UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA

Tese de Doutorado

# AVALIAÇÃO DOS PERFIS METABONÔMICOS, PROTEÔMICOS E METALÔMICOS PARA O TRANSTORNO AFETIVO BIPOLAR E SEU TRATAMENTO COM LÍTIO EM AMOSTRAS DE SORO SANGÜÍNEO

Alessandra Sussulini

Orientador: Prof. Dr. Marco Aurélio Zezzi Arruda
Co-Orientador: Prof. Dr. Cláudio Eduardo Muller Banzato
(FCM, Unicamp)

Campinas – São Paulo
Fevereiro de 2010

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP**

Su82a

Sussulini, Alessandra.
Avaliação dos perfis metabonômicos, proteômicos e metalômicos para o transtorno afetivo bipolar e seu tratamento com lítio em amostras de soro sangüíneo / Alessandra Sussulini. -- Campinas, SP: [s.n], 2010.

Orientador: Marco Aurélio Zezzi Arruda.
Co-orientador: Cláudio Eduardo Muller Banzato.

Tese - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Transtorno afetivo bipolar. 2. Lítio. 3. Proteômica. 4. Metalômica. I. Arruda, Marco Aurélio Zezzi. II. Banzato, Cláudio Eduardo Muller. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. IV. Título.

**Título em inglês:** Evaluation of metabonomic, proteomic and metallomic profiles for bipolar disorder and its treatment with lithium in blood serum samples

**Palavras-chaves em inglês:** Bipolar disorder, Lithium, Proteomics, Metallomics

**Área de concentração:** Química Analítica

**Titulação:** Doutor em Ciências

**Banca examinadora:** Prof. Dr. Marco Aurélio Zezzi Arruda (orientador), Prof. Dr. Fernando Antonio Santos Coelho (IQ-UNICAMP), Prof. Dr. Carlos Henrique Inácio Ramos (IQ-UNICAMP), Prof. Dr. Mário Francisco Pereira Jurema (FM-USP-RP), Prof. Dr. Ricardo Erthal Santelli (DQ-UFF)

**Data de defesa:** 19/02/2010

*Dedico esta Tese aos meus pais, Alexandre e Nelma, e aos meus irmãos, Rodrigo e Ana Letícia, pelo apoio e companheirismo sempre.*

*Todos os fatos da ciência foram outrora malditos, todas as invenções foram consideradas impossíveis. Todas as descobertas foram choques nervosos para alguma ortodoxia. Todas as inovações artísticas foram denunciadas como fraudulentas e levianas. Toda a malha da cultura e do progresso, tudo quanto na terra é feito pelo homem e não nos é dado pela natureza, constitui a manifestação concreta de algum homem recusando submeter-se à Autoridade. Se não fossem os rebeldes, os recalcitrantes e os intransigentes, não teríamos mais, saberíamos mais e seríamos mais do que os primeiros hominídeos. Como disse em verdade Oscar Wilde: "A desobediência foi a virtude original do homem."*

*(Robert Anton Wilson)*

# AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Campinas, em particular ao Instituto de Química, pela possibilidade da realização desta Tese de Doutorado, além de meu Mestrado e Graduação.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa de estudos e ao Deutscher Akademischer Austausch Dienst (DAAD) pelo auxílio, juntamente à FAPESP, para a realização do período sanduíche do Doutorado. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro às pesquisas.

Ao Prof. Dr. Marco Aurélio Zezzi Arruda, pela orientação, conselhos e apoio, desde a Iniciação Científica até hoje.

Ao Prof. Dr. Cláudio E. M. Banzato, pela participação como co-orientador, auxílio nas discussões envolvendo a parte médica do trabalho, bem como na coleta das amostras utilizadas no desenvolvimento desta Tese.

Ao Prof. Dr. Walter Stühmer, do Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin (Göttingen, Alemanha) por ter me aceitado para realizar o período sanduíche do Doutorado no referido Instituto, bem como ao Dr. Hartmut Kratzin e ao Dr. Olaf Jahn, do Grupo de Proteômica, que me orientaram durante este período.

Ao Prof. Dr. Hassan Dihazi, da Universitätsmedizin Göttingen (Alemanha), que me auxiliou durante os experimentos de SELDI-TOF MS.

À Dra. Johanna Sabine Becker, do Forschungszentrum Jülich (Alemanha), que me aceitou e orientou durante o período de estágio de Doutorado, no qual foram realizados os estudos metaloproteômicos.

À Profa. Dra. Ljubica Tasic e ao Prof. Dr. Ronei Jesus Poppi, que me auxiliaram nos estudos metabonômicos com relação à espectroscopia de $^{1}H$ RMN e às análises quimiométricas, respectivamente.

Aos voluntários e pacientes bipolares que cederam as amostras de soro sangüíneo utilizadas neste trabalho.

Aos amigos do Grupo de Espectrometria, Preparo de Amostras e Mecanização (GEPAM), inclusive aqueles que já não estão mais no grupo: Adilson, Aline Klassen, Aline Lopes, Ana Cristi, Daiane, Eduardo, Elidiane, Eraldo, Geraldo, Gustavo, Heloísa,

Herbert, Jerusa, Lidiane, Marcelo e Renata, pela ótima convivência e companheirismo.

Aos colegas e ex-colegas de laboratório: Profa. Dra. Anne Hélène Fostier, Prof. Dr. José Alberto Fracassi da Silva e Sarah pelo agradável convívio.

Aos técnicos do Instituto de Química da Unicamp (Ivanilce e Danilo), do Grupo de Proteômica do Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin (Marina e Thomas) e do Forschungszentrum Jülich (Astrid), que colaboraram para a realização deste trabalho.

À minha família, pelo carinho, apoio e por me ensinarem com exemplos que valores como a honestidade, a humildade e a persistência são aqueles que realmente importam na vida, ao contrário do que a sociedade atual mostra.

A todos os meus amigos de verdade (em especial à Fabiane, ao Daniel, e à Agnes, que me estiveram ao meu lado durante uma fase muito difícil) pela amizade, compreensão, incentivo, conselhos e pelos momentos compartilhados.

Por último, mas não menos importante, ao Raphael, pelo grande apoio, amor, companheirismo, carinho, paciência e compreensão, que foram tão importantes especialmente na etapa de conclusão desta Tese, e por tornar minha vida mais feliz!

Enfim, agradeço a todos que colaboraram, de maneira direta ou não, para que o presente trabalho pudesse ser realizado.

## CONCEITO DESTA TESE

Muitas pessoas perguntam qual foi a minha motivação para escolher o tema desta Tese. Eu acredito que a Ciência deve, acima de tudo, buscar favorecer a humanidade de alguma forma. Como desde a adolescência convivi muito de perto com pessoas que possuem transtornos psiquiátricos, pensei em abordar um deles, o transtorno afetivo bipolar, como tema. Por mais que a contribuição final deste trabalho seja mínima, a busca por melhorar a qualidade de vida das pessoas que possuem o transtorno afetivo bipolar, suas famílias e amigos, foi a razão a qual norteou o desenvolvimento da presente Tese.

# SÚMULA CURRICULAR

## 1. DADOS PESSOAIS

Alessandra Sussulini
Data de nascimento: 05 de novembro de 1981
Naturalidade: Campinas/SP
E-mail: alesussulini@gmail.com

## 2. FORMAÇÃO ACADÊMICA

**2007-2010** **Doutorado em Ciências**
Universidade Estadual de Campinas
**2005-2007** **Mestrado em Química Analítica**
Universidade Estadual de Campinas
**2005-2007** **Licenciatura em Química**
Universidade Estadual de Campinas
**2001-2005** **Bacharelado em Química**
Universidade Estadual de Campinas
**1997-2000** **Curso técnico em Química**
Escola Técnica Estadual "Conselheiro Antônio Prado"

## 3. PRODUÇÃO CIENTÍFICA

**Artigos completos publicados, aceitos e submetidos:**

**a)** A Sussulini, A Prando, DA Maretto, RJ Poppi, L Tasic, CEM Banzato, MAZ Arruda, *Metabolic profiling of human blood serum from treated patients with bipolar disorder employing $^{1}H$ NMR spectroscopy and chemometrics*, **Anal Chem** 81 (2009) 9755-9763.

**b)** MAO da Silva, A Sussulini, MAZ Arruda, *Metallomics as an interdisciplinary area involving proteins and metals*, **Expert Rev Proteomics**, aceito.

**c)** A Sussulini, H Dihazi, CEM Banzato, MAZ Arruda, W Stühmer, H Ehrenreich, O Jahn, H Kratzin, *Proteome profiling identifies potential biomarkers for bipolar disorder and its treatment with lithium*, **Bipolar Disorders**, submetido.

**d)** A Sussulini, JS Becker, H Kratzin, CEM Banzato, MAZ Arruda, *Metallomics studies of human blood serum from treated patients with bipolar disorder*, **Anal Chem**, submetido.

**e)** A Sussulini, AG Lima, EC Figueiredo, HL Fernandes, SCL Pinheiro, MIMS Bueno, FMV Pereira, *X-ray scattering information of ED-XRF technique for powdered fruit juice mixes*, **X-Ray Spectrom** 38 (2009) 254-257.

**f)** A Sussulini, GHMF Souza, MN Eberlin, MAZ Arruda, *Comparative metallomics for transgenic and non-transgenic soybeans*, **J Anal At Spectrom** 22 (2007) 1501-1506.

**g)** A Sussulini, JS Garcia, MAZ Arruda, *Microwave-assisted decomposition of polyacrylamide gels containing metalloproteins using mini-vials: an auxiliary tool for metallomics studies*, **Anal Biochem** 361 (2007) 146-148.

**h)** A Sussulini, JS Garcia, MF Mesko, DP Moraes, EMM Flores, CA Pérez, MAZ Arruda, *Evaluation of soybean seed protein extraction focusing metalloprotein analysis*, **Microchim Acta** 158 (2007) 173-180.

**i)** A Sussulini, MAZ Arruda, *Determinação de cromo (VI) por espectrometria de absorção atômica com chama após a extração e pré-concentração no ponto nuvem*, **Eclet Quím** 31 (2006) 73-80.

**j)** A Sussulini, GHMF Souza, MN Eberlin, FC Gozzo, CA Pérez, MAZ Arruda, *Comparative qualitative metallomics for transgenic and non-transgenic soybeans*, **Activity Report** (2006).
**k)** A Sussulini, CA Pérez, MAZ Arruda, *Mapping of metallic ions bound to soybean seed proteins employing synchrotron radiation X-ray fluorescence*, **Activity Report** (2005).

**Principais trabalhos apresentados em congressos:**
**a)** A Sussulini, CEM Banzato, MAZ Arruda, *Avaliação do perfil ionômico para o transtorno afetivo bipolar e seu tratamento com lítio em amostras de soro sangüíneo*. In: **15º Encontro Nacional de Química Analítica e 3º Congresso Iberoamericano de Química Analítica**, 2009, Salvador/BA (apresentação oral).
**b)** A Sussulini, H Dihazi, CEM Banzato, MAZ Arruda, W Stühmer, H Ehrenreich, O Jahn, H Kratzin. *Protein profiling by mass spectrometry analyses identify blood serum candidate biomarkers for bipolar disorder and the treatment using lithium*. In: **18th International Mass Spectrometry Conference**, 2009, Bremen, Alemanha.
**c)** A Sussulini, A Prando, DA Maretto, RJ Poppi, L Tasic, CEM Banzato, MAZ Arruda, *Metabonomic analysis of serum based on $^{1}H$ NMR spectroscopy and iPCA in bipolar disorder biomarker identification*. In: **2nd EuCheMS Chemistry Congress**, 2008, Turim, Itália.
**d)** A Sussulini, JS Garcia, MN Eberlin, MAZ Arruda, *Comparison of major protein removal procedures in human blood serum aiming at metalloproteomics analysis*. In: **2º Congresso Brasileiro de Espectrometria de Massas**, 2007, Campinas/SP.

Total de trabalhos apresentados em eventos científicos: 10 internacionais e 8 nacionais
Participações em eventos científicos: 21

**Prêmios:**
**a)** *"Student's Travel Award"*, International Mass Spectrometry Foundation, 18th International Mass Spectrometry Conference, 2009.
**b)** Prêmio "*CSI Excellent Poster Award*", Colloquium Spectroscopicum Internationale XXXV, 2007.

## 4. RESUMO DO HISTÓRICO PROFISSIONAL

**a) Forschungszentrum Jülich** (Jülich, Alemanha)
Estágio de doutorado, orientado pela Dra. Johanna Sabine Becker (agosto/2009)
**b) Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin** (Göttingen, Alemanha)
Estágio de doutorado, orientado pelo Prof. Dr. Walter Stühmer (junho a dezembro/2008)
**c) Universidade Estadual de Campinas** (Campinas/SP)

- Membro da comissão organizadora do *7th International Symposium on Advances in Extraction Technologies* (novembro/2005) e do *1º Encontro Brasileiro sobre Especiação Química* (dezembro/2008)
- Estagiária docente nas disciplinas Química Analítica IV (1º semestre de 2008) e Química Orgânica Experimental (1º semestre de 2009)
- Iniciação Científica, projeto *Estudo de diferentes sistemas baseados em ponto nuvem para a extração de cromo*, bolsa FAPESP (abril/2003 a março/2004)
- Auxiliar didática nas disciplinas Química Geral Experimental (1°semestre de 2002 e de 2004) e Química Geral (2°semestre de 2004)

**d) Universidade Federal de Santa Maria** (Santa Maria/RS)
Monitora da sessão de práticas do *VI Workshop sobre Preparo de Amostras* (abril/2006)

# RESUMO


## AVALIAÇÃO DOS PERFIS METABONÔMICOS, PROTEÔMICOS E METALÔMICOS PARA O TRANSTORNO AFETIVO BIPOLAR E SEU TRATAMENTO COM LÍTIO EM AMOSTRAS DE SORO SANGÜÍNEO

Autora: Alessandra Sussulini

Orientador: Prof. Dr. Marco Aurélio Zezzi Arruda

Co-Orientador: Prof. Dr. Cláudio E. M. Banzato

O transtorno afetivo bipolar é uma doença psiquiátrica caracterizada por alterações de humor marcantes, oscilando entre episódios de mania e depressão, que afeta entre 1 a 3% da população mundial. Os mecanismos em nível molecular deste transtorno, assim como de seu tratamento com lítio, que é o medicamento mais utilizado, ainda não são estabelecidos. Assim sendo, o objetivo deste trabalho de Tese consistiu em explorar biomarcadores potenciais (metabólitos, proteínas e íons metálicos livres ou ligados a proteínas) para o transtorno afetivo bipolar e seu tratamento com lítio.

Para isso, foi realizada a comparação dos perfis metabonômicos (utilizando espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e análise quimiométrica), proteômicos (utilizando eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida e diferentes técnicas de espectrometria de massas molecular) e metalômicos (utilizando espectrometria de massas com fonte de plasma indutivamente acoplado) de amostras de soro sangüíneo de pacientes com transtorno afetivo bipolar utilizando o lítio (n = 15) ou outras drogas excluindo o lítio (n = 10) e de indivíduos saudáveis (n = 25).

A análise metabonômica indicou os lipídeos como sendo os metabólitos mais afetados na presença do transtorno afetivo bipolar e do tratamento com lítio, o que corroborou com os resultados da análise proteômica, onde a apolipoproteína A-I foi uma das proteínas que sofreu maior alteração em seus níveis, sendo sub-expressa em pacientes bipolares, independentemente do tratamento, porém apresentando uma restauração ao nível do grupo controle após o tratamento com lítio.

As análises ionômicas apontaram As, B, Cl, Cr, Fe, K, Li, Mg, P, S, Se, Si, Sr e Zn como os íons livres diferenciais e as análises metaloproteômicas apontaram, principalmente, Ca, Co, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ti e Zn ligados a proteínas como sendo os metais que sofreram as maiores alterações na presença do transtorno afetivo bipolar e de seu tratamento com lítio. Dentre as proteínas ligadas a metais que apresentaram diferenças entre os grupos estudados em termos de metais ligados, destacam-se a apolipoproteína A-I, a transtiretina e a vitronectina, que haviam sido identificadas previamente nas análises proteômicas por apresentarem alterações em suas expressões.

A partir destes estudos, foi possível identificar, de maneira exploratória, moléculas diferenciais que podem orientar futuros estudos envolvendo os mecanismos patofisiológicos do transtorno afetivo bipolar e de ação terapêutica de drogas como o lítio, bem como na descoberta de biomarcadores para a doença e/ou seu tratamento com lítio.

# ABSTRACT

EVALUATION OF METABONOMIC, PROTEOMIC AND METALLOMIC PROFILES FOR BIPOLAR DISORDER AND ITS TREATMENT WITH LITHIUM IN BLOOD SERUM SAMPLES

Author: Alessandra Sussulini
Adviser: Prof. Dr. Marco Aurélio Zezzi Arruda
Co-Adviser: Prof. Dr. Cláudio E. M. Banzato

Bipolar disorder is a psychiatric illness characterized by marked mood changes, oscillating between mania and depression episodes, which affects 1-3% of the worldwide population. Molecular level mechanisms of this disorder, as well as of its treatment with lithium, which is the most widely used medication, are not yet known. Thus, the aim of this work consisted in explore potential biomarkers (metabolites, proteins, metal ions free or bounded to proteins) for bipolar disorder and its treatment with lithium.

For this purpose, it was performed the comparison of metabonomic (using hydrogen nuclear magnetic resonance spectroscopy and chemometric analysis), proteomic (using 2-D gel electrophoresis and different molecular mass spectrometry techniques), and metallomic (using inductively coupled plasma mass spectrometry) profiles for blood serum samples of bipolar disorder patients treated with lithium (n = 15) or other drugs than lithium (n = 10) and healthy individuals (n = 25).

Metabonomic analyses indicated lipids as the most affected metabolites in the presence of bipolar disorder and of lithium treatment, which corroborated with the results of proteomic analyses, where apolipoprotein A-I was one of the proteins that showed highest alterations in its levels. It was downregulated in bipolar disorder patients, independently of the treatment, but showed a level restored to that of the control group after lithium treatment.

Ionomic analyses detected As, B, Cl, Cr, Fe, K, Li, Mg, P, S, Se, Si, Sr e Zn as differential free ions, and metalloproteomic analyses detected mainly Ca, Co, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ti and Zn bound to proteins as being the metals that presented highest alterations in the presence of bipolar disorder and lithium treatment. Among the metal-binding proteins that indicated differences between the studied groups, apolipoprotein A-I, transthyretin and vitronectin, which were previously identified in the proteomic analyses, are highlighted.

With the studies described in this research work, it was possible to identify, in an exploratory way, differential molecules that can guide future studies on the patophysiological mechanisms of bipolar disorder or terapeutic action pathways of drugs like lithium, as well as on the discovery of biomarkers for the illness and/or its treatment with lithium.

