atualmente.
3 Perdi completamente o interesse por sexo.