# ÍNDICE

**LISTA DE ACRÔNIMOS E ABREVIATURAS**.....xxi
**LISTA DE QUADROS**.....xxiv
**LISTA DE TABELAS**.....xxv
**LISTA DE FIGURAS**.....xxvii

**INTRODUÇÃO**.....01

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**.....04

***CAPÍTULO 1: ESTUDOS METABONÔMICOS***.....07

**1. OBJETIVOS**.....09

**2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**.....09

**2.1. Biomarcadores**.....09
**2.2. Transtorno afetivo bipolar**.....11
**2.3. Metabonômica**.....14

**3. PARTE EXPERIMENTAL**.....18

**3.1. Equipamentos e acessórios**.....18
**3.2. Reagentes e soluções**.....18
**3.3. Amostras**.....19
**3.4. Obtenção dos espectros de $^{1}$H RMN**.....20
**3.5. Tratamento dos dados obtidos por $^{1}$H RMN utilizando quimiometria**.....22

**4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**.....23

**4.1. Análise dos dados espectrais de $^{1}$H RMN por quimiometria**.....23
**4.2. Identificação dos metabólitos diferenciais**.....29

**5. CONCLUSÕES PARCIAIS**.....33

**6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**.....34

***CAPÍTULO 2: ESTUDOS PROTEÔMICOS***.....39

**1. OBJETIVOS**.....41

**2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**.....41

**2.1. Espectrometria de massas em análises proteômicas**.....41
**2.1.1. SELDI-TOF MS**.....42
**2.2.2. MALDI-TOF MS/MS**.....45
**2.2. Preparo de amostras de soro sangüíneo prévio à análise de proteínas por eletroforese em gel**.....48
**2.3. Eletroforese diferencial em gel bidimensional (2-D DIGE)**.....50

**3. PARTE EXPERIMENTAL**.....51

**3.1. Equipamentos e acessórios**.....51
**3.2. Reagentes e soluções**.....52
**3.3. Análise do perfil protéico por SELDI-TOF MS**.....55

**3.4. Preparo de amostras de soro sangüíneo para análise por 2-D DIGE**.....56
**3.5. Separação e análise de proteínas por 2-D DIGE**.....57
**3.6. Digestão tríptica e caracterização de proteínas por MALDI-TOF MS/MS**.....59
**3.7. Quantificação de apolipoproteína A-I por imunoturbidimetria**.....60

**4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**.....61

**4.1. Análise do perfil protéico por SELDI-TOF MS**.....61
**4.2. Separação e identificação de proteínas diferenciais por 2-D DIGE e MALDI-TOF MS/MS**.....63
**4.3. Alterações em nível protéico: identificação de potenciais biomarcadores do transtorno afetivo bipolar e do tratamento com lítio**.....70

**5. CONCLUSÕES PARCIAIS**.....73

**6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**.....74

***CAPÍTULO 3: ESTUDOS METALÔMICOS***.....79

**1. OBJETIVOS**.....81

**2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**.....81

**2.1. Metaloproteínas e proteínas ligadas a metais**.....81
**2.2. Metalômica**.....82

**2.3. ICP-MS para a quantificação de elementos complexados com proteínas**.....83
**2.3.1. PAGE-LA-ICP-MS**.....85

**3. PARTE EXPERIMENTAL**.....88

**3.1. Equipamentos e acessórios**.....88
**3.2. Reagentes e soluções**.....88
**3.3. Determinação de íons livres em soro sangüíneo por ICP-MS**.....89
**3.4. Determinação de elementos ligados a proteínas por PAGE-LA-ICP-MS**.....89

**4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**.....91

**4.1. Avaliação do perfil ionômico por ICP-MS**.....91
**4.2. Modo de ablação a laser para a detecção de elementos ligados a proteínas**.....93
**4.3. Detecção de elementos ligados a proteínas de soro de pacientes com transtorno afetivo bipolar por LA-ICP-MS**.....96
**4.4. Identificação de proteínas por MALDI-TOF MS/MS e correlação com os elementos ligados**.....99

**5. CONCLUSÕES PARCIAIS**.....101

**6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**.....102

**CONCLUSÕES FINAIS**.....107

# LISTA DE ACRÔNIMOS E ABREVIATURAS

| | |
|---|---|
| **2-D PAGE** | Eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida, do inglês, *two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis* |
| **2-D DIGE** | Eletroforese diferencial em gel bidimensional, do inglês, *two-dimensional differential in-gel electrophoresis* |
| **ACN** | Acetonitrila |
| **CBB** | Azul de Coomassie, do inglês, *Coomassie Brilliant Blue* |
| **CHAPS** | Sulfonato de 3-[(3-cloroamidopropil)-dimetilamônio]-1-propano, do inglês, *3-[(3-cholamidopropyl)dimethyl-ammonio]-1-propanesulfonate* |
| **CHCA** | Ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico, do inglês, *α-cyano-4-hydroxycinnamic acid* |
| **CID** | Dissociação induzida por colisão, do inglês, *collision-induced dissociation* |
| **CPMG** | Carr-Purcell-Meiboom-Gill |
| **CSF** | Fluido cérebro-espinhal, do inglês, *cerebrospinal fluid* |
| **Da** | Dalton (1 Da = 1,661 $10^{-24}$ g) |
| **DNA** | Ácido desoxirribonucléico, do inglês, *deoxyribonucleic acid* |
| **DTT** | 1,4-ditiotreitol |
| **ESI** | Ionização por *electrospray*, do inglês, *electrospray ionization* |
| **FTICR** | Ressonância ciclotrônica de íons, do inglês, *Fourier transform ion cyclotron resonance* |
| **GC-MS** | Cromatografia gasosa hifenada à espectrometria de massas, do inglês, *gas chromatography-mass spectrometry* |
| **HCA** | Análise hierárquica de agrupamentos, do inglês, *hierarchical cluster analysis* |

| | |
|---|---|
| **ICP-MS** | Espectrometria de massas com fonte de plasma indutivamente acoplado, do inglês*, inductively coupled plasma mass spectrometry* |
| **iPCA** | Análise de componentes principais em intervalos, do inglês, *interval principal component analysis* |
| **IEF** | Focalização isoelétrica, do inglês, *isoelectric focusing* |
| **IPG** | Gradiente de pH imobilizado, do inglês, *immobilized pH gradient* |
| **LA** | Ablação a laser, do inglês, *laser ablation* |
| **LC-MS** | Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas, do inglês, *liquid chromatography mass spectrometry* |
| **LC-NMR** | Cromatografia líquida hifenada à ressonância magnética nuclear, do inglês, *liquid chromatography-nuclear magnetic resonance* |
| **LV** | Variável latente, do inglês, *latent variable* |
| **MALDI-TOF MS** | Espectrometria de massas por tempo de vôo com ionização por desorção a laser assistida por matriz, do inglês, *matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry* |
| **M** | Massa molar |
| **MS** | Espectrometria de massas, do inglês, *mass spectrometry* |
| **MS/MS** | Espectrometria de massas em seqüência |
| **OSC** | Correção de sinal ortogonal, do inglês, *orthogonal signal correction* |
| **PC** | Componentes principais, do inglês, *principal component* |
| **PCA** | Análise de componentes principais, do inglês, *principal component analysis* |
| **pI** | Ponto isoelétrico |
| **PLS** | Calibração multivariada por quadrados mínimos parciais, do inglês, *partial least squares* |

| | |
|---|---|
| **PLS-DA** | Análise discriminante com calibração multivariada por quadrados mínimos parciais, do inglês, *partial least squares-discriminant analysis* |
| **PMF** | Determinação da impressão digital pela massa de peptídeos, do inglês *peptide mass fingerprinting* |
| **PSD** | Decaimento pós-fonte, do inglês, *post-source decay* |
| **RF** | Radiofreqüência |
| **RMN** | Ressonância magnética nuclear |
| **RNA** | Ácido ribonucléico, do inglês, *ribonucleic acid* |
| **SF** | Do inglês, *sector field* |
| **SDS** | Dodecil sulfato de sódio, do inglês, *sodium dodecyl sulfate* |
| **SDS-PAGE** | Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio, do inglês, *sodium dodecyl sulfate polyacrilamide gel electrophoresis* |
| **SELDI-TOF MS** | Espectrometria de massas com ionização por dessorção a laser, realçada por superfície, do inglês, *surface-enhanced laser desorption ionization mass spectrometry* |
| **SNV** | Variação por padrão normal, do inglês, *standard normal variate* |
| **TBARS** | Substâncias reativas com ácido tiobarbitúrico, do inglês, *thiobarbituric acid reactive substances* |
| **TCA** | Ácido tricloroacético |
| **TEMED** | *N,N',N,N'*-tetrametiletilenodiamina |
| **TFA** | Ácido trifluoroacético |
| **TOCSY** | Espectroscopia de correlação total, do inglês, *total correlation spectroscopy* |
| **TOF** | Tempo de vôo, do inglês, *time of flight* |
| **UV** | Ultravioleta |

# LISTA DE QUADROS

**QUADRO 1.1.** Estrutura química de medicamentos comuns utilizados no tratamento do transtorno afetivo bipolar.....12

**QUADRO 2.1.** Estratégias utilizadas para a depleção de proteínas altamente abundantes [10].....48

# LISTA DE TABELAS

**TABELA 1.1.** Resumo das características das amostras de soro sangüíneo coletadas.....20

**TABELA 1.2.** Atribuições dos deslocamentos químicos para os metabólitos identificados nos espectros de $^{1}H$ RMN das amostras de soro sangüíneo. Em negrito, estão destacados os metabólitos que apresentaram maior diferenciação entre os grupos estudados.....31

**TABELA 2.1.** Picos de proteínas diferenciais detectados por análise via SELDI-TOF MS.....62

**TABELA 2.2.** Proteínas sobre-expressas na presença de lítio, identificadas por MALDI-TOF MS/MS. Os números referem-se aos *spots* vermelhos mostrados na Figura 2.5.....65

**TABELA 2.3.** Proteínas sub-expressas na presença de lítio, identificadas por MALDI-TOF MS/MS. Os números referem-se aos *spots* azuis mostrados na Figura 2.5.....65

**TABELA 3.1.** Parâmetros experimentais utilizados nas análises por LA-ICP-MS dos *spots* de proteínas contidos em géis de eletroforese.....90

**TABELA 3.2.** Concentrações de alguns íons diferenciais (média ± desvio padrão).....91

**TABELA 3.3.** Elementos diferenciais detectados nos *spots* de proteínas, marcados na Figura 3.1, ao comparar o grupo controle com os grupos de pacientes bipolares tratados com lítio ou não.....98

**TABELA 3.4.** Identificação das proteínas marcadas na Figura 3.1 por MALDI-TOF MS/MS.....100

## LISTA DE FIGURAS

**FIGURA 1.1.** Gráfico dos *scores* PCA para o intervalo de deslocamentos químicos entre 1,4 e 2,0 ppm. As amostras do grupo controle, dos pacientes bipolares tratados com lítio e dos pacientes bipolares não tratados com lítio são representados como ●, ▼ e *, respectivamente.....24

**FIGURA 1.2.** Gráfico dos *scores* PLS-DA para o intervalo de deslocamentos químicos entre -0,5 e 4,4 ppm. As amostras do grupo controle, dos pacientes bipolares tratados com lítio e dos pacientes bipolares não tratados com lítio são representados como ▼, ★ e ♦, respectivamente.....25

**FIGURA 1.3.** Gráfico dos *scores* PLS-DA (LV = 4) para o intervalo de deslocamentos químicos entre -0,5 e 4,4 ppm: **(a)** considerando o grupo controle com idade similar a dos grupos de pacientes bipolares e **(b)** excluindo-se os indivíduos fumantes. Os grupos controle, pacientes bipolares tratados com lítio e pacientes bipolares não tratados com lítio são representados como •, ▼ e ■, respectivamente.....26

**FIGURA 1.4.** Gráfico dos *loadings* PLS-DA na primeira variável latente para o intervalo de deslocamentos químicos entre -0,5 e 4,4 ppm.....27

**FIGURA 1.5.** Previsões para **(a)** classe 1 (controle), **(b)** classe 2 (bipolares tratados com lítio) e **(c)** classe 3 (bipolares não tratados com lítio). As amostras marcadas com ■ pertencem ao conjunto de calibração e as amostras marcadas com • referem-se ao conjunto de validação. As amostras em vermelho, verde e azul referem-se às classes 1, 2 e 3, respectivamente. A linha pontilhada em vermelho (a-c) é o *threshold*.....28-29

**FIGURA 1.6.** Espectros de $^{1}$H RMN (intensidade *x* deslocamento químico em ppm) para uma amostra de soro de: **(a)** um indivíduo controle, **(b)** um paciente bipolar

tratado com lítio e **(c)** um paciente bipolar não tratado com lítio. A região expandida entre -0,5 e 4,4 ppm, utilizada na análise quimiométrica é mostrada nos cantos superiores esquerdos (a-c). As atribuições dos picos descritos na Tabela 1.2 são mostradas em **(d)**, em um espectro $T_2$-editado de uma amostra controle.....30

**FIGURA 1.7.** Espectro $^1H$-$^1H$ TOCSY de uma amostra de soro do grupo controle com a identificação de alguns metabólitos diferenciais.....32

**FIGURA 2.1.** Representação esquemática da espectrometria de massas em seqüência.....47

**FIGURA 2.2.** Notação utilizada para a fragmentação de peptídeos por MS/MS.....47

**FIGURA 2.3.** Mecanismo da tecnologia *ProteoMiner*: a amostra **(a)** é tratada com uma combinação de hexapeptídeos ligada a suportes cromatográficos **(b)**. Cada hexapeptídeo liga-se a uma única seqüência protéica **(c)**, sendo que as proteínas muito abundantes saturam seus ligantes e o excesso é removido **(d)**. As proteínas são concentradas em seus ligantes específicos **(e)** e, então, dessorvidas e coletadas **(f)**. Esquema adaptado de [13].....49

**FIGURA 2.4.** Análise estatística para os picos de proteínas diferenciais detectados: **(a)** 14 e **(b)** 28 kDa. **(c)** Visão, em gel, de nove espectros representativos dos três grupos estudados, obtidos por SELDI-TOF MS, para a proteína de 28 kDa. Os três primeiros espectros são de pacientes bipolares tratados com lítio, os três seguintes são de indivíduos controle e os três últimos são de pacientes bipolares não tratados com lítio.....62

**FIGURA 2.5.** Análise por 2-D DIGE (faixa de pH entre 4 e 7) do soro sangüíneo de pacientes bipolares tratados com lítio (n = 15) e não tratados com lítio (n = 10). Em

vermelho são marcadas as proteínas sobre-expressas e, em azul, as sub-expressas na presença de lítio. Os números são relacionados às identificações das proteínas (vide Tabelas 2.2 e 2.3).....64

**FIGURA 2.6.** Identificação dos *spots* protéicos: **(a)** 1, **(b)** 2 e **(c)** 3, marcados em vermelho na Figura 2.5, referentes à apolipoproteína A-I. Os fragmentos de peptídeos identificados estão destacados em negrito (PMF) e sublinhados (MS/MS) nas seqüências.....67

**FIGURA 2.7.** Análise por 2-D DIGE (faixa de pH entre 3 e 11) do soro sangüíneo de pacientes bipolares tratados com lítio (n = 15) e não tratados com lítio (n = 10). A proteína em destaque é a apolipoproteína A-I (28 kDa).....68

**FIGURA 2.8.** Análise estatística para as concentrações de apolipoproteína A-I, determinadas por análise imunoturbidimétrica.....69

**FIGURA 3.1.** Eletroferograma 2-D PAGE (gel corado com prata) para 150 µg de proteínas de soro sangüíneo de pacientes bipolares tratados com lítio (n = 15).....94

**FIGURA 3.2.** Imagens da distribuição de Ag, Mg, Zn, Fe, Ca, Na, Sr e Ti na seção 1 (S1) do gel de eletroforese de soro de pacientes bipolares tratados com lítio (veja Figura 3.1). A escala abaixo das imagens se refere à intensidade dos íons em contagens por segundo (cps).....94

**FIGURA 3.3.** Detecção de elementos (intensidade em cps *x* tempo em segundos) para: **(a)** análise micro local dos *spots* da seção 2 (S2) para Ag, Na, Mg e Zn, e **(b)** varredura em linha para Ag e Na no *spot* 25 (S1) do gel de eletroforese de soro de pacientes bipolares tratados com lítio (veja Figura 3.1).....95-96

**FIGURA 3.4.** Espectro de massas para o *spot* 27 (vide Figura 3.1).....99

# INTRODUÇÃO

O transtorno afetivo bipolar (TAB) é um distúrbio mental crônico e severo, que afeta entre 1 a 3% da população mundial [1]. Tal transtorno é caracterizado por recorrentes alterações de humor, manifestadas em episódios de:

- mania, marcada por humor exaltado acentuado, energia e atividade aumentadas durante, pelo menos, uma semana;
- depressão, marcada por humor depressivo anormal, perda de interesse em atividades normalmente prazerosas, energia reduzida ou fadiga aumentada;
- hipomania, marcada por humor exaltado, energia e atividade aumentadas durante, pelo menos, quatro dias; e
- estados mistos, marcados por sintomas de ambos, mania e depressão.

A ausência de episódios maníacos ou depressivos é denominada eutimia, que se refere ao humor normal [1,2]. O transtorno afetivo bipolar é classificado em subtipos, que incluem bipolar I, caracterizado por um ou mais episódios de mania, com ou sem episódios de depressão, e bipolar II, que é caracterizado por um ou mais episódios de depressão acompanhados de, pelo menos, um episódio hipomaníaco [2].

Este transtorno é considerado como uma doença complexa, cuja patogênese ainda não é estabelecida [3-5]. Além disso, muitos pacientes bipolares são diagnosticados erroneamente como depressivos unipolares, devido à eventual manifestação mais tardia de quadros maníacos ou hipomaníacos, após um ou vários episódios de depressão, e, por isso, são submetidos a tratamentos ineficazes [6]. Tais fatos justificam o grande interesse na identificação de biomarcadores do transtorno afetivo bipolar, que podem auxiliar tanto no diagnóstico precoce como no entendimento das alterações bioquímicas associadas à doença e/ou envolvidas em sua patofisiologia.

O lítio tem sido empregado por mais de 50 anos no tratamento do transtorno afetivo bipolar, sendo a droga mais utilizada em muitos casos. Diversas

teorias a respeito do mecanismo de ação do lítio têm sido propostas, desde alterações no transporte iônico até a modulação da expressão gênica. Entretanto, os mecanismos neurobiológicos precisos, por meio dos quais o lítio exerce seus efeitos clínicos, não são claros e alguns resultados encontrados na literatura são contraditórios [4]. Por tais motivos, se fazem necessários estudos mais específicos envolvendo o uso do lítio no tratamento do transtorno afetivo bipolar, envolvendo a identificação de biomarcadores para o mesmo.

Partindo do fato que os mecanismos em nível molecular do transtorno afetivo bipolar e da ação do lítio são desconhecidos, a hipótese deste trabalho de Tese é que a descoberta de marcadores diferenciais pode vir a auxiliar na compreensão da patofisiologia da doença e na eficácia do lítio como tratamento, bem como no diagnóstico precoce do transtorno afetivo bipolar.

Neste trabalho exploratório, três estratégias utilizadas para a descoberta de biomarcadores (metabonômica, proteômica e metalômica) foram aplicadas em amostras de soro sangüíneo humano, de modo a buscar indicar potenciais biomarcadores para o transtorno afetivo bipolar e seu tratamento com lítio a partir da avaliação dos perfis de metabólitos, proteínas e íons metálicos livres ou ligados a proteínas.

A metabonômica consiste na avaliação da resposta metabólica dinâmica em sistemas vivos a estímulos patofisiológicos, à toxicidade de drogas ou à modificação genética. As plataformas analíticas utilizadas para determinar estas alterações nos níveis de metabólitos são baseadas em técnicas de espectrometria de massas ou de espectroscopia de $^{1}$H RMN [7-9]. Neste trabalho de Tese, a espectroscopia de $^{1}$H RMN foi utilizada pelo fato de não requerer tratamentos químicos ou físicos da amostra antes da análise (ao contrário da maioria das metodologias envolvendo a espectrometria de massas, que geralmente requer uma separação prévia dos metabólitos do fluido biológico antes da detecção) e todos os tipos de metabólitos pequenos puderam ser determinados simultaneamente [7,9].

A análise sistemática do conjunto total de proteínas que compõem um sistema biológico, ou seja, a proteômica, atualmente tem como maior desafio a

identificação de marcadores protéicos de patologias em fluidos biológicos. Tais marcadores, que são definidos como proteínas que sofrem uma alteração em sua concentração ou estado, associada a um processo biológico específico ou doença, podem ser fatores-chave no diagnóstico precoce ou no monitoramento da resposta a tratamentos [10,11]. No presente trabalho de Tese, as técnicas analíticas utilizadas com este propósito foram a SELDI-TOF MS e a 2-D DIGE associada à MALDI-TOF MS/MS.

Uma das classes mais importantes de marcadores biológicos, verificados em diferenciações fisiológicas ou em alterações patológicas de células ou tecidos biológicos, envolve as metaloproteínas e os íons metálicos ou semimetálicos ligados a elas [12]. A distribuição dos íons metálicos e semimetálicos em uma célula ou tecido, ou seja, o metaloma, é o alvo de estudo da área científica denominada metalômica [12-14]. Neste trabalho, foram estudados dois aspectos da metalômica: a ionômica, que consiste na determinação do conjunto total de elementos presentes na amostra (íons livres), e a metaloproteômica, que consiste na determinação do conjunto de complexos metálicos (ou semimetálicos) com ligantes protéicos [12].

O esquema analítico envolvendo estudos metaloproteômicos inclui três componentes principais: (i) uma técnica de separação, que contribui para o isolamento das espécies-alvo da matriz, chamada *componente de seletividade*; (ii) um detector específico para moléculas, visando sua caracterização, chamado *componente estrutural* e (iii) um detector sensível para a quantificação dos elementos, chamado *componente de sensibilidade* [14,15]. Neste trabalho de Tese, a componente de seletividade utilizada foi a 2-D PAGE, a componente estrutural foi a MALDI-TOF MS/MS e a componente de sensibilidade foi a ICP-MS.

A partir dos estudos explorados neste trabalho, foi realizada a avaliação dos perfis metabólicos, protéicos e iônicos para o transtorno afetivo bipolar e seu tratamento com lítio em amostras de soro sangüíneo humano, o que pode vir a auxiliar futuros estudos envolvendo o diagnóstico precoce da doença, bem como seu mecanismo patofisiológico e de ação do lítio como tratamento.

# REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] GS Malhi, D Adams, L Lampe, M Paton, N O'Connor, LA Newton, G Walter, A Taylor, R Porter, RT Mulder, M Berk, *Clinical practice recommendations for bipolar disorder*, **Acta Psychiatr Scand** 119 Suppl. 439 (2009) 27-46.

[2] American Psychiatric Association, **Diagnostic and statistical manual for mental disorders, text revision (DSM-IV-TR)**, 4ª edição, American Psychiatric Association, Washington DC (2000).

[3] RH Belmaker, *Medical progress: bipolar disorder*, **New Engl J Med** 351 (2004) 476-486.

[4] F Marmol, *Lithium: Bipolar disorder and neurodegenerative diseases. Possible cellular mechanisms of the therapeutic effects of lithium*, **Progr Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry** 32 (2008) 1761-1771.

[5] P Oswald, D Souery, S Kasper, Y Lecrubier, S Montgomery, S Wyckaert, J Zohar, J Mendlewicz, *Current issues in bipolar disorder: a critical review*, **Eur Neuropsychopharmachol** 17 (2007) 687-695.

[6] ML Phillips, E Vieta, *Identifying functional neuroimaging biomarkers of bipolar disorder: toward DSM-V*, **Schizophr Bull** 33 (2007) 893-904.

[7] WB Dunn, DI Ellis, *Metabolomics: current analytical platforms and methodologies*, **Trends Anal Chem** 24 (2005) 285-294.

[8] EM Lenz, ID Wilson, *Analytical strategies in metabonomics*, **J Proteome Res** 6 (2007) 443-458.

[9] JK Nicholson, JC Lindon, *Systems biology - Metabonomics*, **Nature** 455 (2008) 1054-1056.

[10] LA Echan, H Tang, N Ali-Kahn, K Lee, DW Speicher, *Depletion of multiple high-abundance proteins improves protein profiling capacities of human serum and plasma*, **Proteomics** 5 (2005) 3292-3303.

[11] JN Adkins, SM Varnun, KJ Auberry, RJ Moore, NH Angell, RJ Smith, DL Springer, JG Pounds, *Toward a human blood serum proteome – Analysis by multidimensional separation coupled with mass spectrometry*, **Mol Cell Proteomics** 1 (2002) 947-952.

[12] S Mounicou, J Szpunar, R Lobinski, *Metallomics: the concept and methodology*, **Chemical Soc Rev** 38 (2009)1119–1138.

[13] R Lobinski, D Schaumlöffel, J Szpunar, *Mass spectrometry in bioinorganic analytical chemistry*, **Mass Spectrom Rev** 25 (2006) 255-289.

[14] JS Garcia, CS Magalhães, MAZ Arruda, *Trends in metal-binding and metalloprotein analysis*, **Talanta** 69 (2006) 1-15.

[15] JL Gómez-Ariza, T Garcia-Barrera, F Lorenzo, V Bernal, MJ Villegas, V Oliveira, *Use of mass spectrometry techniques for the characterization of metal bound to proteins (metallomics) in biological systems*, **Anal Chim Acta** 524 (2004) 15-22.

# CAPÍTULO 1

# ESTUDOS METABONÔMICOS

# 1. OBJETIVOS

Os objetivos deste Capítulo consistem na comparação do perfil metabonômico de amostras de soro sangüíneo de indivíduos saudáveis e pacientes com transtorno afetivo bipolar sob diferentes tratamentos, incluindo lítio ou não, bem como na identificação dos metabólitos diferenciais entre estes grupos. Para isso, foram empregados a espectroscopia de $^{1}$H RMN e métodos quimiométricos.

# 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A Revisão Bibliográfica apresentada a seguir enfocará os principais temas abordados neste Capítulo. Primeiramente, os conceitos a respeito de biomarcadores serão discutidos.

## 2.1. Biomarcadores

O termo biomarcador foi definido como sendo uma característica que é objetivamente medida e avaliada como um indicador de processos biológicos normais, de processos patogênicos ou de respostas farmacológicas a uma intervenção farmacêutica, de acordo com o *Biomarkers Definitions Working Group* [1,2]. Mais especificamente, no caso de biomarcadores protéicos, estes são definidos como sendo as proteínas que apresentam alterações em sua concentração (sobre- ou sub-expressão, repressão ou ativação gênica) ou estado (modificações pós-traducionais), associadas a um processo biológico específico ou doença [3].

As principais características de um biomarcador adequado são: (i) especificidade para uma determinada doença, ou seja, apresentar baixa taxa de falsos-positivos; (ii) robustez, ou seja, o marcador deve apresentar uma diferença entre indivíduos saudáveis, indivíduos com outra doença e indivíduos com a doença de interesse, de modo que a doença possa ser especificamente e

seletivamente diagnosticada de outras condições patológicas; e (iii) útil para uso clínico, ou seja, permitir um método interessante aos clínicos, em comparação a outros métodos de investigação [4].

Recentemente, a descoberta de novos biomarcadores de doenças humanas tem despertado um grande interesse em pesquisas médicas. Tal interesse foi guiado a partir de novos desenvolvimentos tecnológicos, notadamente em química analítica, relacionados à comparação de perfis de RNA mensageiro (transcriptoma), proteínas (proteômica), metabólitos (metabolômica) [5], bem como íons metálicos, metaloproteínas e proteínas ligadas a íons metálicos (metalômica).

A descoberta de um biomarcador para propósitos clínicos requer fases distintas de descoberta e validação. A etapa de descoberta pode ser dividida em três estágios: (i) identificação de potenciais biomarcadores, (ii) priorização dos biomarcadores identificados, e (iii) validação preliminar dos biomarcadores priorizados [6,7]. Em linhas gerais, a etapa de descoberta é relacionada à análise proteômica clássica e a etapa de validação baseia-se em medidas quantitativas para confirmar se a concentração de um potencial biomarcador é significativamente diferente entre os estados da doença e controle [4].

As possíveis fontes de potenciais biomarcadores utilizadas em pesquisas são tecidos ou fluidos biológicos, sendo que os fluidos mais comuns são o sangue (soro ou plasma), CSF e urina. Os fluidos apresentam as vantagens de fácil acessibilidade, evitando os riscos da amostragem invasiva de tecidos por meio de biópsias, relativo baixo custo de obtenção, possibilidade de realizar um monitoramento baseado em amostragem múltipla, bem como o potencial para o desenvolvimento de testes prognósticos/diagnósticos em larga escala, uma vez que os fluidos biológicos são utilizados rotineiramente em exames desta natureza [4].

No item a seguir, alguns aspectos sobre o transtorno afetivo bipolar, as teorias mais comuns a respeito de sua patogênese e a descrição de suas formas de tratamento serão discutidos.

## 2.2. Transtorno afetivo bipolar

O transtorno afetivo bipolar é um transtorno crônico e complexo, que é caracterizado por episódios de depressão, mania ou hipomania, de forma isolada ou mista, apresentando grandes taxas de morbidade e mortalidade [8]. Tais mudanças de humor podem ser rápidas e dramáticas, mas na maioria das vezes é gradual. Por exemplo, quando no ciclo depressivo, o indivíduo apresenta uma tristeza prolongada com retirada da vida social e, quando no ciclo maníaco, o indivíduo pode se comportar de maneira hiperativa, com fala ininterrupta e com grande disposição de energia [9].

A patogênese do transtorno afetivo bipolar está relacionada a diversas alterações bioquímicas e moleculares em sistemas de neurotransmissão, segundos-mensageiros, vias de transcrição de sinais e regulação na expressão gênica. Recentemente, os avanços nas técnicas de biologia molecular, genética e neuroimagem têm fornecido novas informações acerca das bases biológicas deste transtorno [10].

As falhas em sistemas de neurotransmissão são relacionadas às anormalidades que envolvem as aminas biogênicas, como a norepinefrina, a dopamina (catecolaminas) e a serotonina (indoleamina) [11,12].

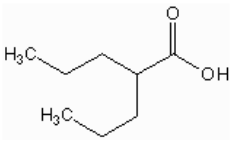
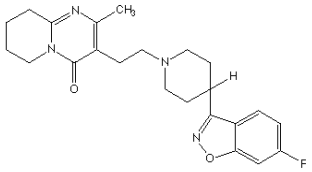
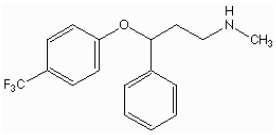
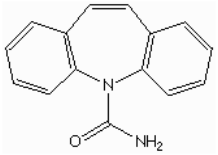
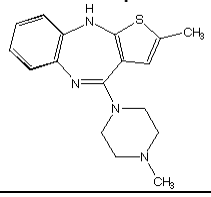
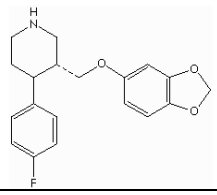
As proteínas geralmente associadas à etiopatogenia, ou seja, à origem e forma de desenvolvimento do transtorno afetivo bipolar, são os segundos-mensageiros monofosfato cíclico de adenosina (AMPc), proteína quinase C (PKC), inositol-1,4,5-trifosfato ($IP_3$) e as proteínas G. Estudos têm descrito um aumento de PKC na presença do transtorno afetivo bipolar, causando um acréscimo na excitabilidade neuronal e na liberação de neurotransmissores, bem como um aumento nos níveis intracelulares de cálcio em pacientes com a doença (especialmente em fase maníaca), devido a uma alteração na proteína $IP_3$, que atua liberando os estoques de cálcio intracelulares necessários para a modulação neuronal [10]. Alguns sintomas do transtorno afetivo bipolar mostraram-se ser causados pela enzima inositol monofosfatase (IMPase), que é uma enzima que quebra o inositol monofosfato em inositol livre e fosfato. Esta enzima está

envolvida na transdução de sinais e acredita-se que ela provoca um desequilíbrio nos neurotransmissores [13].

O tratamento do transtorno afetivo bipolar visa o controle de episódios agudos e a prevenção de novos episódios, sendo dividido em três fases: (i) fase aguda, que consiste em tratar a mania sem causar depressão ou vice-versa; (ii) fase de continuação, que consiste em estabilizar os benefícios, tratar até a remissão dos sintomas, reduzir os efeitos colaterais, reduzir a possibilidade de recaída e aumentar o funcionamento global; e (iii) tratamento de manutenção, que consiste em prevenir a mania e/ou a depressão, bem como maximizar a recuperação funcional, ou seja, manter o paciente em estado de remissão dos sintomas (eutimia) [8].

Os medicamentos comumente utilizados no tratamento do transtorno afetivo bipolar são os estabilizadores de humor (carbonato de lítio, ácido valpróico, carbamazepina), os antipsicóticos de segunda geração (risperidona, olanzapina, quetiapina) e os antidepressivos tricíclicos ou inibidores seletivos de recaptação de serotonina (fluoextina, citalopram, paroxetina), sendo estes últimos geralmente combinados com estabilizadores de humor [8]. As estruturas químicas de alguns dos medicamentos mais comuns são mostradas no Quadro 1.1.

**Quadro 1.1.** Estrutura química de medicamentos comuns utilizados no tratamento do transtorno afetivo bipolar

| **Estabilizadores de humor** | **Antipsicóticos de segunda geração** | **Antidepressivos** |
|---|---|---|
| Ácido valpróico  | Risperidona  | Fluoxetina  |
| Carbamazepina  | Olanzapina  | Paroxetina  |

O lítio, administrado na forma de carbonato, citrato ou orotato, é o medicamento mais amplamente utilizado no tratamento deste transtorno. O lítio se encontra na forma de cátion monovalente, é minimamente ligado a proteínas, não sofre biotransformações no organismo e é eliminado pelos rins [11,14]. O lítio pode afetar a liberação de neurotransmissores, o metabolismo de aminas biogênicas e a transmissão de sinais neuronais por meio da perturbação da distribuição do sódio, do magnésio e do cálcio [11-13]. Algumas enzimas foram propostas como sendo alvos potenciais da ação do lítio, tais como a IMPase e a proteína glicogênio sintase quinase-3, que são amplamente expressas, requerem íons metálicos para a catálise e geralmente são inibidas pelo lítio de modo não-competitivo, mais precisamente pelo deslocamento de um cátion divalente [13].

Em um trabalho recente, Andreazza *et al.* [15] avaliaram o envolvimento da glia (tecido cerebral que fornece suporte e nutrição aos neurônios) e o estresse oxidativo em pacientes com transtorno afetivo bipolar. A atividade glial foi estimada a partir da medida do conteúdo da proteína soro S100B e o estresse oxidativo foi estimado utilizando-se substâncias reativas com ácido tiobarbitúrico (TBARS) e medidas das atividades de enzimas antioxidantes em pacientes com o transtorno afetivo bipolar, durante os diferentes episódios da doença.

Os autores encontraram um aumento significativo da proteína soro S100B durante episódios de mania e depressão, mas não em pacientes eutímicos. A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD), bem como a razão SOD/glutationa peroxidase e catalase, foram também aumentadas em pacientes maníacos e depressivos. Por outro lado, os níveis de TBARS foram aumentados nos pacientes, independentemente da fase da doença. Estes fatos sugerem um dano oxidativo potencial em pacientes com transtorno afetivo bipolar, indicando que mudanças sistemáticas ocorrem durante as fases ativas da doença, além de uma alteração na função dos astrócitos (células gliais), indicada pela elevação do nível da proteína soro S100B.

A seguir, serão discutidos os princípios dos estudos em metabonômica, utilizando a espectroscopia de ressonância magnética nuclear e quimiometria, bem como alguns exemplos de trabalhos encontrados na literatura.

## 2.3. Metabonômica

Recentemente, um novo conjunto de técnicas e metodologias analíticas relacionadas à análise dos metabolomas de microorganismos, plantas e animais foi introduzido, dando origem à área científica denominada metabolômica. O metaboloma é definido como o conjunto de todas as moléculas de baixa massa molar (metabólitos), presentes em uma célula, tecido ou fluido biológico, que participam de reações metabólicas. Geralmente, a classe dos metabólitos inclui espécies orgânicas, tais como aminoácidos, ácidos graxos, carboidratos, lipídeos e vitaminas, bem como espécies inorgânicas e elementares [16].

O objetivo dos estudos *metabolômicos* consiste na identificação e quantificação de *todos* os metabólitos presentes em um sistema biológico, e, para isso, são utilizadas técnicas hifenadas à cromatografia, para a separação prévia dos metabólitos (GC-MS, LC-MS e LC-NMR) [16]. Uma estratégia importante de análise metabolômica é denominada *metabonômica*, cujo objetivo consiste na avaliação da *resposta* metabólica de sistemas vivos a estímulos biológicos, doenças, tratamentos terapêuticos ou manipulação genética. Tal avaliação se baseia, em geral, na análise estatística multivariada de dados obtidos por espectroscopia de RMN [16-18].

A espectroscopia de RMN é baseada na aplicação de campos magnéticos fortes e pulsos de radiofreqüência (RF) ao núcleo dos átomos. Em átomos com número atômico ímpar (por exemplo, $^{1}H$) ou número de massa ímpar (por exemplo, $^{13}C$), a presença do campo magnético induz o núcleo a possuir *spin*, chamado de *spin* nuclear. A absorção da energia RF permite que o núcleo seja promovido de estados de *spin* baixos a estados de *spin* altos, com a subseqüente detecção da emissão de radiação durante o processo de relaxamento [16].

A maioria das aplicações da espectroscopia de RMN utiliza o $^{1}H$ para estudos clínicos e, como a maioria dos metabólitos conhecidos contém átomos de hidrogênio, o sistema não é restrito a determinados metabólitos em particular. O espectro de RMN, mais especificamente, o deslocamento químico, depende do efeito de blindagem por elétrons movendo-se em órbita ao redor do núcleo. O

deslocamento químico para a $^{1}$H RMN é determinado como sendo a diferença (em ppm) entre a freqüência de ressonância do próton observada e aquela de um próton presente em um composto de referência. A intensidade do sinal depende do número de núcleos idênticos [16].

Os fluidos biológicos contêm um grande excesso de água, o que causa alargamento dos picos e espectros contendo informações metabólicas mínimas. Entretanto, a aplicação de uma seqüência de pulsos de supressão de água pode eliminar tal efeito [16].

O principal desafio das análises de metabólitos de fluidos biológicos por espectroscopia de RMN consiste na discriminação e interpretação do grande número de variáveis espectrais obtidas experimentalmente. Para extrair informações químicas a partir dos conjuntos de dados experimentais, são utilizadas ferramentas quimiométricas, que realizam uma análise multivariada dos dados empregando estatística para computar modelos com tal finalidade [17].

A análise de componentes principais (PCA) é uma das ferramentas quimiométricas mais amplamente utilizada. Ela consiste na manipulação da matriz de dados com o objetivo de representar as variações presentes em muitas variáveis por meio de um número menor de fatores, ou seja, na redução da variação dos dados em uma matriz *X*. Para isso, um novo sistema de eixos (componentes principais) é construído para representar as amostras, no qual a natureza multivariada dos dados pode ser visualizada em poucas dimensões [19,20].

A matriz *X* consiste em *N* linhas (observações) e *K* colunas (variáveis), em termos de *scores* e *loadings*. A matriz *X* é decomposta como sendo o produto de duas matrizes, a matriz de *scores* **T** (*N* x *A*), que resume as variáveis *X*, e a matriz de *loadings* **P'** (*A* x *K*), que mostra a influência das variáveis no modelo de projeções, onde *A* é o número de componentes principais, somada a uma matriz "ruído" de resíduos **E** (*N* x *K*): $\mathbf{X = TP' + E}$, que expressa os desvios entre os valores originais e as projeções [19,20]. Os gráficos de *scores* são formados por componentes principais (PCs), que são ordenadas em ordem crescente de

variância. Assim, a primeira componente principal (PC1) é aquela que contém o maior número de informações extraídas dos dados originais [20].

A calibração multivariada por quadrados mínimos parciais (PLS) é uma regressão estendida da PCA, trabalhando com duas matrizes, **X** e **Y**. Ela possui dois objetivos: aproximar **X** e **Y** e modelar uma relação entre as mesmas, de modo a minimizar os desvios. A matriz de dados (**X**) é resumida por *A scores X* (**T**) e a matriz de resposta (**Y**) é descrita por *A scores Y* (**U**). Assim como na PCA, os *scores* (**T** e **U**) expressam as relações entre as observações (amostras). Basicamente, a PLS maximiza a covariância entre T e U e, para cada dimensão do modelo, um vetor peso (**w**) é computado, sendo que ele reflete a contribuição parcial de cada variável *X* para o modelamento de *Y*. A matriz resultante peso *X* (*A* x *K*), **W**, reflete a estrutura em **X** que maximiza a covariância entre **T** e **U**. A matriz correspondente de *loadings Y* é designada **Q** e a matriz de *loadings X*, **P**, é calculada de modo a reduzir **X** apropriadamente, expressando a correlação estrutural entre as variáveis *X* [19].

A análise discriminante com calibração multivariada por quadrados mínimos parciais (PLS-DA) é realizada para aperfeiçoar a separação entre os grupos de observações, de modo que uma separação máxima entre as classes seja obtida, bem como compreender quais variáveis carregam a informação que separa as classes. Ela gera um modelo englobando muitas classes, sendo que este modelo de projeção resultante fornece as variáveis latentes que focam na separação máxima (discriminação) em preferência à máxima variação (modelamento de classes ótimo). Na PLS-DA, uma matriz **Y** de variáveis descreve a classe a qual cada amostra pertence. A matriz **Y** tem **G** colunas (para G classes), contendo os valores 0 ou 1, indicando se a amostra pertence ou não a uma determinada classe [19].

Em 2006, Figueiredo [21] utilizou a espectroscopia de $^{1}$H RMN e os métodos quimiométricos HCA, PCA e PLS-DA na análise das rotas metabólicas da esclerose múltipla em amostras de CSF. Para isso, foram utilizadas 120 amostras de CSF, sendo 60 controles e 60 provenientes de pacientes com esclerose múltipla, coletadas por punção lombar. Para a análise por espectroscopia de $^{1}$H

RMN, 500 µL das amostras foram adicionados a 100 µL de $D_2O$ e 2,5 mmol $L^{-1}$ de trimetilsililpropionato de sódio (referência) e os espectros foram obtidos em um equipamento operando a 499,886 MHz.

Neste trabalho, foi identificado um biomarcador potencial, o β-hidroxibutirato, presente nas amostras dos pacientes com esclerose múltipla, sugerindo que o cérebro destes pacientes utilize as proteínas e fosfolipídeos resultantes da desmielinização como fonte alternativa de energia. Este dado foi confirmado pela presença de um sinal no espectro de $^1H$ RMN, em 0,065 ppm, atribuído a proteínas proteolíticas, que são responsáveis pela degradação da mielina.

Kaddurah-Daouk *et al.* [22] utilizaram uma plataforma metabolômica específica, a lipidômica, para avaliar mudanças globais nos metabólitos lipídicos (polares e não-polares) na presença de esquizofrenia em pacientes sob tratamento com três antipsicóticos atípicos comumente utilizados. Os perfis lipídicos foram obtidos a partir do plasma sangüíneo de 50 pacientes com esquizofrenia, antes e após o tratamento por 2 a 3 semanas com olanzapina (n = 20), risperidona (n = 14) ou aripiprazol (n = 16). Amostras de 16 indivíduos controle também foram coletadas. Os lipídeos foram extraídos do plasma com uma solução de clorofórmio: metanol em proporção 2: 1 (v/v) na presença de padrões internos e, então, as classes lipídicas individuais presentes no extrato foram separadas por cromatografia preparativa (cromatografia em camada delgada, cromatografia líquida de alta eficiência ou cromatografia gasosa) e quantificadas por cromatografia gasosa com detecção por ionização em chama. A análise estatística foi realizada por PCA.

Foi observado neste trabalho que a olanzapina e a risperidona afetaram uma faixa mais ampla das classes lipídicas do que o aripiprazol. Aproximadamente 50 lipídeos tenderam a apresentar uma maior concentração nos pacientes tratados com risperidona e olanzapina, sendo que as concentrações de triacilgliceróis aumentaram e as de ácidos graxos livres diminuíram com ambas as drogas, mas não com o aripiprazol. Observou-se também que níveis menores de fosfatidiletanolamina foram encontrados em pacientes com esquizofrenia, quando

comparados aos controles, o que comprova a associação da esquizofrenia com alterações nos fosfolipídeos de membrana neurais.

# 3. PARTE EXPERIMENTAL

## 3.1. Equipamentos e acessórios

Os equipamentos utilizados no desenvolvimento dos experimentos descritos neste Capítulo são listados a seguir. Eles se encontram disponíveis no Grupo de Espectrometria, Preparo de Amostras e Mecanização (GEPAM), com exceção do espectrômetro de ressonância magnética nuclear, que está disponível no Laboratório Spinlab, sendo ambos os laboratórios estão localizados no Instituto de Química da Unicamp.

- Centrífuga, modelo NT-811 (Nova Técnica, Piracicaba, Brasil)
- Espectrômetro de ressonância magnética nuclear INOVA-500 (Varian, Palo Alto, EUA)
- Misturador vortex, modelo M-37600 (Thermolyne, Dubuque, EUA)
- Ultracentrífuga, modelo Bio-Spin-R (Bio Agency, São Paulo, Brasil)
- Vidrarias de uso rotineiro em laboratório de química analítica

## 3.2. Reagentes e soluções

Todas as soluções foram preparadas utilizando-se água desionizada (≥ 18,2 MΩ cm), obtida por um sistema de purificação Milli-Q, e reagentes de grau analítico.

A seguir, é apresentada a lista dos reagentes utilizados nos experimentos descritos neste Capítulo:

- Azida de sódio, $NaN_3$, M = 65,01 g $mol^{-1}$ (Merck, Darmstadt, Alemanha)

- Monóxido de deutério, $D_2O$, M = 20,04 g $mol^{-1}$ (Cambridge Isotope Laboratories Ltda., Andover, EUA)

## 3.3. Amostras

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp e os sujeitos assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido antes da coleta das amostras. Todas as amostras foram coletadas no mesmo período do dia (entre 14 e 16 h). As amostras de sangue (*ca.* 5 mL) foram coletadas a vácuo em tubos para sorologia Vacuette® (Greiner Bio-One, Americana, Brasil) e estes foram centrifugados a 1500*g* por 10 min.

Os tubos para sorologia são revestidos internamente com micro partículas de sílica, as quais ativam a coagulação quando os tubos são invertidos. Os tubos para sorologia contêm uma barreira de gel presente no fundo do tubo. Este material possui densidade intermediária entre o sangue coagulado e o soro. Durante a centrifugação, a barreira de gel move-se para cima, posicionando-se entre o soro e o coágulo, onde uma barreira estável é formada, separando o soro dos outros componentes celulares [23]. A seguir, alíquotas das amostras de soro foram transferidas para tubos do tipo Eppendorf contendo solução de azida de sódio a 0,01% (m/v), que atua como preservativo, prevenindo o crescimento bacteriano no soro, e armazenadas a -20 °C.

No total, 50 amostras foram coletadas e classificadas em três grupos, sendo 25 amostras pertencentes ao grupo controle, composto por indivíduos que não apresentam o transtorno afetivo bipolar; 15 amostras do grupo de pacientes bipolares que estavam sob tratamento usando lítio; e 10 amostras do grupo de pacientes bipolares que estavam sob tratamento usando outros fármacos excluindo o lítio.

Os critérios de exclusão consistiram em certos tipos de doenças concomitantes, tais como cânceres, AIDS e doenças hepáticas, metabólicas e endocrinológicas em geral. Os pacientes bipolares estavam todos no estado eutímico da doença e em tratamento no Ambulatório de Psiquiatria do Hospital de

Clínicas da Unicamp. Os voluntários do grupo controle foram colegas do Instituto de Química da Unicamp, alunos e professores.

Um resumo das características das amostras coletadas é apresentado na Tabela 1.1 e os dados correspondentes a cada um dos indivíduos cujas amostras foram coletadas encontram-se nos Anexos 1, 2 e 3.

O transtorno afetivo bipolar é associado a uma prevalência significantemente maior de fumantes em comparação à população em geral [24]. Esta prevalência foi observada no caso das amostras coletadas de pacientes com transtorno afetivo bipolar, o que significa que esta variável não foi controlada no presente estudo.

**Tabela 1.1.** Resumo das características das amostras de soro sangüíneo coletadas

| Grupo | Controle | Pacientes bipolares usando Li | Pacientes bipolares não usando Li |
|---|---|---|---|
| **Número de amostras** | n = 25 | n = 15 | n = 10 |
| **Idade, anos (média ± d.p.)** | 28 ± 5 | 40 ± 13 | 42 ± 17 |
| **Gênero (feminino/masculino)** | 14/11 | 9/6 | 7/3 |
| **Duração da doença, faixa em anos** | NA | 1 - 28 | 1 - 20 |
| **Duração do tratamento atual, faixa em meses** | NA | 2 - 240 | 1 - 120 |
| **Tratamento com antipsicóticos** | NA | 5 | 3 |
| **Tratamento com estabilizadores de humor** | NA | 15 | 10 |
| **Tratamento com antidepressivos** | 2 | 1 | 2 |
| **Tratamento com ansiolíticos** | NA | 5 | 5 |
| **Dose de Li, mg (média ± d.p.)** | NA | 911 ± 325 | NA |
| **Fumantes, %** | 0 | 26,7 | 20,0 |

Abreviações: d.p., desvio padrão; NA, não aplicável.

## 3.4. Obtenção dos espectros de $^{1}$H RMN

Para as análises por $^{1}$H RMN, as amostras de soro foram descongeladas e centrifugadas a 12300*g* por 10 min e a 4 °C, de modo a remover qualquer

precipitado. A seguir, 250 µL das amostras de soro obtidas e 350 µL de $D_2O$ foram adicionados a tubos de RMN de 5,0 mm de diâmetro. Tal procedimento de diluição simples foi empregado de modo a evitar etapas adicionais de preparo de amostra, uma vez que uma das intenções da metodologia proposta é ser aplicada no auxílio à diagnose do transtorno afetivo bipolar e/ou no monitoramento de seu tratamento com lítio. Os espectros de $^1$H RMN foram adquiridos a 25 ºC em um espectrômetro de RMN equipado com uma sonda de ressonância tripla inversa, operando a 499,89 MHz ($B_0$ = 11,7 T). Os espectros unidimensionais padrões foram adquiridos utilizando uma seqüência de pulsos de 90º, com 128 varreduras, duração de pulso de aproximadamente 10 µs e atraso de reciclagem de 2 s.

Para os espectros com edição $T_2$ (tempo de relaxação *spin-spin*), a magnetização foi preparada utilizando uma seqüência *spin-echo*, CPMG D-[-90$^o$-($\tau$-180$^o$-$\tau$)$_n$-ACQ], onde um atraso fixo da relaxação *spin-spin* ($2n\tau$) de 100 ms foi usado de modo a atenuar os sinais largos de moléculas grandes como as proteínas e reter aqueles proveninetes de compostos de baixa massa molar e de alguns componentes lipídicos. Tipicamente, um total de 64 transientes foi adquirido em 32 K de pontos de dados, usando uma janela espectral de 12 kHz, um tempo de aquisição de 1,64 s e um atraso de relaxação de 4 s. Todos os espectros foram corrigidos em fase e em linha de base e referenciados ao pico metil do lactato a 1,33 ppm (3 H, d) $^3$J = 7 Hz, presente em todos os espectros. Estes espectros foram processados com o uso do programa *VNMR* (Varian).

Para confirmar os assinalamentos feitos nos espectros de $^1$H RMN unidimensionais, algumas amostras de soro também foram analisadas por 2-D $^1$H-$^1$H TOCSY com supressão do solvente. Os espectros foram adquiridos com tempo de relaxação de 1,5 s, tempo de supressão do sinal da água de 1,5 s e largura espectral de 6030,5 Hz para as dimensões de $^1$H. Para cada espectro bidimensional, 256 incrementos, com 64 transientes por incremento, foram coletados e estendidos a 4 K de pontos de dados. Os experimentos de TOCSY utilizaram um esquema *spin-lock* MLEV-17 para as transferências $^1$H-$^1$H, com um tempo de associação de 90 ms e uma força de *spin-lock* de 8 kHz. Todos os assinalamentos dos sinais foram baseados em dados da literatura e/ou no banco

de dados *Madison Metabolomics Consortium Database* [25,26] e são indicados no espectro $T_2$-editado e confirmados no espectro bidimensional $^1$H-$^1$H TOCSY.

## 3.5. Tratamento dos dados obtidos por $^1$H RMN utilizando quimiometria

Os dados obtidos por espectroscopia de $^1$H RMN foram transportados a uma matriz de dados e a análise quimiométrica, empregando PCA em intervalos (iPCA) e PLS-DA, foi realizada com o programa MATLAB versão 6.5 (The Mathworks, Natick, EUA).

A iPCA foi realizada para a região espectral de deslocamentos químicos entre -0,5 e 4,4 ppm, onde foram obtidas as melhores informações e o menor ruído. O princípio deste algoritmo consiste em dividir o espectro em regiões eqüidistantes menores e, a seguir, calcular modelos de PCA para cada intervalo e apresentar os resultados em múltiplos gráficos de *scores* [27]. Foram utilizadas três componentes principais e o pré-tratamento SNV foi realizado com o intuito de reduzir o deslocamento da linha de base dos espectros.

A PLS-DA foi utilizada para obtenção de uma visão geral dos dados, bem como auxiliar nos estudos exploratórios e sua interpretação, por exemplo, ao verificar o agrupamento entre as amostras e sua classificação. A área espectral analisada foi a mesma utilizada para as análises por iPCA. O pré-tratamento OSC foi empregado, de modo a remover informações não correlacionadas às variáveis-alvos, empregando análise de componentes principais restrita. Este processo de filtração dos dados é particularmente importante em estudos metabonômicos envolvendo amostras de origem humana como este, devido à grande variabilidade existente nas populações em relação a estudos envolvendo animais controlados em laboratório [28]. No procedimento de OSC, a matriz *X* foi corrigida pela subtração da variação ortogonal à calibração do vetor *y* [29]. Neste trabalho, o vetor *y* continha a classe correspondente a cada amostra. Este vetor foi utilizado para ambos os algoritmos, pré-tratamento OSC e PLS-DA.

Todas as variáveis foram centradas na média, os espectros foram normalizados e foi realizada uma validação cruzada *leave one out*. Após esta análise, outra validação do modelo foi efetuada, dividindo aleatoriamente as amostras em conjuntos de calibração e validação e construindo um novo modelo PLS-DA, utilizando o conjunto de calibração e as mesmas condições do modelo anterior. Desse modo, foi realizada uma previsão de classes das amostras de validação.

# 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

## 4.1. Análise dos dados espectrais de $^{1}$H RMN por quimiometria

Com o objetivo de determinar se o transtorno afetivo bipolar e/ou o seu tratamento com lítio ocasiona alterações no perfil metabólico do soro sangüíneo, foram realizados estudos metabonômicos utilizando a espectroscopia de $^{1}$H RMN com análise dos dados por quimiometria. Primeiramente, foram obtidos os espectros unidimensionais para todas as amostras provenientes dos três grupos estudados. A região espectral entre 4,5 e 4,8 ppm foi descartada das análises quimiométricas devido ao sinal da água residual (HDO, 4,7 ppm), que está presente em grande quantidade nas amostras de soro. Já a região acima de 4,8 ppm não apresentou diferenças importantes entre os grupos e, por isso, também não foi considerada para as análises quimiométricas.

De modo a explorar todas as potenciais diferenças nos perfis metabólicos dos grupos estudados, os espectros de RMN foram primeiramente pré-tratados por SNV e, então, segmentados em intervalos de 0,6 ppm e analisados por iPCA. Com base nos resultados das análises por iPCA, foi possível observar uma distinção das amostras em dois grupos: controle e pacientes com transtorno afetivo bipolar (independentemente do tratamento). A Figura 1.1 ilustra o gráfico de *scores* PCA para o intervalo entre 1,4 e 2,0 ppm, onde é possível visualizar esta diferenciação entre os grupos. Algumas amostras apresentaram um comportamento diferente em relação à maioria do grupo, porém, é difícil

determinar exatamente a razão para tais diferenciações nos perfis metabólicos, uma vez que não existe uma tendência única para explicar a presença destes *outliers*. Um caso interessante envolve um indivíduo do grupo controle que foi classificado no grupo de pacientes bipolares. Este sujeito não faz uso de medicações nem apresenta histórico de doenças psiquiátricas, porém, sua irmã mais nova possui o transtorno afetivo bipolar. Esta observação pode estar de acordo com pesquisas anteriores que evidenciam uma característica genética do transtorno [30].

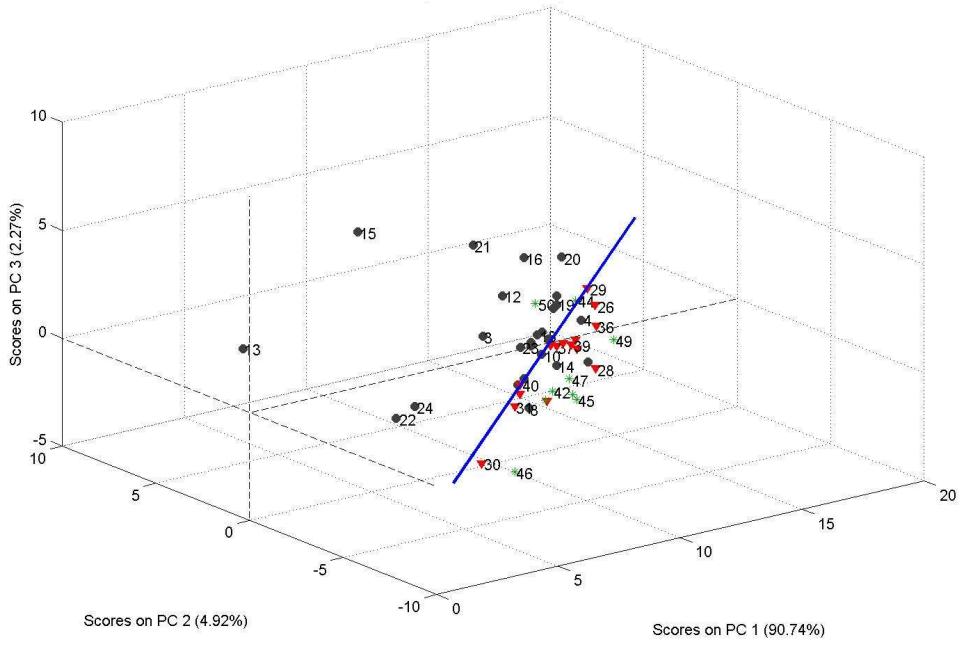



**Figura 1.1.** Gráfico dos *scores* PCA para o intervalo de deslocamentos químicos entre 1,4 e 2,0 ppm. As amostras do grupo controle, dos pacientes bipolares tratados com lítio e dos pacientes bipolares não tratados com lítio são representados como ●, ▼ e *, respectivamente.

A seguir, os espectros de $^{1}$H RMN foram normalizados, pré-tratados por OSC e analisados por PLS-DA. A Figura 1.2 mostra o gráfico de *scores* PLS-DA para o melhor modelo construído, que consistiu na utilização de 10 variáveis latentes (LVs) com percentual de variância de 98,74% no bloco *X* (espectros) e 62,05% no bloco *Y* (classes).

A partir desta análise, os três grupos estudados (controle, pacientes bipolares tratados com lítio e pacientes bipolares não tratados com lítio) mostraram tendências a formarem grupos distintos, conforme ilustrado na Figura

1.2. As amostras do grupo controle apresentaram *scores* abaixo de zero na LV1, ficando distantes das demais amostras, que apresentaram *scores* acima de zero. Embora as amostras dos grupos de pacientes bipolares não terem formado grupos individuais, é possível observar diferentes tendências em cada conjunto. As amostras do grupo de pacientes bipolares tratados com lítio apresentam uma tendência a ter valores negativos em LV2, enquanto as amostras do grupo de pacientes bipolares não tratados com lítio apresentam uma tendência a ter valores positivos em LV2.

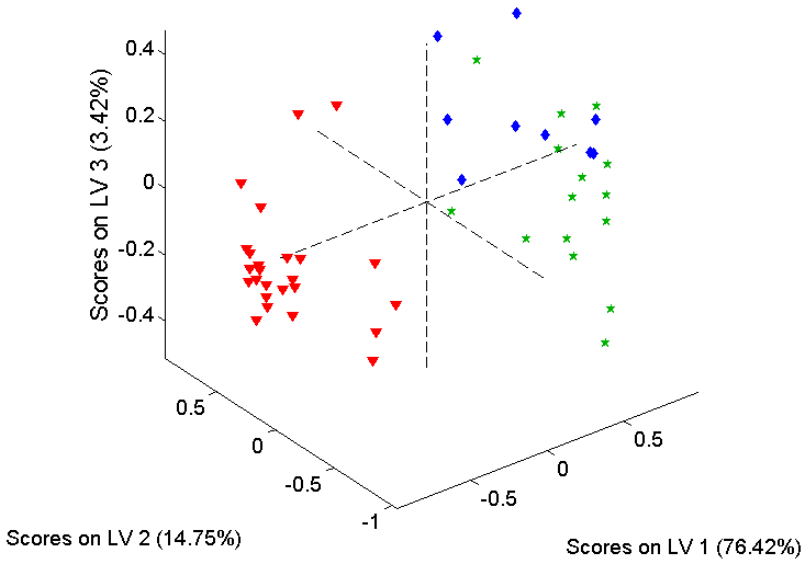



**Figura 1.2.** Gráfico dos *scores* PLS-DA para o intervalo de deslocamentos químicos entre -0,5 e 4,4 ppm. As amostras do grupo controle, dos pacientes bipolares tratados com lítio e dos pacientes bipolares não tratados com lítio são representados como ▼, ★ e ♦, respectivamente.

De modo a avaliar se a idade e a porcentagem de fumantes influencia a separação entre os grupos estudados, foram construídos dois novos modelos PLS-DA:

(i) excluindo indivíduos do grupo controle, de modo que a média de idades não diferia entre os grupos com significância estatística de 95%, de acordo com o teste Tukey [31] (n = 15, média de idade: 31 ± 5 anos, gênero: 9 feminino e 6 masculino); e

(ii) excluindo os indivíduos fumantes dos grupos de pacientes bipolares.

De acordo com a Figura 1.3, foi possível verificar que estes parâmetros (média de idade e número de fumantes) não mostraram influência significativa em relação às diferenciações observadas previamente para os grupos estudados em relação aos perfis de metabólitos.

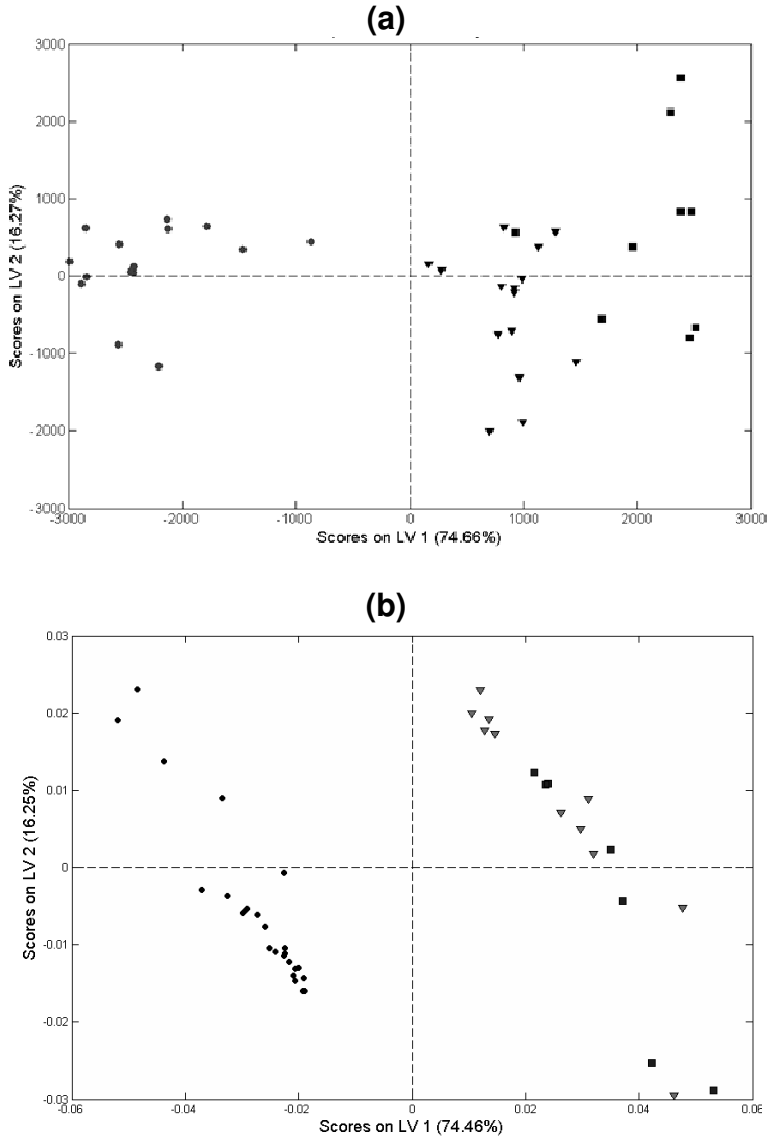



**Figura 1.3.** Gráfico dos *scores* PLS-DA (LV = 4) para o intervalo de deslocamentos químicos entre -0,5 e 4,4 ppm: **(a)** considerando o grupo controle com idade similar a dos grupos de pacientes bipolares e **(b)** excluindo-se os indivíduos fumantes. Os grupos controle, pacientes bipolares tratados com lítio e pacientes bipolares não tratados com lítio são representados como •, ▼ e ■, respectivamente.

O gráfico de *loadings* (Figura 1.4) assinala as variáveis mais significantes, pela descrição da influência e da relação entre as variáveis no plano modelo [32]. Assim sendo, é possível concluir que a separação entre os grupos se deve principalmente aos picos com deslocamentos químicos 0,99; 1,04; 1,33 e 1,93 ppm. Tais picos referem-se à valina, ao lactato, a lipídios e a lipoproteínas. Outros deslocamentos químicos importantes na diferenciação entre os grupos estudados estão descritos no próximo item e listados na Tabela 1.2.

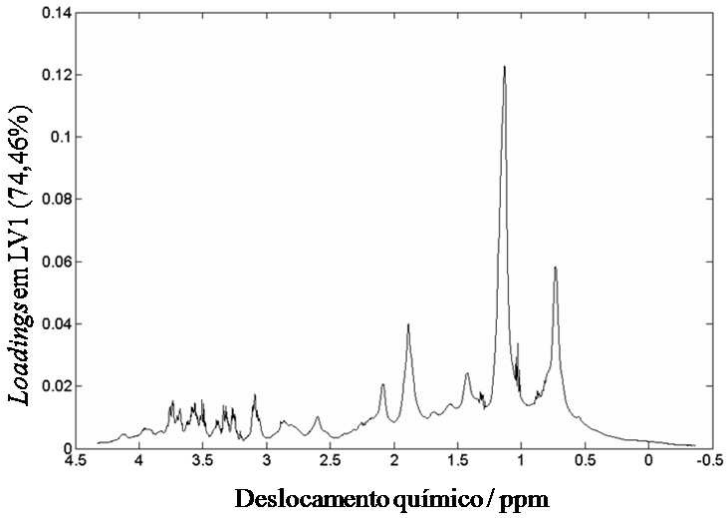



**Figura 1.4.** Gráfico dos *loadings* PLS-DA na primeira variável latente para o intervalo de deslocamentos químicos entre -0,5 e 4,4 ppm.

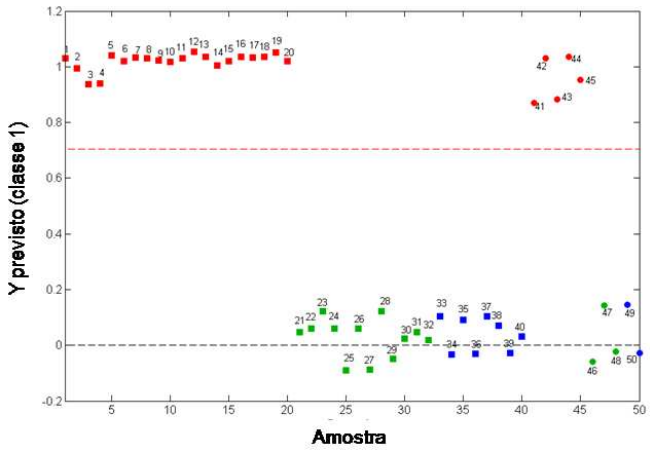
De modo a validar o modelo quimiométrico, as amostras foram divididas aleatoriamente em conjuntos de calibração e validação. Foram selecionadas cinco, três e duas amostras dos grupos controle, bipolares tratados com lítio e bipolares não tratados com lítio, respectivamente, para os conjuntos de validação.

Um novo modelo PLS-DA foi construído usando o conjunto de calibração e aplicando as mesmas condições do modelo anterior (mesmo número de LVs) e, de modo a construí-lo, os espectros do conjunto de calibração foram corrigidos com OSC e normalizados. Uma vez feita a correção, os dados de validação ou previsão foram corrigidos por meio da função: **NEWX = X - X*NW*inv(NP'*NW)*NP'**, onde **NEWX** é a matriz corrigida de validação ou previsão, **X** é a matriz de validação ou previsão original, **NW** é a matriz de pesos,

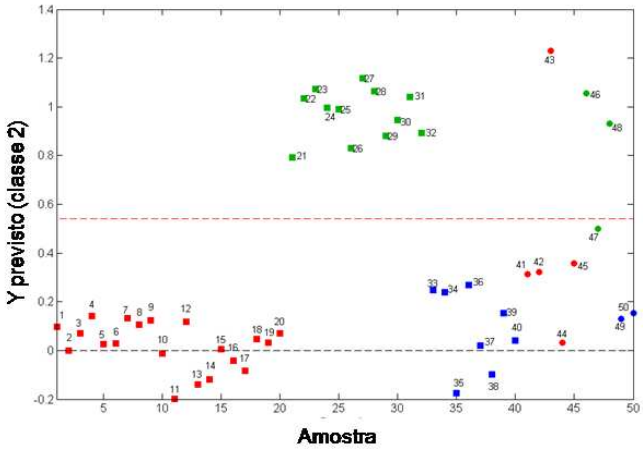
**NP** é a matriz de *loadings* e **NT** é a matriz de *scores* que foram utilizados na correção. **Inv** é o inverso da matriz quadrada **(NP'*NW)*NP'**. O algoritmo OSC fornece todos estes parâmetros (PLS Toolbox 3.5 for MATLAB, Eigenvector Research, Wenatchee, EUA). A porcentagem de variância foi de 98,90% no bloco *X* e 93,94% no bloco *Y*.

Foi realizada uma validação cruzada *leave one out*, com erros de 0, 20,24 e 15,62%, respectivamente aos grupos controle, pacientes bipolares tratados com lítio e pacientes bipolares não tratados com lítio. A Figura 1.5 mostra as previsões para as três classes de grupos estudados. É possível observar que as mesmas foram bem precisas ao classificar as amostras no grupo controle e nos grupos de pacientes bipolares. Dois erros ocorreram na previsão do grupo de pacientes bipolares tratados com lítio, onde o modelo previu a amostra 43, que na verdade pertence ao grupo controle, dentro deste grupo e deixou de prever a amostra 47.

**(a)**




**(b)**



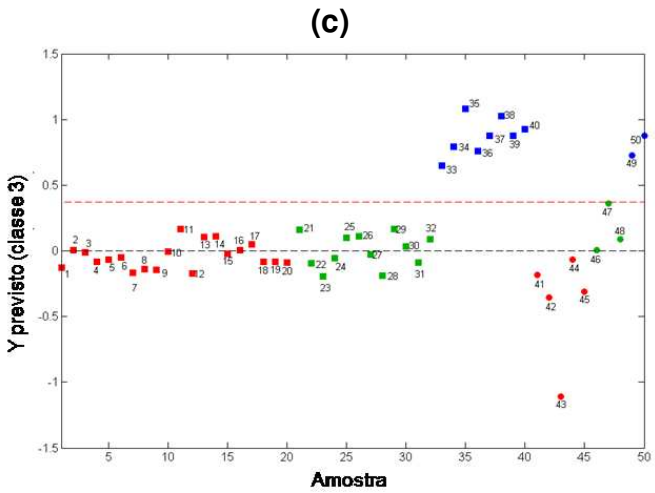



**Figura 1.5.** Previsões para **(a)** classe 1 (controle), **(b)** classe 2 (bipolares tratados com lítio) e **(c)** classe 3 (bipolares não tratados com lítio). As amostras marcadas com ■ pertencem ao conjunto de calibração e as amostras marcadas com • referem-se ao conjunto de validação. As amostras em vermelho, verde e azul referem-se às classes 1, 2 e 3, respectivamente. A linha pontilhada em vermelho (a-c) é o *threshold*.

## 4.2. Identificação dos metabólitos diferenciais

A identificação dos metabólitos diferenciais entre os grupos controle e pacientes bipolares tratados com lítio ou não foi realizada a partir da relação entre os resultados obtidos por quimiometria, em especial o gráfico de *loadings* (Figura 1.4), que assinalou os picos mais significantes na diferenciação entre os grupos, com as informações espectrais obtidas por espectroscopia de $^{1}$H RMN.

A Figura 1.6 (a-c) mostra os espectros de $^{1}$H RMN para uma amostra de cada um dos grupos estudados. O mesmo padrão foi observado em todos os espectros, porém, alguns picos específicos apresentaram diferentes intensidades para cada grupo, assim como demonstrado pela análise por PLS-DA. A Figura 1.6 (d) mostra estes picos, sendo que os metabólitos identificados por meio da comparação de seus deslocamentos químicos com aqueles reportados na literatura [33,34] foram lipídeos, moléculas relacionadas ao metabolismo de lipídeos e aminoácidos (vide Tabela 1.2).

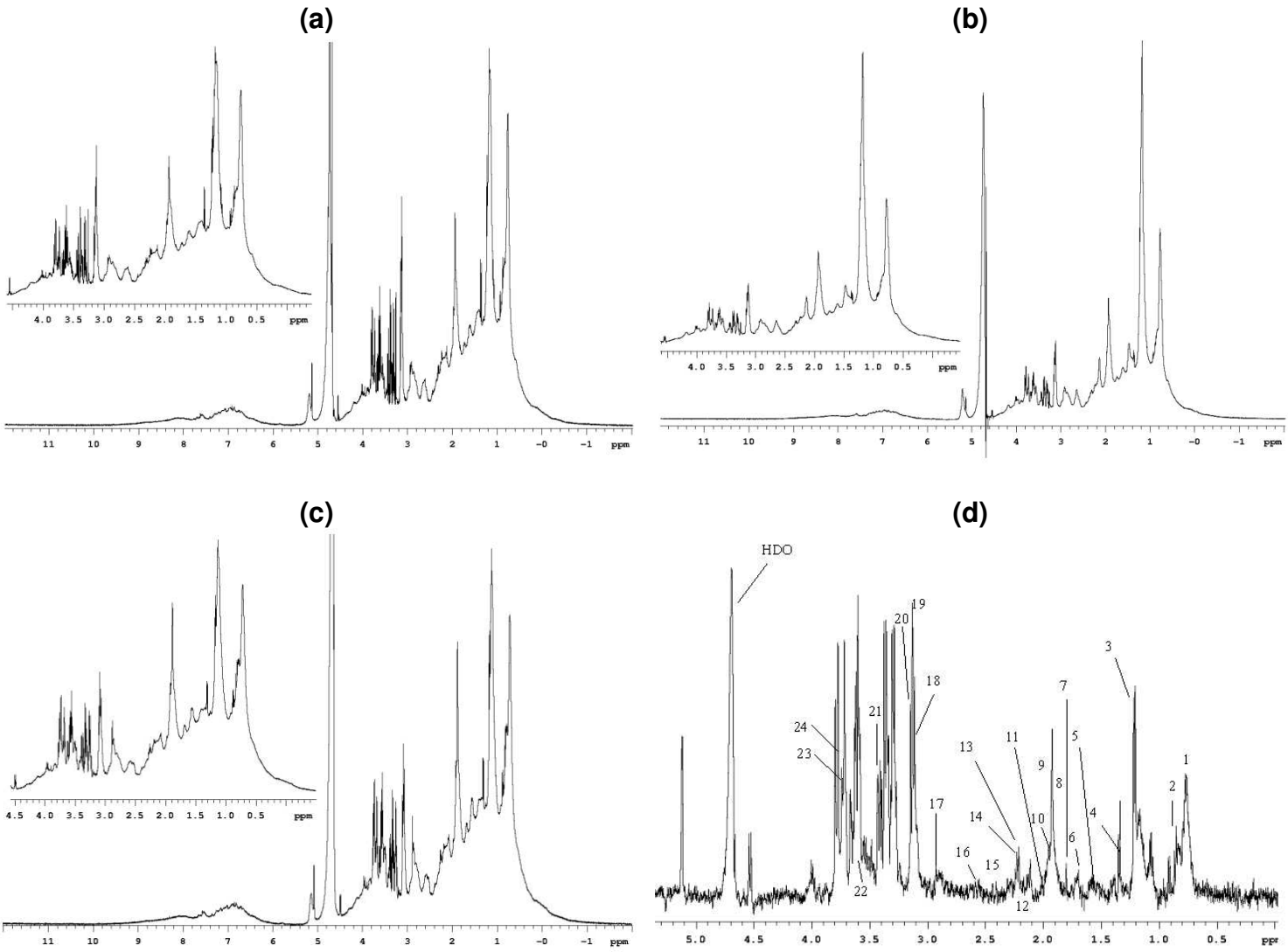



**Figura 1.6.** Espectros de $^{1}$H RMN (intensidade *x* deslocamento químico em ppm) para uma amostra de soro de: **(a)** um indivíduo controle, **(b)** um paciente bipolar tratado com lítio e **(c)** um paciente bipolar não tratado com lítio. A região expandida entre -0,5 e 4,4 ppm, utilizada na análise quimiométrica é mostrada nos cantos superiores esquerdos (a-c). As atribuições dos picos descritos na Tabela 1.2 são mostradas em **(d)**, em um espectro $T_2$-editado de uma amostra controle.

Os metabólitos que apresentaram maiores diferenças na distinção entre indivíduos do grupo controle e pacientes bipolares, bem como entre os pacientes tratados com lítio ou não, estão assinalados em negrito na Tabela 1.2 e consistem em lipídeos de glicoproteínas, lipídeos mono e poliinstaurados, e moléculas relacionadas ao metabolismo de lipídeos (acetato, colina, glutamato e *mio*-inositol).

**Tabela 1.2.** Atribuições dos deslocamentos químicos para os metabólitos identificados nos espectros de $^1$H RMN das amostras de soro sangüíneo. Em negrito, estão destacados os metabólitos que apresentaram maior diferenciação entre os grupos estudados

| Pico[a] | Deslocamento químico / ppm | Molécula | Atribuições |
|---|---|---|---|
| 1 | 0,99 | Valina, lipídeos, lipoproteínas, lipídeos móveis | $CH_3$ |
| 2 | 1,04 | Valina, picos largos sob proteínas | $CH_3$ |
| 3 | 1,33 | Lactato, lipídeos, lipoproteínas, lipídeos móveis | $CH_2$ |
| 4 | 1,48 | Alanina | $CH_3$ |
| 5 | 1,57 | Lipídeos (principalmente VLDL[b]) | $CH_2CH_2CO$ |
| 6 | 1,72 | Lipídeos | $CH_2CH_2CH=CH$ |
| **7** | **1,93** | **Lipídeos** | **$CH_2CH=CH$** |
| **8** | **1,95** | **Lipídeos de glicoproteína** | **$CH_2CH_2CH=CH$** |
| 9 | 1,99 | Prolina | β-H |
| 10 | 2,04 | Glutamina | β-H |
| **11** | **2,12** | **Acetato** | **$CH_3$** |
| 12 | 2,24 | Valina | β-H |
| 13 | 2,29 | Prolina | β-H |
| 14 | 2,30 | Glutamato | γ-H |
| 15 | 2,44 | Asparagina | β-H |
| **16** | **2,6 e 2,64** | **Lipídeos** | **$CH=CHCH_2CH=CH$** |
| 17 | 2,81, 2,83 e 2,85 | Albumina lisil | ε-$CH_2$ |
| 18 | 3,03 | Lisina, creatina | δ-H (Lisina) |
| **19** | **3,21** | **Colina** | **δ-$CH_2$** |
| 20 | 3,24 | Arginina, glicose | δ-H (Arginina) |
| 21 | 3,37 | Prolina, glicose | δ-H (Prolina) |
| **22** | **3,54** | ***Mio*-inositol** | **H1, H3** |
| 23 | 3,77 | Arginina | α-H |
| **24** | **3,79** | **Lisina** | **α-H** |

[a] de acordo com a Figura 1.6 (d); [b] lipídeos de baixa densidade, do inglês, *very low density lipids*.

A Figura 1.7 mostra a confirmação da identidade dos metabólitos diferenciais assinalados na Figura 1.6 (d) e na Tabela 1.2, por meio de um espectro bidimensional $^1$H-$^1$H TOCSY. A $^1$H-$^1$H TOCSY cria correlações entre todos os prótons dentro de um determinado sistema de *spins*, não somente os

geminais ou vicinais. Tais correlações são observadas entre prótons distantes até que haja acoplamentos entre cada próton interferente [35].

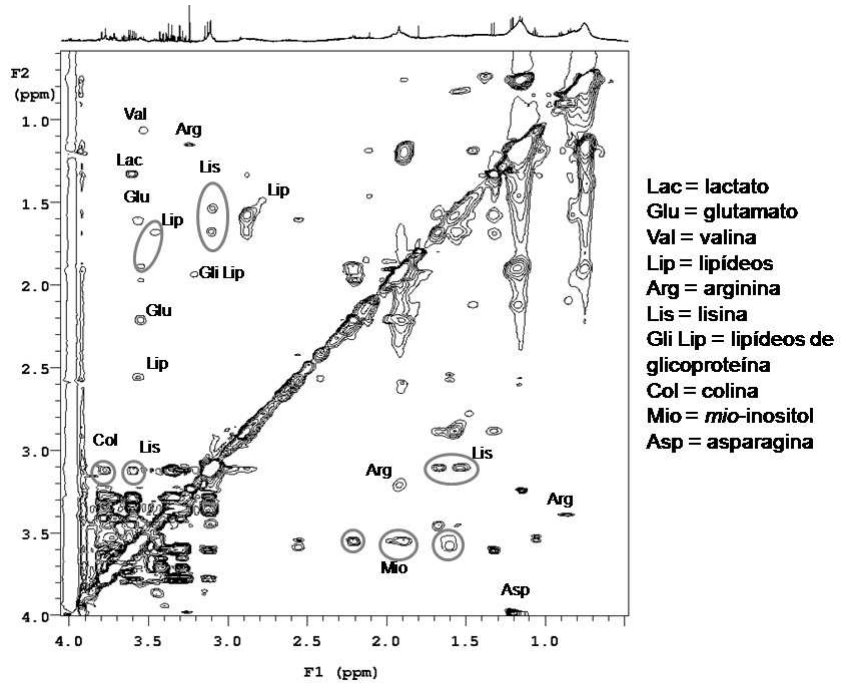



**Figura 1.7.** Espectro $^{1}H$-$^{1}H$ TOCSY de uma amostra de soro do grupo controle com a identificação de alguns metabólitos diferenciais.

Os resultados encontrados neste trabalho de Tese a respeito das alterações metabólicas detectadas em soro sangüíneo (nível sistêmico) corroboram com aqueles encontrados na literatura recente, onde amostras de cérebro *post-mortem* de humanos e de ratos tratados com lítio ou valproato foram utilizadas para estudar o transtorno afetivo bipolar em nível local [36], especialmente em termos de alterações nos níveis de glutamato e *mio*-inositol, sendo que os níveis encontrados em ambos os casos foram maiores em pacientes bipolares em relação aos indivíduos saudáveis.

Considerando o efeito do tratamento com lítio, observou-se uma discrepância em relação à literatura [36]. Enquanto no presente estudo os níveis de *mio*-inositol encontrados foram maiores nos pacientes bipolares, independentemente do tratamento (assim como no caso do glutamato), os níveis deste metabólito foram reduzidos nas amostras de cérebros de ratos tratados com

lítio. Tal resultado demonstra a problemática envolvida no uso de modelos animais para o estudo de doenças psiquiátricas.

As alterações nos níveis de *mio*-inositol podem refletir um aumento na atividade da enzima inositol monofosfatase (IMPase), o que pode levar a um acréscimo nos níveis de compostos contendo *mio*-inositol em pacientes tratados com lítio [37], o que está de acordo com os resultados obtidos no presente trabalho, onde o *mio*-inositol foi encontrado com um maior nível no soro de pacientes bipolares em relação ao grupo controle.

Schwarz *et al.* [38] analisaram amostras de cérebro (matéria cinzenta e branca) e células vermelhas do sangue por LC-MS, de modo a obter o perfil metabólico das mesmas e comparar indivíduos esquizofrênicos e bipolares. Neste estudo, os autores detectaram alterações significativas nos níveis de lipídeos (ácidos graxos livres e fosfatidilcolina), sugerindo que alterações no metabolismo lipídico podem ser características intrínsecas da esquizofrenia e do transtorno afetivo bipolar, assim como sugerem os resultados obtidos no presente trabalho.

## 5. CONCLUSÕES PARCIAIS

A obtenção do perfil metabólico de amostras de soro sangüíneo por espectroscopia de $^{1}$H RMN e análises quimiométricas mostrou-se uma estratégia eficiente para diferenciar, exploratoriamente, indivíduos saudáveis de pacientes bipolares, bem como distinguir pacientes bipolares sob diferentes tratamentos, utilizando o lítio ou não.

Os metabólitos que apresentaram maiores diferenças na distinção entre indivíduos do grupo controle e pacientes bipolares, bem como entre os pacientes tratados com lítio ou não, consistem em lipídeos de glicoproteínas, lipídeos mono e poliinstaurados, e moléculas relacionadas ao metabolismo de lipídeos (acetato, colina, glutamato e *mio*-inositol). A partir dos resultados obtidos neste estudo, pode-se concluir que a metodologia proposta permitiu a detecção de múltiplos metabólitos diferenciais simultaneamente, fornecendo um padrão geral para o transtorno afetivo bipolar e seu tratamento com lítio.

Vale ressaltar que o mecanismo das alterações metabólicas em amostras de soro de pacientes bipolares, considerando o tratamento com lítio ou não, deve ser futuramente estudado. A análise por espectroscopia de $^{1}H$ RMN fornece somente uma figura estática dos metabólitos detectados, não permitindo a determinação das taxas de metabolismo ou alterações nas rotas metabólicas que podem ser modificadas na presença da doença ou do tratamento com lítio. Os metabólitos diferenciais identificados neste trabalho podem guiar estudos futuros envolvendo a patofisiologia do transtorno afetivo bipolar, nos mecanismos de ação do tratamento com lítio, bem como na descoberta de biomarcadores.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] Biomarkers Definitions Working Group, *Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework*, **Clin Pharmacol Therapeutics** 69 (2001) 89-95.

[2] OF Laterza, RC Hendrickson, JA Wagner, *Molecular Biomarkers*, **Drug Information J** 41 (2007) 573-585.

[3] JN Adkins, SM Varnun, KJ Auberry, RJ Moore, NH Angell, RJ Smith, DL Springer, JG Pounds, *Toward a human blood serum proteome – Analysis by multidimensional separation coupled with mass spectrometry*, **Mol Cell Proteomics** 1 (2002) 947-952.

[4] P Lescuyer, D Hochstrasser, T Rabilloud, *How shall we use the proteomics toolbox for biomarker discovery?*, **J Proteome Res** 6 (2007) 3371-3376.

[5] P Horvatovich, N Govorukhina, R Bischoff, *Biomarker discovery by proteomics: challenges not only for the analytical chemist*, **Analyst** 131 (2006) 1193-1196.

[6] JL Luque-Garcia, TA Neubert, *Sample preparation for serum/plasma profiling and biomarker identification by mass spectrometry*, **J Chromatogr A** 1153 (2007) 259-276.

[7] DM Good, V Thongboonkerd, J Novak, JL Bascands, JP Schanstra, JJ Coon, A Dominiczak, H Mischak, *Body fluids proteomics for biomarker discovery: lessons from the past hold the key to success in the future*, **J Proteome Res** 6 (2007) 4549-4555.

[8] FG de Matos e Souza, *Tratamento do transtorno bipolar – Eutimia*, **Revista de Psiquiatria Clínica** 32 (2005) 63-70.

[9] US National Institute of Mental Health, http://www.nimh.nih.gov/, acessado em 15 de março (2008).

[10] R Machado-Vieira, RA Bressan, B Frey, JC Soares, *As bases neurológicas do transtorno bipolar*, **Revista de Psiquiatria Clínica** 32 (2005) 28-33.

[11] J Mendels, **Conceitos de Depressão**, Livros Técnicos e Científicos Editora Ltda., Rio de Janeiro (1972).

[12] HI Kaplan, BJ Sadock, JA Grebb, **Compêndio de Psiquiatria – Ciências do comportamento e Psiquiatria Clínica**, 7ª edição, Artmed Editora, Porto Alegre (1997).

[13] CJ Phiel, PS Klein, *Molecular targets of lithium action*, **Annu Rev Pharmacol Toxicol** 41 (2001) 789-813.

[14] MP Freeman, SA Freeman, *Lithium: clinical considerations in internal medicine*, **Am J Med** 119 (2006) 478-481.

[15] AC Andreazza, C Cassini, AR Rosa, MC Leite, LMV de Almeida, P Nardin, ABN Cunha, KM Ceresér, A Santin, C Gottfried, M Salvador, F Kapczinski, CA Gonçalves, *Serum S100B and antioxidant enzymes in bipolar patients*, **J Psychiatric Res** 41 (2007) 523-529.

[16] WB Dunn, DI Ellis, *Metabolomics: current analytical platforms and methodologies*, **Trends Anal Chem** 24 (2005) 285-294.

[17] H Winning, FH Larsen, R Bro, SB Engelsen, *Quantitative analysis of NMR spectra with chemometrics*, **J Magn Reson** 190 (2008) 26-32.

[18] JK Nicholson, JC Lindon, *Metabonomics*, **Nature** 455 (2008) 1054-1056.

[19] L Eriksson, H Antti, J Gottfries, E Holmes, E Johansson, F Lindgren, I Long, T Lundstedt, J Trygg, S Wold, *Using chemometrics for navigating in the large data sets of genomics, proteomics, and metabonomics (gpm)*, **Anal Bioanal Che**m 380 (2004) 419-429.

[20] H Martens, T Naes, **Multivariate Calibration**, John Wiley & Sons, Chichester (1993).

[21] IM Figueiredo, **Técnicas de RMN recentes aplicadas às interações proteína-ligante e a metabonômica**, Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas (2006).

[22] R Kaddurah-Daouk, J McEvoy, RA Baillie, D Lee, JK Yao, PM Doraiswamy, KRR Krishnan, *Metabolomic mapping of atypical antipsychotic effects in schizophrenia*, **Mol Psychiatry** 12 (2007) 934-945.

[23] *Greiner Bio-One Brasil*, http://www.gbo.com/preanalytics-br/por/, acessado em 26 de Fevereiro de 2008.

[24] FJ Diaz, D James, S Botts, L Maw, MT Susce, J de Leon, *Tobacco smoking behaviors in bipolar disorder: a comparison of the general population, schizophrenia, and major depression*, **Bipolar Disorders** 11 (2009) 154-165.

[25] Q Cui, IA Lewis, AD Hegeman, ME Anderson, J Li, CF Schulte, WM Westler, HR Eghbalnia, MR Sussman, JL Markley, *Metabolite identification via the Madison Metabolomics Consortium Database*, **Nat Biotechnol** 26 (2008) 162-164.

[26] *Madison Metabolomics Consortium Database*, http://mmcd.nmrfam.wisc.edu/, acessado em 20 de Julho de 2009.

[27] L Nørgaard, *The iToolbox for MATLAB*, http://www.models.life.ku.dk, acessado em 27 de Julho de 2009.

[28] JT Brindle, JK Nicholson, PM Schofield, DJ Grainger, E Holmes, *Application of chemometrics to $^{1}H$ NMR spectroscopic data to investigate a relationship between human serum metabolic profiles and hypertension*, **Analyst** 128 (2003) 32-36.

[29] MM Sena, ZF Chaudhry, CH Collins, RJ Poppi, *Direct determination of diclofenac in pharmaceutical formulations containing B vitamins by using UV spectrophotometry and partial least squares regression*, **J Pharm Biomed An**al 36 (2004) 743-749.

[30] T Kato, *Molecular genetics of bipolar disorder*, **Neurosci Res** 40 (2001) 105-113.

[31] JC Miller, JN Miller, **Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry**, 4ª edição, Pearson Prentice Hall, New Jersey (2005).

[32] J Trygg, E Holmes, T Lundstedt, *Chemometrics in metabonomics*, **J Proteome Res** 6 (2007) 469-479.

[33] JK Nicholson, PJD Foxall, M Spraul, RD Farrant, JC Lindon, *750 MHz H-1 and H-1 C-13 NMR spectroscopy of human blood plasma*, **Anal Chem** 67 (1995) 793-811.

[34] H Tang, Y Wang, JK Nicholson, JC Lindon, *Use of relaxation-edited one-dimensional and two dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy to improve detection of small metabolites in blood plasma*, **Anal Biochem** 325 (2004) 260-272.

[35] *NMR Wiki*, http://nmrwiki.org, acessado em 26 de Novembro de 2009.

[36] MJ Lan, GA McLoughlin, JL Griffin, TM Tsang, JTJ Huang, P Yuan, H Manji, E Holmes, S Bahn, *Metabonomic analysis identifies molecular changes associated with the pathophysiology and drug treatment of bipolar disorder*, **Mol Psychiatry** 14 (2009) 269-279.

[37] BP Forester, CT Finn, YA Berlow, M Wardrop, PF Renshaw, CM Moore, *Brain lithium, N-acetyl aspartate and myo-inositol levels in older adults with bipolar disorder treated with lithium: a lithium-7 and proton magnetic resonance spectroscopy study*, **Bipolar Disorders** 10 (2008) 691-700.

[38] E Schwarz, S Prabakaran, P Whitfield, H Major, FM Leweke, D Koethe, P McKenna, S Bahn, *High throughput lipidomic profiling of schizophrenia and bipolar disorder brain tissue reveals alterations of free fatty acids, phosphatidylcholines, and ceramides*, **J Proteome Res** 7 (2008) 4266-4277.

# CAPÍTULO 2

# ESTUDOS PROTEÔMICOS

# 1. OBJETIVOS

Os objetivos do presente Capítulo consistiram na avaliação do perfil proteômico das amostras de soro de indivíduos saudáveis e pacientes com transtorno afetivo bipolar sob tratamento com lítio ou não, com posterior identificação de proteínas que apresentaram diferença significativa na expressão ao comparar os três grupos estudados.

Esta etapa da Tese foi desenvolvida durante período sanduíche do Doutorado realizado no Instituto Max Planck de Medicina Experimental, localizado na cidade de Göttingen, Alemanha.

# 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Na Revisão Bibliográfica apresentada a seguir, serão discutidos os principais temas de estudo envolvidos neste Capítulo, iniciando pela aplicação da espectrometria de massas em análises proteômicas.

## 2.1. Espectrometria de massas em análises proteômicas

A espectrometria de massas é uma ferramenta essencial para a análise de proteínas, devido não apenas à sua sensibilidade, mas, também, ao conteúdo total de informações que pode ser obtido. Os espectrômetros de massas podem ser utilizados tanto para a simples determinação da massa molar de um polipeptídeo quanto para a determinação da seqüência de aminoácidos, identificação de novos biomarcadores, interações proteína-proteína e caracterização de modificações pós-traducionais [1,2]. No primeiro caso, os espectrômetros são empregados para análise em um único estágio e, nos últimos casos, íons específicos são selecionados e submetidos à fragmentação, e, então, um segundo espectro é obtido. Este procedimento é denominado espectrometria de massas em seqüência (MS/MS) [1].

A primeira etapa nos experimentos de identificação de proteínas por espectrometria de massas consiste em dividir a proteína de interesse em uma série representativa de peptídeos, de modo que estes apresentem massas molares dentro da faixa de massas detectáveis pelos espectrômetros. O método mais comum para produzir peptídeos visando a análise posterior por espectrometria de massas é a digestão de proteínas com enzimas proteolíticas, em geral, a tripsina. A tripsina cliva as ligações peptídicas de proteínas após os grupos carboxílicos dos resíduos de lisina (K) e arginina (R), exceto quando estas ligações são com resíduos de prolina (P), ou seja, ligações K-P ou R-P, produzindo peptídeos pequenos (na faixa de 600 a 2500 Da) [3].

Os espectrômetros de massas consistem em uma fonte de íons, um analisador de massas, um detector de íons e uma unidade de aquisição de dados. As técnicas de ionização mais empregadas em análise de proteínas são a MALDI e a ESI e os tipos básicos de analisadores de massas são o *ion trap* (IT), o quadrupolo (Q) e o tempo de vôo (TOF).

Os princípios da técnica podem ser contemplados pelas quatro funções de um espectrômetro de massas: (i) ionização, onde a molécula de interesse é carregada, resultando na formação de um íon positivo ou negativo em fase gasosa; (ii) separação dos íons de acordo com suas razões massa/carga (*m/z*); (iii) medida de massa, de acordo com algum parâmetro físico; e (iv) medida de abundância, baseada na altura ou área do pico obtido [3].

De acordo com os objetivos deste trabalho, a SELDI-TOF MS e a MALDI-TOF MS/MS foram utilizadas para o estudo do perfil protéico das amostras de soro sangüíneo e para a caracterização de proteínas diferenciais. Ambas as técnicas são descritas a seguir.

### 2.1.1. SELDI-TOF MS

A tecnologia SELDI foi descrita pela primeira vez na literatura em 1993, entretanto, sua aplicação em estudos proteômicos começou a se tornar significativa somente a partir de 2003. Esta técnica é baseada na utilização de

vários princípios cromatográficos e de superfícies biológicas, empregando uma seleção de proteínas em *chip* (disponível comercialmente sob o nome *ProteinChip*) a partir de misturas complexas, de acordo com suas propriedades físico-químicas, com a subseqüente ionização das moléculas retidas para um detector que as classifique de acordo com as razões *m/z* [4].

O arranjo *ProteinChip* pode ser classificado em dois grupos, de acordo com suas características de superfície. Um grupo envolve a superfície química, incluindo superfícies hidrofóbicas, hidrofílicas, catiônicas, aniônicas ou por afinidade com íon metálico imobilizado, que captura as proteínas-alvo de maneira não-específica. O outro grupo envolve a superfície biológica, incluindo anticorpos, DNA, enzimas, receptores ou fármacos, que podem reconhecer as proteínas-alvo especificamente [5].

O procedimento de análise e detecção das proteínas por SELDI envolve quatro etapas: (i) adição da amostra e separação das proteínas no *chip*; (ii) lavagem com solvente apropriado ou tampão para remover as proteínas não ligadas ou interferentes; (iii) adição de matriz absorvedora de radiação UV à superfície do *chip*; e (iv) análise em um instrumento SELDI-TOF MS, equipado com uma fonte pulsada de laser de nitrogênio, cujo funcionamento é similar ao da MALDI-TOF MS. Após a ativação pelo laser, as proteínas contidas na superfície do arranjo são dessorvidas e ionizadas, e subseqüentemente aceleradas por um campo elétrico até o tubo de vôo, onde são separadas de acordo com suas razões *m/z*, até atingirem o detector [5].

A SELDI é bastante efetiva na detecção de proteínas de baixa massa molar, sendo importante como uma técnica complementar à eletroforese bidimensional em gel na visualização de potenciais biomarcadores protéicos. As vantagens da SELDI sobre a eletroforese em gel consistem na maior sensibilidade e em requerer menores quantidades de amostra e tempo de análise.

Mei *et al.* [6] utilizaram a SELDI-TOF MS para estabelecer o perfil de expressão protéica em tecidos cerebrais derivados do córtex pré-frontal dorsolateral de indivíduos esquizofrênicos, coletados posteriormente à morte. A esquizofrenia é um distúrbio mental severo que afeta 1% da população mundial.

Assim como no caso do transtorno afetivo bipolar, sua patogênese não é ainda estabelecida, o que justifica o grande interesse na identificação de moléculas (no caso, proteínas) que sofrem alterações em seus níveis na presença da esquizofrenia, ou seja, biomarcadores.

Para isso, foram utilizadas 34 amostras provenientes de indivíduos com esquizofrenia e 35 amostras de indivíduos não-esquizofrênicos (grupo controle). As proteínas foram extraídas dos tecidos utilizando-se um tampão contendo uréia, surfactante não-iônico e Tris-HCl em pH 9,0, diluídas e aplicadas em quatro arranjos de proteínas com superfícies químicas diferentes: IMAC30 (captura por afinidade com íon metálico imobilizado), CM10 (troca catiônica fraca), Q10 (troca aniônica forte) e H50 (hidrofóbica). Após o processamento dos arranjos, foram obtidas as medidas de massas e as intensidades dos picos de proteínas, sendo que a área ou amplitude do pico foi considerada como proporcional à abundância da proteína na amostra.

Por meio do uso de um programa computacional, foi realizada a análise multivariada dos resultados obtidos, uma vez que a análise de picos isolados não seria suficiente para determinar diferenças estatisticamente significantes entre os indivíduos esquizofrênicos e o grupo controle. Foram detectados 1600 picos de proteínas, sendo que 173 picos (10,8%) alcançaram uma diferença estatisticamente significante entre esquizofrenia e controle ($p < 0,05$) e 45 picos (2,8%) atingiram uma diferença altamente significante ($p < 0,01$). Estes resultados refletem mudanças na expressão de proteínas que estão relacionadas à presença da esquizofrenia.

A proporção de diferenças significativas na expressão de proteínas obtida por SELDI foi próxima àquela observada nas análises por 2-D PAGE, sendo que de um total de 2045 proteínas detectadas, 215 (10,5%) apresentaram diferenças estatisticamente significantes. Ressalta-se que a faixa de massa molar das proteínas analisadas por SELDI (média de 17 kDa) é diferente daquela das proteínas analisadas por 2-D PAGE (20-110 kDa), o que evidencia a complementaridade destas duas técnicas em estudos proteômicos, mais especificamente, na identificação de potenciais biomarcadores.

Com este trabalho, os autores mostraram a potencialidade da SELDI-TOF MS na avaliação de diferenças na expressão de proteínas em cérebros de indivíduos esquizofrênicos. Novikova *et al.* [7] realizaram um trabalho semelhante, envolvendo o mesmo tipo de amostra (utilizando 17 indivíduos esquizofrênicos e 20 indivíduos do grupo controle) e três tipos de arranjos de proteínas (IMAC30, CM10 e Q10), com a diferença de que estes arranjos foram combinados com análise por MALDI-TOF-PSD MS, que forneceu a identidade de 21 potenciais biomarcadores (proteínas que sofreram redução em suas expressões) da esquizofrenia. Neste último trabalho, os autores também buscaram identificar biomarcadores para o transtorno bipolar. Neste caso, foram utilizadas 20 amostras de indivíduos bipolares e 20 amostras do grupo controle, sendo que sete potenciais biomarcadores (proteínas que apresentaram aumento em suas expressões) foram identificados.

## 2.2.2. MALDI-TOF MS/MS

A primeira etapa da MALDI consiste em dissolver os peptídeos de uma determinada amostra em uma solução de um composto absorvedor de radiação UV, chamado matriz, e aplicá-los em uma placa. Conforme o solvente desta mistura seca, a matriz cristaliza e as moléculas dos peptídeos são incluídas dentro dos cristais da mesma, por co-cristalização. A matriz deve estar em excesso em relação à amostra, de modo que quando o laser atinge o *spot* matriz/amostra, a energia é absorvida primeiramente pela matriz. Esta energia é transferida da matriz para a amostra de uma maneira suave, de modo que o processo de ionização não ocasiona a fragmentação dos peptídeos. O efeito da energia do laser é produzir uma pluma da matriz, que carrega os íons do analito para uma fase gasosa [3,8]. O mecanismo da MALDI não é bem definido, porém, o efeito geral do processo é produzir íons de peptídeos intactos, sem fragmentação [3].

Estes íons são posteriormente separados por TOF, onde são acelerados a uma alta energia cinética e separados ao longo de um tubo de tamanho específico. Os íons mais leves, ou seja, com menores relações *m/z*, passam mais

rapidamente pelo tubo do que os íons mais pesados (com maiores relações *m/z*) e, a partir deste princípio, o tempo de passagem pelo tubo até atingir o detector é utilizado para determinar a relação *m/z* dos íons. A alta resolução e exatidão na medida de massa são suas principais características [1,2].

Na abordagem proteômica clássica, a MALDI-TOF MS é empregada na obtenção da "impressão digital" das massas de peptídeos (PMF) provenientes de proteínas intactas separadas previamente por eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2-D PAGE). Nesta estratégia de análise, as proteínas são identificadas pela correlação entre uma lista de massas de peptídeos obtida experimentalmente com uma lista de todas as massas de peptídeos calculadas, disponível em bancos de dados [1].

Outra estratégia de análise consiste na espectrometria de massas em seqüência (MS/MS), que envolve múltiplos estágios de seleção de íons por espectrometria de massas, sendo que algum tipo de fragmentação ocorre entre estes estágios. Os íons estáveis selecionados, formados no processo de ionização, passam por reações de fragmentação, de modo que os produtos iônicos destas reações são analisados em um segundo estágio da análise por espectrometria de massas. A fragmentação dos íons de interesse é comumente realizada por dissociação induzida por colisão (CID), onde a dissociação ocorre devido à indução de colisões entre os íons e um gás neutro na célula de colisão do espectrômetro de massas [3,8]. Outros métodos de fragmentação dos íons incluem a dissociação induzida por superfície e a dissociação por captura de elétrons. Uma representação esquemática da espectrometria de massas em seqüência é mostrada na Figura 2.1.

A expressão da seqüência de peptídeos obtida por MS/MS é utilizada para identificar um determinado peptídeo em um banco de dados de proteínas. Uma notação foi desenvolvida para indicar os fragmentos dos peptídeos resultantes em um espectro de massas MS/MS, conforme mostrado na Figura 2.2. Os íons fragmentos de peptídeos são indicados por *a*, *b* ou *c*, se a carga é retida no N-terminal, e por *x*, *y* ou *z*, se a carga é mantida no C-terminal. O subscrito indica o número de resíduos de aminoácidos no fragmento. Os sobrescritos são utilizados

ocasionalmente para indicar perdas neutras em adição à fragmentação do esqueleto da molécula, sendo * usado para indicar a perda de amônia e ° para indicar perda de água [3].

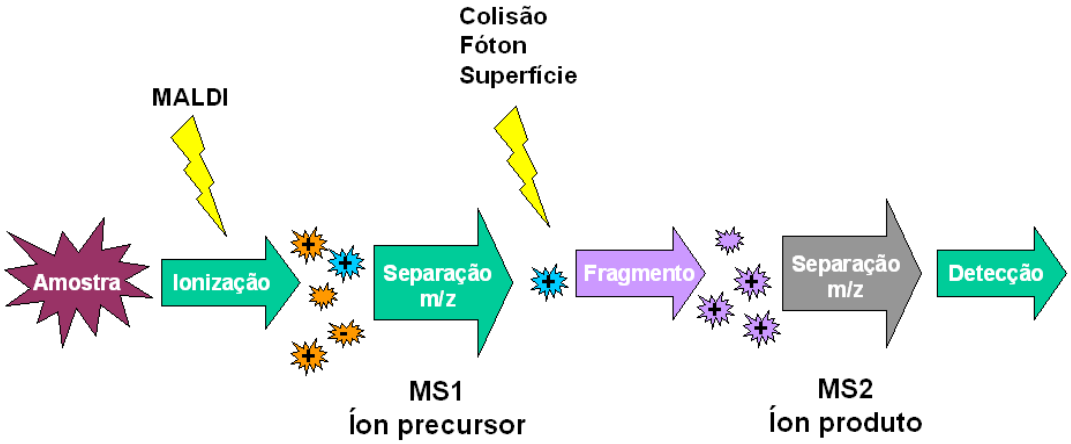



**Figura 2.1.** Representação esquemática da espectrometria de massas em seqüência.

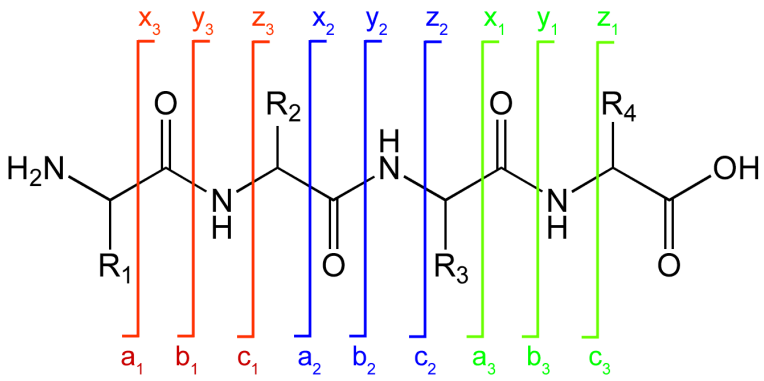



**Figura 2.2.** Notação utilizada para a fragmentação de peptídeos por MS/MS.

Neste trabalho de Tese, a MALDI-TOF MS/MS foi empregada para caracterizar as proteínas diferencialmente expressas, separadas anteriormente por eletroforese bidimensional em gel. A seguir, são discutidos alguns aspectos sobre o preparo das amostras de soro sangüíneo realizado previamente à etapa de separação das proteínas.

## 2.2. Preparo de amostras de soro sangüíneo prévio à análise de proteínas por eletroforese em gel

O preparo de amostras é uma etapa imprescindível para a obtenção de géis de eletroforese bidimensional com alta resolução. No caso das amostras de soro sangüíneo humano, a remoção das proteínas majoritárias (principalmente albumina e imunoglobulina) é essencial para evitar interferências na resolução do gel, possibilitando, assim, a detecção de proteínas menos abundantes, que podem indicar alterações no proteoma e serem potenciais biomarcadores [9]. As principais estratégias e técnicas encontradas na literatura, utilizadas na remoção das proteínas majoritárias de soro sangüíneo, estão descritas no Quadro 2.1.

**Quadro 2.1.** Estratégias utilizadas para a depleção de proteínas altamente abundantes [10]

| Estratégia | Vantagens | Limitações |
|---|---|---|
| Ultrafiltração centrífuga | Rápida, fácil operação e custo baixo | Perda potencial de componentes ligadas a proteínas de alta massa molar |
| Colunas de extração em fase sólida | Alta seletividade, reprodutibilidade e sensibilidade | Alto custo e baixa capacidade de amostra |
| Extração com solvente orgânico | Rápida e de fácil operação | Diluição da amostra |

A imunodepleção (também chamada de cromatografia por imunoafinidade) consiste no uso de anticorpos imobilizados em colunas cromatográficas, que removem proteínas específicas de uma amostra e é um dos métodos mais empregados na remoção de proteínas altamente abundantes em soro ou plasma sangüíneo [11]. Estas colunas possuem a capacidade de remover 17, 7 ou 6 das proteínas mais abundantes da amostra. Neste trabalho de Tese, a coluna utilizada

foi aquela que possibilita a remoção das proteínas albumina, imunoglobulina G, imunoglobulina A, transferrina, haptoglobina e antitripsina das amostras de soro.

Recentemente, a tecnologia *ProteoMiner* foi desenvolvida com o intuito de reduzir a faixa dinâmica das proteínas presentes nas amostras de soro sangüíneo. Ela consiste no tratamento da amostra com uma combinação de hexapeptídeos imobilizados em suportes cromatográficos, que é capaz de capturar proteínas pouco abundantes e remover o excesso das mais abundantes [12]. Após este tratamento, a amostra contém as mesmas proteínas presentes inicialmente, porém, com proporções diferentes. A Figura 2.3 ilustra o mecanismo desta metodologia.

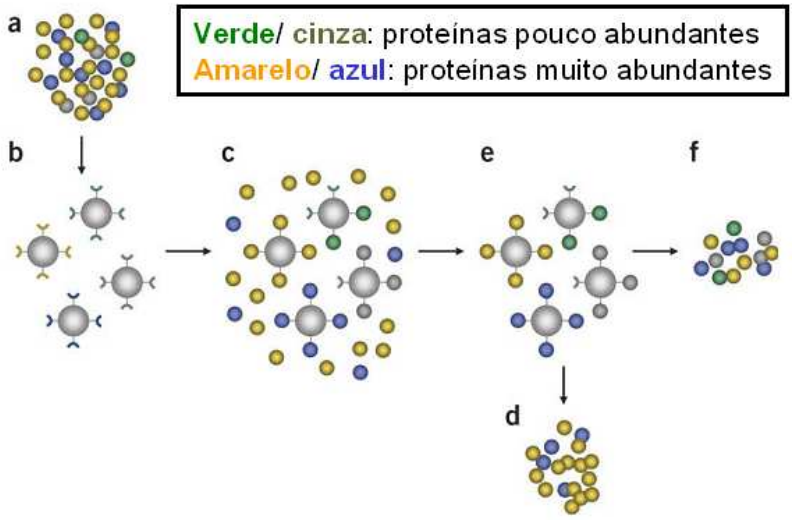



**Figura 2.3.** Mecanismo da tecnologia *ProteoMiner*: A amostra **(a)** é tratada com uma combinação de hexapeptídeos ligada a suportes cromatográficos **(b)**. Cada hexapeptídeo liga-se a uma única seqüência protéica **(c)**, sendo que as proteínas muito abundantes saturam seus ligantes e o excesso é removido **(d)**. As proteínas são concentradas em seus ligantes específicos **(e)** e, então, dessorvidas e coletadas **(f)**. Esquema adaptado de [13].

As estratégias de preparo de amostras de soro, imunodepleção e a tecnologia *ProteoMiner*, foram utilizadas para preparar as amostras de soro previamente às análises por 2-D DIGE, que será enfocada no tópico seguinte.

## 2.3. Eletroforese diferencial em gel bidimensional (2-D DIGE)

A 2-D DIGE foi desenvolvida em 1997, entretanto, a sua aplicação em proteômica ganhou destaque somente a partir de 2005. O recente desenvolvimento do uso de corantes fluorescentes na técnica 2-D DIGE superou a limitação da 2-D PAGE na detecção de proteínas pouco abundantes, tornando possível uma alta sensibilidade, bem como a realização de comparações quantitativas exatas entre amostras resolvidas no mesmo gel, o que minimiza os problemas de reprodutibilidade [14].

Na técnica 2-D DIGE, misturas de proteínas são marcadas com corantes fluorescentes (Cy2, Cy3 e Cy5) e a análise quantitativa de proteínas é realizada pela excitação dos diferentes corantes em comprimentos de onda específicos e a intensidade de fluorescência pode ser comparada, permitindo a quantificação de cada proteína presente no gel. Os corantes fluorescentes sofrem reação de substituição nucleofílica com o grupo ε-amino dos resíduos de lisina para formar uma amida. Os corantes são positivamente carregados para compensar a carga da lisina, que é perdida durante a reação de marcação [14,15].

A quantificação das proteínas é realizada por meio do uso de um padrão interno, que é marcado por um corante (em geral, o Cy2) e aplicado ao gel de eletroforese, juntamente com duas amostras a serem analisadas (marcadas com Cy3 e Cy5). O padrão interno consiste em uma mistura de quantidades iguais de proteínas das duas amostras e, portanto, ele contém todas as proteínas que estão presentes em cada uma das amostras usadas no experimento [14]. Assim sendo, cada proteína possui um sinal único no padrão interno, que é utilizado para a comparação quantitativa direta dentro de cada gel e para normalizar os valores de abundância para cada proteína ao comparar géis diferentes.

Recentemente, Wu *et al.* [16] utilizaram a 2-D DIGE para detectar biomarcadores de alcoolismo em soro sangüíneo. A hipótese inicial para este trabalho se baseou no fato de que os biomarcadores de alcoolismo mais amplamente utilizados (γ-glutamiltransferase e transferrina deficiente em

carboidrato) não são satisfatórios em termos de sensibilidade/especificidade para a doença, justificando a busca por novos biomarcadores.

Para isso, foram utilizadas amostras de soro de 12 pacientes, coletadas antes e após um período de abstinência de 90 dias. Foi realizada a remoção de albumina e imunoglobulinas (que são as proteínas mais abundantes em soro) das amostras, de modo a melhorar a detecção de proteínas menos abundantes. Após esta etapa, as proteínas das amostras coletadas antes da abstinência foram marcadas com o corante Cy5, as proteínas das amostras coletadas após o período de abstinência foram marcadas com o corante Cy3 e o padrão interno foi marcado com o corante Cy2. Como os autores visavam a detecção de biomarcadores de alta massa molar, uma vez que aqueles de baixa massa molar já haviam sido detectados em um trabalho anterior, com o uso de SELDI-TOF MS, foi utilizado um gel de agarose para a separação das proteínas na primeira dimensão e, a seguir, foi realizada a separação das proteínas na segunda dimensão por SDS-PAGE.

A análise das imagens dos géis obtidos foi realizada e, com base nos valores de intensidade de fluorescência, foi observado que seis proteínas apresentaram uma menor abundância e duas apresentaram uma maior abundância após o período de abstinência (considerando diferenças estatisticamente significantes entre amostras coletadas antes e após o período de abstinência, $p < 0,05$), indicando que estas proteínas são candidatas em potencial para serem biomarcadores do alcoolismo.

# 3. PARTE EXPERIMENTAL

## 3.1. Equipamentos e acessórios

Os equipamentos utilizados nos experimentos descritos neste Capítulo são listados a seguir. Os mesmos se encontram no Grupo de Proteômica do Instituto Max Planck de Medicina Experimental (Göttingen, Alemanha), com exceção do

espectrômetro de massas para leitura dos *chips* de proteínas, que se encontra no Hospital da Universidade de Göttingen (Alemanha).

- Agitador orbital (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha)
- Espectrômetro de massas, modelo Ultraflex I (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha)
- Espectrômetro de massas, modelo PBS II ProteinChip Reader (Ciphergen Biosystems, Fremont, EUA)
- Estação de trabalho para manipulação de líquidos, modelo Gênesis ProTeam 150 (Tecan, Männedorf, Suíça)
- Fonte de corrente contínua, modelo EPS1001 (GE Healthcare, Uppsala, Suécia)
- *Scanner*, modelo Typhoon 9400 (GE Healthcare, Piscataway, EUA)
- Sistema cromatográfico *Multiple Affinity Removal System* (Agilent, Palo Alto, EUA)
- Sistema de purificação Milli-Q (Millipore, Molsheim, França)
- Sistema para eletroforese bidimensional, modelo Protean II xi (Bio-Rad, Hercules, EUA)
- Ultracentrífuga (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha)
- Vidrarias de uso rotineiro em laboratório

## 3.2. Reagentes e soluções

Todas as soluções foram preparadas utilizando-se água desionizada (≥ 18,2 MΩ cm), obtida por um sistema de purificação Milli-Q, e reagentes de grau analítico.

A seguir, é apresentada a lista dos reagentes utilizados nos experimentos descritos no presente Capítulo:

- Acetonitrila, $C_2H_3N$, M = 41,05 g $mol^{-1}$ (Merck, Darmstadt, Alemanha)

- Ácido acético glacial, $C_2H_4O_2$, M = 60,05 g $mol^{-1}$ (J.T. Baker, Phillipsburg, EUA)
- Ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico, $C_{10}H_7NO_3$, M = 189,17 g $mol^{-1}$ (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA)
- Ácido clorídrico, HCl, M = 36,46 g $mol^{-1}$ (J.T. Baker, Phillipsburg, EUA)
- Ácido fosfórico 85%, $H_3PO_4$, M = 98,00 g $mol^{-1}$ (Merck, Darmstadt, Alemanha)
- Ácido trifluoroacético, $C_2HF_3O_2$, M = 114,03 g $mol^{-1}$ (Merck, Darmstadt, Alemanha)
- Ácido sinapínico, $C_{11}H_{12}O_5$, M = 224,21 g $mol^{-1}$ (Merck, Darmstadt, Alemanha)
- Acrilamida, $C_3H_5NO$, M = 71,08 g $mol^{-1}$ (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia)
- Agarose grau biologia molecular (Merck, Darmstadt, Alemanha)
- Albumina de soro bovino (Merck, Darmstadt, Alemanha)
- Anfólitos de pH 3 a 10 (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia)
- Anfólitos de pH 4 a 7 (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia)
- Azida de sódio, $NaN_3$, M = 65,01 g $mol^{-1}$(Merck, Darmstadt, Alemanha)
- Azul de bromofenol, $C_{19}H_9Br_4NaO_5S$, M = 691,94 g $mol^{-1}$ (Merck, Darmstadt, Alemanha)
- Azul de Coomassie G-250, $C_{47}H_{50}N_3NaO_7S_2$, M = 854,03 g $mol^{-1}$ (J.T. Baker, Phillipsburg, EUA)
- Corantes fluorescentes CyDye™ DIGE Fluors (GE Healthcare, Uppsala, Suécia)
- Clorofórmio, $CHCl_3$, M = 119,38 g $mol^{-1}$ (Merck, Darmstadt, Alemanha)
- Ditiotreitol, $C_4H_{10}O_2S_2$, M = 154,24 g $mol^{-1}$ (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia)
- Dodecil sulfato de sódio, $C_{12}H_{25}NaO_4S$, MM = 288,28 g $mol^{-1}$ (Bio-Rad, Hercules, EUA)
- Etanol, $C_2H_6O$, M = 46,07 g $mol^{-1}$ (J.T. Baker, Phillipsburg, EUA)

- Glicerol 87%, $C_3H_8O_3$, M = 92,09 g $mol^{-1}$ (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia)
- Glicina, $C_2H_5O_2N$, M = 75,07 g $mol^{-1}$ (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia)
- Iodoacetamida, $C_2H_4INO$, M = 184,96 g $mol^{-1}$ (Amersham, Biosciences, Uppsala, Suécia)
- *Kit* para preparo de amostras de soro *ProteoMiner* (Bio-Rad, Hercules, EUA)
- *Kit* para quantificação de apolipoproteína A-I *Tina-quant ver.2* (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanha)
- *Kit* para quantificação de proteínas totais *2-D Quant Kit* (GE Healthcare, Uppsala, Suécia)
- Lisina, $C_6H_{14}N_2O_2$, M = 146,19 g $mol^{-1}$ (Sigma, St. Louis, EUA)
- Marcador de massa molar *SeeBlue®Plus2* (Invitrogen, San Diego, EUA)
- Metanol, $CH_4O$, M = 32,04 g $mol^{-1}$ (J.T. Baker, Phillipsburg, EUA)
- *N, N*-dimetilformamida, $C_3H_7NO$, M = 73,09 g $mol^{-1}$ (Fluka, Buch, Suíça)
- *N, N'*-metilenobisacrilamida, $C_7H_{10}N_2O_2$, M = 154,17 g $mol^{-1}$ (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia)
- *N,N',N,N'*-tetrametiletilenodiamina, $C_6H_{16}N_2$, M = 116,20 g $mol^{-1}$ (J.T. Baker, Phillipsburg, EUA)
- Óleo mineral (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia)
- Padrão protéico de massa molar (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia)
- Sulfato de amônio, $H_8N_2O_4S$, M = 132,14 g $mol^{-1}$ (Merck, Darmstadt, Alemanha)
- Sulfonato de 3-[3-cloroamidopropil-dimetilamônio]-1-propano, $C_{32}H_{58}N_2O_7S$, M = 614,88 g $mol^{-1}$ (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia)
- Tiouréia, $CH_4N_2S$, M = 76,12 g $mol^{-1}$ (Fluka, Buchs, Suíça)
- Tris-hidroximetil amino metano, $C_4H_{11}O_3N$, M = 121,14 g $mol^{-1}$ (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia)
- Uréia, $CH_4N_2O$, M = 60,06 g $mol^{-1}$ (Fluka, Buch, Suíça)

## 3.3. Análise do perfil protéico por SELDI-TOF MS

As amostras de soro foram analisadas por SELDI-TOF MS em *chips* de interação hidrofóbica em fase reversa (H50). Os *chips* foram pré-lavados duas vezes com 50 µL de ACN 50% (v/v) por 5 min, e, então, equilibrados duas vezes com 150 µL de solução ligante (composta de 10% (v/v) ACN e 0,1% (v/v) TFA) por 5 min, com agitação a 250 rpm. As amostras de soro foram diluídas 200 vezes com a solução ligante, e, então, 100 µL de cada amostra foram aplicados aos arranjos cromatográficos em duplicata, utilizando um bioprocessador. As amostras foram incubadas em um agitador orbital por 90 min. As amostras foram removidas e os *chips* foram lavados duas vezes por 5 min com solução ligante, seguida por uma lavagem final com água ultrapura para remover substâncias interferentes, tais como sais.

Após secagem a temperatura ambiente, adicionou-se 1 µL de solução saturada contendo ácido sinapínico em 50% (v/v) de ACN e 0,1% (v/v) de TFA a cada *spot*, por duas vezes, e as massas das proteínas/peptídeos foram determinadas utilizando o espectrômetro de massas PBS II ProteinChip Reader, empregando um protocolo de coleta de dados automático. A intensidade do laser foi definida como 200 U e a sensibilidade do detector a 8.

Os espectros obtidos foram normalizados e analisados com o programa ProteinChip versão 3.0 (Ciphergen Biosystems). A calibração externa foi realizada e a reprodutibilidade foi avaliada com o uso de duas amostras de soro representativas. As intensidades dos picos foram normalizadas à corrente de íons total de *m/z* entre 2000 e 50000 e os picos de massas com proporções sinal/ruído acima de 5 foram auto-detectados.

Os perfis protéicos obtidos foram normalizados com relação ao grupo controle e as diferenças nas intensidades dos picos foram quantificadas usando o teste U Mann-Whitney não paramétrico, implementado no programa Biomarker Wizard (Ciphergen Biosystems).

## 3.4. Preparo de amostras de soro sangüíneo para análise por 2-D DIGE

Para as análises por 2-D DIGE realizadas na faixa de pH entre 4 e 7, o *kit* de preparo de amostras *ProteoMiner* foi utilizado de acordo com as instruções do fabricante. A coluna contendo a combinação de hexapeptídeos foi lavada duas vezes com água por 5 min, duas vezes com tampão de lavagem por 5 min e, então, 1000 µL de amostra de soro foram aplicados à coluna e incubados por 2 h. A coluna foi lavada três vezes com tampão de lavagem por 5 min e, após a remoção dos tampões, 100 µL de reagente de eluição reidratado (contendo uréia, CHAPS e ácido acético) foram adicionados e incubados três vezes por 15 min. Os eluatos foram coletados e a remoção dos lipídeos foi realizada com a precipitação Wessel e Flügge [17]. Antes desta precipitação, a 100 µL do eluato, foram adicionados 20 µL de Tris a 1 mol $L^{-1}$, de modo a ajustar o pH a 7. Então, 480 µL de metanol foram adicionados à amostra e misturados, 240 µL de clorofórmio foram adicionados e misturados, e 360 µL de água ultrapura foram também adicionados e misturados. A amostra foi centrifugada por 1 min a 9000*g* e o sobrenadante foi descartado. Foram adicionados e misturados 360 µL de metanol, a amostra foi centrifugada por 5 min a 16100*g*, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi seco com $N_2$.

Após essa etapa, o precipitado foi dissolvido em 40 µL de tampão de lise contendo 7 mol $L^{-1}$ de uréia, 2 mol $L^{-1}$ de tiouréia, 4% (m/v) de CHAPS e 20 mmol $L^{-1}$ de Tris (pH 8,8). A solução resultante foi ultrassonicada por 3 min, congelada a -80 ℃ por 15 min, e descongelada por 15 min a temp eratura ambiente. Então, ela foi ultrassonicada novamente por mais 3 min, deixada por 25 min a temperatura ambiente, e ultrassonicada por 2 min. A solução protéica foi centrifugada por 2 min a 10000*g*, ultrassonicada por 2 min, e, finalmente, centrifugada por 1 min a 1000*g*, de modo a remover qualquer resíduo sólido que ainda permanecesse na amostra.

Para as análises por 2-D DIGE realizadas na faixa de pH entre 3 e 11, a amostra passou por imunodepleção em um sistema cromatográfico (*Multiple Affinity Removal System*), efetuada de acordo com as instruções do fabricante.

Este sistema remove as proteínas albumina, imunoglobulina G, imunoglobulina A, transferrina, haptoglobina e antitripsina, que são muito abundantes em soro. A seguir, a precipitação Wessel e Flügge [17] foi feita conforme descrito anteriormente.

## 3.5. Separação e análise de proteínas por 2-D DIGE

Antes das análises por 2-D DIGE, a quantificação das proteínas totais foi realizada com o uso *do 2-D Quant Kit*, de acordo com as instruções do fabricante. Então, um volume correspondente a 50 µg (ou 300 µg, no caso das análises em faixa de pH entre 3 e 11) de proteínas de cada amostra e 50 µg (300 µg) do padrão interno, composto por 25 µg (150 µg) de cada amostra foram marcados com os corantes CyDye$^{TM}$ DIGE Fluors. A reconstituição dos corantes foi realizada seguindo as instruções do fabricante. Os corantes (Cy2, Cy3 e Cy5) foram então adicionados aos lisados de proteínas, de modo que cada 50 µg de proteínas fossem marcados com 400 pmol do corante. A reação foi realizada a 4 ºC por 30 min no escuro. Foi adicionado 1 µL de lisina a 10 mmol $L^{-1}$ por 50 µg de proteína para parar a reação e foi feita uma incubação a 4 ºC por 10 min no escuro. As amostras (padrão interno marcado com Cy2 e duas amostras marcadas com Cy3 e Cy5) foram misturadas, um volume equivalente de tampão de amostra (7 mol $L^{-1}$ uréia, 2 mol $L^{-1}$ tiouréia, 4% (m/v) CHAPS, 40 mmol $L^{-1}$ DTT e 1% (v/v) anfólitos pH 4-7 ou 3-11) foi adicionado e a mistura foi incubada por 60 min no escuro. A seguir, o volume foi completado a 350 µL com tampão de reidratação (7 mol $L^{-1}$ uréia, 2 mol $L^{-1}$ tiouréia, 4% (m/v) CHAPS, 0,3% (m/v) DTT e 0,5% (v/v) anfólitos pH 4-7 ou 3-11) e a solução foi centrifugada por 1 min a 10000*g*. Devido à capacidade de resolução espectral da fluorescência dos corantes, duas amostras podem ser separadas no mesmo gel juntamente com o padrão interno, preparado a partir de quantidades iguais de cada amostra e marcado com um terceiro corante. De modo a excluir diferenças de reatividade dos corantes, uma replicata foi realizada para cada experimento, com uma troca dos corantes para as diferentes amostras.

A primeira dimensão do processo eletroforético (IEF) foi executada em uma fita de 18 cm, sendo que esta fita continha um gel de poliacrilamida onde o gradiente de pH foi formado pela presença de anfólitos. Para a focalização isoelétrica, 340 µL da amostra ressolubilizada foram aplicados em um aparato sobre o qual a fita foi colocada em contato. Foram adicionados cerca de 900 µL de óleo mineral sobre a fita e esta foi levada ao sistema focalizador. A reidratação ocorreu à temperatura ambiente por 12 h a 50 V. Após este período, o programa contendo seis etapas foi aplicado: (1) 300 V por 1h, (2) 1000 V por 1 h, (3) 1000-3000 V por 0,5 h, (4) 3000 V por 3 h, (5) 3000-8000 V por 0,5 h e (6) 8000 V por 4 h. A corrente máxima aplicada por fita foi de 50 µA.

Ao término da focalização, a fita foi equilibrada em duas etapas. Na primeira delas, foi usada uma solução contendo uréia 6 mol $L^{-1}$, SDS 2% (m/v), glicerol 30% (v/v), Tris-HCl 50 mmol $L^{-1}$ (pH 8,8), azul de bromofenol 0,002% (m/v) e DTT 1% (m/v). Esta etapa é denominada redução e sua finalidade é manter as proteínas em suas formas reduzidas [18]. Na segunda etapa, foi empregada uma solução de composição similar, porém, neste caso, o DTT foi substituído por iodoacetamida 4% (m/v). Esta etapa é denominada alquilação e sua finalidade é alquilar os grupos tióis das proteínas, prevenindo que as mesmas sejam reoxidadas durante a segunda dimensão do processo eletroforético [18]. A primeira etapa foi realizada em duplicata por 5 min e a segunda etapa por 10 min, sendo que ambas foram feitas sob agitação.

Após o equilíbrio da fita, foi realizada a segunda dimensão do processo eletroforético (SDS-PAGE). Para isso, a fita foi aplicada em um gel gradiente de poliacrilamida 8-16% (m/v), previamente preparado em placa de vidro. Foi colocado sobre o gel, ao lado da fita, um pedaço de papel de filtro contendo 7,5 µL do marcador de massa molar *SeeBlue®Plus2* e, por fim, a fita e o papel de filtro foram vedados com uma solução quente de agarose a 1% (m/v) dissolvida em tampão de corrida (25 mmol $L^{-1}$ Tris, 192 mmol $L^{-1}$ glicina e 0,1% (m/v) SDS), de modo a garantir o contato destes com o gel de poliacrilamida. A corrida eletroforética foi conduzida a 6,5 mA por gel, com voltagem máxima fixa em 200 V e a duração foi de aproximadamente 16 h.

As imagens dos géis foram obtidas por um *scanner* específico para detectar a fluorescência das amostras e padrão interno, e a análise foi realizada com o programa Proteomweaver versão 3.0 (Bio-Rad), que permitiu a análise das imagens, detecção dos *spots*, sobreposição das imagens dos géis e normalização (relativa ao padrão interno) anterior à quantificação.

Após esta análise, as proteínas foram reveladas empregando-se o corante Coomassie coloidal [19], que consiste em uma solução de sulfato de amônio 8% (m/v), ácido fosfórico 1,6% (v/v), CBB G-250 0,08% (m/v) e metanol 25% (v/v). Antes de ser adicionado o corante, as proteínas foram fixadas, durante 1 h, empregando-se uma solução contendo ácido acético 10% (v/v) e etanol 40% (v/v). O corante ficou em contato com o gel durante 48 h e depois foi removido por lavagens com água desionizada.

## 3.6. Digestão tríptica e caracterização de proteínas por MALDI-TOF MS/MS

Primeiramente, os *spots* de proteínas a serem identificados foram retirados manualmente do gel de poliacrilamida e cada um deles foi adicionado a uma placa, na qual foi realizada a digestão tríptica. Uma plataforma automatizada para a identificação de proteínas separadas em gel [20] foi utilizada para reduzir, alquilar e digerir as proteínas com tripsina, bem como preparar os peptídeos proteolíticos para a análise por espectrometría de massas. Para cada amostra, foram adquiridos espectros de PMF e de fragmentos de íons (MS/MS).

Para a obtenção dos espectros de PMF, os íons positivamente carregados na faixa de *m/z* entre 500 e 4000 foram analisados automaticamente no modo refletor. Foram adquiridos 600 espectros por amostra, a partir de pelo menos seis posições diferentes no *spot*, utilizando o programa de operação FlexControl 2.4 (Bruker Daltonics). A anotação automática de sinais de peptídeos monoisotópicos na faixa de *m/z* entre 800 e 4000 foi realizada utilizando-se o algoritmo SNAP, implementado no programa de pós-processamento FlexAnalysis 2.4 (Bruker

Daltonics). Aqui, os sinais de fundo correspondentes aos peptídeos provenientes da autólise da tripsina foram removidos da lista de picos, com base em uma lista de massas de referência. Assim, os mesmos foram excluídos da busca no banco de dados e de serem selecionados como íons precursores na análise por MS/MS. Os espectros de PMF foram calibrados externamente a partir da análise de calibrantes localizados em posições vizinhas às amostras, cujos espectros foram automaticamente obtidos e processados conforme descrito anteriormente.

Os espectros de fragmentos de íons foram adquiridos da mesma maneira que os espectros de PMF e dos calibrantes, com o espectrômetro operando no modo MS/MS. A seleção de íons precursores para a obtenção de espectros de fragmentos de íons foi realizada pelo programa BioTools 3.0 (Bruker Daltonics). Por amostra, um total de 600 espectros de diferentes íons precursores, selecionados a partir de cada espectro de PMF, foram obtidos e processados automaticamente usando o algoritmo SNAP.

As buscas no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/), com restrição à taxonomia *Homo sapiens*, foram realizadas com o uso do programa MASCOT 2.2 (Matrix Science, Londres, Inglaterra). A carboxiamidometilação dos resíduos de cisteína foi especificada como fixa, bem como a oxidação de metioninas como modificação variável. A tolerância de massa monoisotópica foi ajustada a 100 ppm e uma clivagem tríptica perdida foi permitida. As buscas no banco de dados dos resultados obtidos por MS/MS foram realizadas da mesma maneira, com uma tolerância de massa de fragmento ajustada a 0,7 Da. A identificação de uma proteína foi considerada como bem sucedida se, pelo menos, uma seqüência peptídica foi determinada acima do *threshold* em coincidência com ao menos 20% da cobertura da seqüência obtida por PMF.

## 3.7. Quantificação de apolipoproteína A-I por imunoturbidimetria

A quantificação da apolipoproteína A-I foi realizada com o uso do *kit Tina-quant ver.2*, de acordo com as instruções do fabricante. Neste método, a

apolipoproteína A-I humana liga-se especificamente a um anticorpo precipitante (anti-apolipoproteína A-I de ovelha, diluída em tampão fosfato e estabilizada com azida de sódio a 0,09% (m/v)) e a turbidimetria é medida em comprimento de onda de 340 nm. O aumento na absorbância é proporcional à concentração da apolipoproteína A-I.

# 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

## 4.1. Análise do perfil protéico por SELDI-TOF MS

Para a comparação do perfil protéico entre os grupos controle e de pacientes bipolares tratados com lítio ou outras drogas exceto o lítio por SELDI-TOF MS, o número de amostras do grupo controle foi reduzido, de modo que as médias de idades entre os grupos não diferiam entre si com significância estatística de 95%, de acordo com o teste de Tukey [21]. As características deste novo grupo controle foram n = 15, média de idade de 31 $\pm$ 5 anos, distribuição por gênero de 9 mulheres e 6 homens, todos não fumantes. Nesta análise, as amostras de soro foram aplicadas diretamente e individualmente aos *chips* de proteínas com interações hidrofóbicas (H50), ou seja, sem prévio preparo de amostra ou agrupamento das mesmas.

A Tabela 2.1 mostra os oito picos de proteínas que foram identificados como sendo diferencialmente expressos com significância estatística ($p \leq 0,001$) entre os indivíduos do grupo controle e os pacientes bipolares sob tratamento com lítio e aqueles não tratados com lítio.

A faixa de massa molar dos picos de proteínas diferenciais detectados foi entre 3,4 e 28 kDa. A Figura 2.4 mostra os histogramas com a análise estatística realizada, ilustrando a distribuição dos níveis dos picos de proteínas de (a) 14 e (b) 28 kDa obtidos para cada grupo estudado, após a análise por SELDI-TOF MS. A Figura 2.4 (c) mostra a visão, em gel, de nove espectros representativos obtidos por SELDI-TOF MS para a proteína de 28 kDa.

**Tabela 2.1.** Picos de proteínas diferenciais detectados por análise via SELDI-TOF MS

| Pico (m/z) | Valor de p |
|---|---|
| 3384 | 0,0000006176 |
| 5088 | 0,0000095396 |
| 6828 | 0,0000022462 |
| 9697 | 0,0002215058 |
| 14029 | 0,0000551512 |
| 14115 | 0,0004132083 |
| 14769 | 0,0000017479 |
| 28104 | 0,0000105375 |

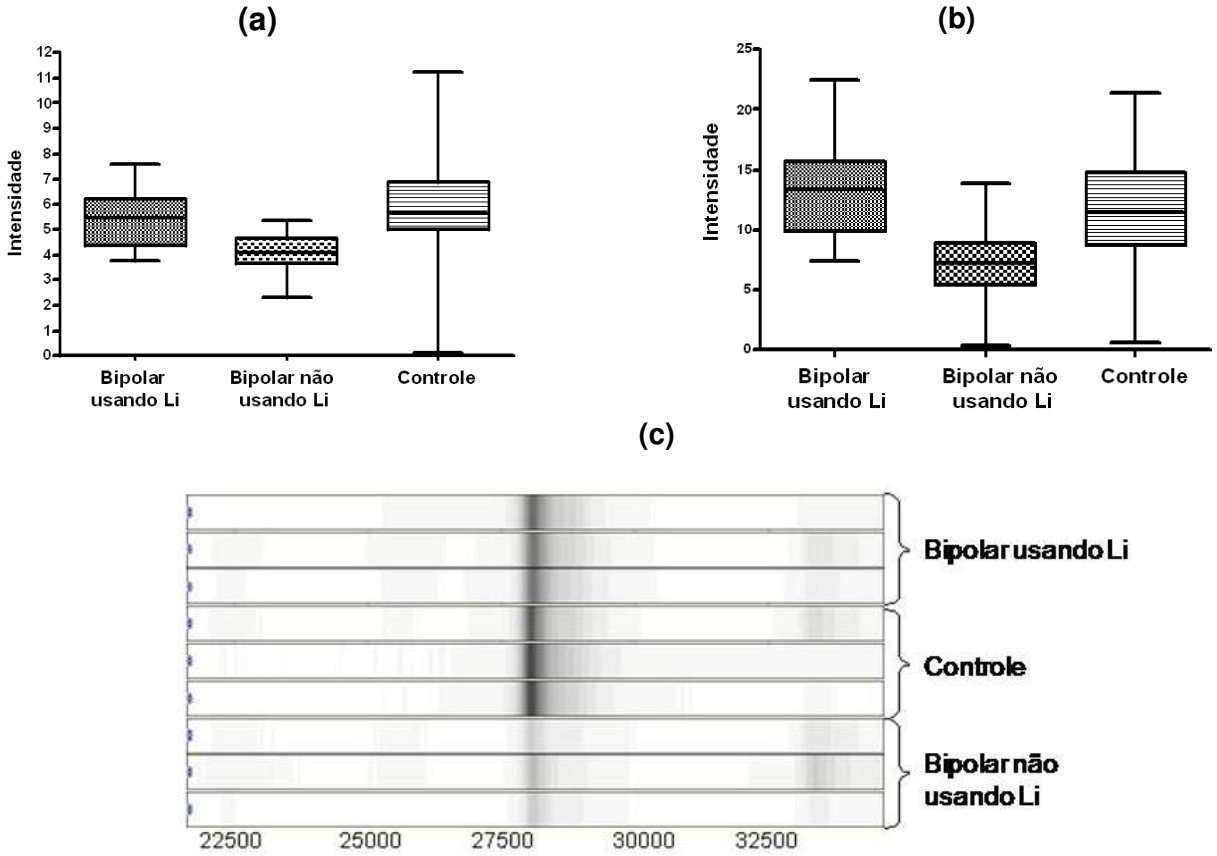



**Figura 2.4.** Análise estatística para os picos de proteínas diferenciais detectados: **(a)** 14 e **(b)** 28 kDa. **(c)** Visão, em gel, de nove espectros representativos dos três grupos estudados, obtidos por SELDI-TOF MS, para a proteína de 28 kDa. Os três primeiros espectros são de pacientes bipolares tratados com lítio, os três seguintes são de indivíduos controle e os três últimos são de pacientes bipolares não tratados com lítio.

Conforme os resultados observados na Figura 2.4 (a) e (b), ao comparar a distribuição dos níveis das proteínas de 14 e 28 kDa entre os grupos estudados, o grupo de pacientes bipolares não tratados com lítio apresentou um menor nível em relação ao grupo controle e ao grupo de pacientes bipolares tratados com lítio. Após o tratamento com lítio, os níveis destas proteínas foram aumentados em pacientes bipolares a, aproximadamente, aqueles do grupo controle. Nesta comparação, foram consideradas somente as medianas (valor até o qual se encontram 50% dos valores) e os quartis inferiores (valor a partir do qual se encontram 25% dos valores mais baixos) e superiores (valor a partir do qual se encontram 25% dos valores mais elevados) dos níveis das proteínas, representados pelas "caixas" mostradas nos histogramas. As barras acima e abaixo destas "caixas" referem-se aos maiores e aos menores níveis encontrados dentro dos grupos de amostras, respectivamente.

Na Figura 2.4 (c), pode ser visualizado o comportamento da proteína de 28 kDa descrito pela análise estatística, ou seja, a redução no nível desta proteína em pacientes bipolares não tratados com lítio e a elevação ao nível próximo do grupo controle em pacientes bipolares tratados com o lítio. A identificação das proteínas de 14 e 28 kDa é descrita no próximo item.

## 4.2. Separação e identificação de proteínas diferenciais por 2-D DIGE e MALDI-TOF MS/MS

A técnica 2-D DIGE, associada à MALDI-TOF MS/MS, foi utilizada para visualizar a expressão dos perfis protéicos em amostras agrupadas de soro sangüíneo de pacientes bipolares, sendo n = 15 para pacientes sob tratamento com lítio e n = 10 para pacientes bipolares sob tratamento com outras drogas excluindo o lítio.

A Figura 2.5 mostra uma imagem típica do gel de eletroforese bidimensional do proteoma de soro sangüíneo. Em vermelho, estão marcados os *spots* correspondentes às proteínas sobre-expressas (com fator de regulação ≥ 1,50) na

presença do lítio e, em azul, estão mostrados os *spots* correspondentes às proteínas sub-expressas (com fator de regulação ≤ 0,67) na presença do lítio, conforme determinado pelo programa de análise de imagens Proteomweaver e considerando diferenças estatisticamente significantes na expressão ($p \leq 0,01$, de acordo com o teste *t* de Student).

De acordo com estes critérios, 34 *spots* de proteínas foram selecionados, retirados do gel, digeridos com tripsina e analisados por MALDI-TOF MS e MS/MS. A partir da busca em banco de dados de seqüências primárias, 13 proteínas puderam ser identificadas. A Tabela 2.2 mostra os resultados para a identificação das proteínas sobre-expressas e a Tabela 2.3 mostra a identificação das proteínas sub-expressas com o uso de lítio em pacientes com transtorno afetivo bipolar. Os *scores* foram calculados com base na probabilidade de que a identidade da proteína observada é um evento aleatório. Em todas as proteínas identificadas, estes valores foram estatisticamente significantes ($p < 0,05$).

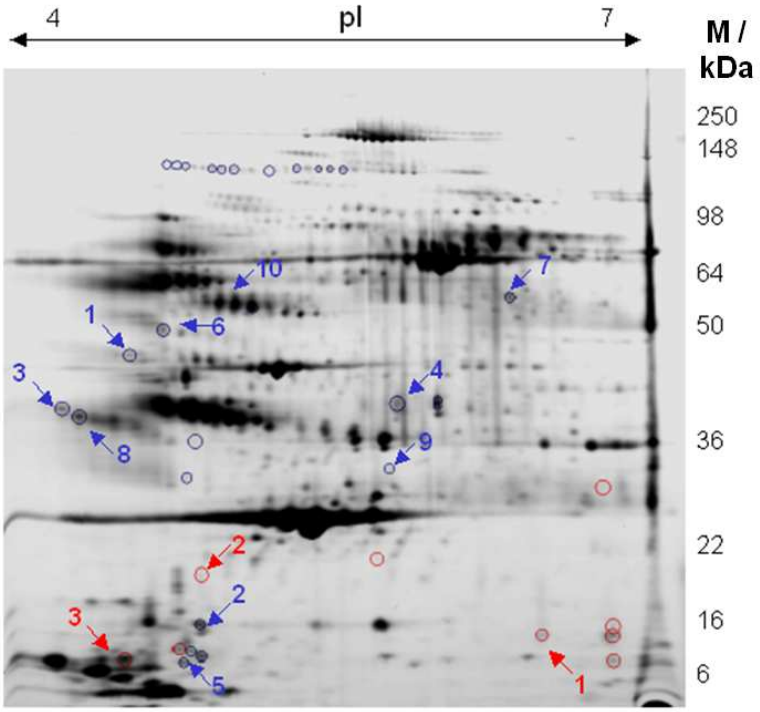



**Figura 2.5.** Análise por 2-D DIGE (faixa de pH entre 4 e 7) do soro sangüíneo de pacientes bipolares tratados com lítio (n = 15) e não tratados com lítio (n = 10). Em vermelho são marcadas as proteínas sobre-expressas e, em azul, as sub-expressas na presença de lítio. Os números são relacionados às identificações das proteínas (vide Tabelas 2.2 e 2.3).

**Tabela 2.2.** Proteínas sobre-expressas na presença de lítio, identificadas por MALDI-TOF MS/MS. Os números referem-se aos *spots* vermelhos mostrados na Figura 2.5

| *Spot* | Identidade da proteína | Acesso NCBI | Razão FR[a] | *Score* PMF[b] | Cobertura da seqüência[c] / % | Peptídeos seqüenciados[d] | *Ion score* MS/MS[e] |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | Apolipoproteína A-I (fragmento C-terminal) | gi\|90108664 | 2,03 | 49 | 18 | K.VSFLSALEEYTK.K<br>R.THLAPYSDELR.Q<br>R.QGLLPVLESFK.V | 49<br>44<br>30 |
| 2 | Apolipoproteína A-I (fragmento N-terminal) | gi\|90108664 | 1,96 | 95 | 38 | R.DYVSQFEGSALGK.Q<br>R.EQLGPVTQEFWDNLEK.E<br>-.DEPPQSPWDR.V<br>K.VQPYLDDFQK.K | 38<br>114<br>74<br>36 |
| 3 | Apolipoproteína A-I (fragmento N-terminal) | gi\|90108664 | 1,53 | 89 | 40 | -.DEPPQSPWDR.V<br>K.VQPYLDDFQK.K<br>K.WQEEMELYR.Q<br>R.DYVSQFEGSALGK.Q | 42<br>118<br>45<br>30 |

[a] Razão entre os fatores de regulação de pacientes bipolares usando lítio e não usando lítio.
[b] *Scores* de proteínas obtido para o PMF pelo MASCOT.
[c] A cobertura da seqüência para a apolipoproteína A-I refere-se à proteína intacta de 28.1 kDa.
[d] M sublinhado significa metionina oxidada.
[e] *Ion scores* obtidos para seqüências de peptídeos individuais pelo MASCOT.

**Tabela 2.3.** Proteínas sub-expressas na presença de lítio, identificadas por MALDI-TOF MS/MS. Os números referem-se aos *spots* azuis mostrados na Figura 2.5

| *Spot* | Identidade da proteína | Acesso NCBI | Razão FR | *Score* PMF | Cobertura da seqüência / % | Peptídeos seqüenciados | *Ion score* MS/MS |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | Vitronectina | gi\|119571467 | 0,42 | 121 | 21 | R.FEDGVLDPDYPR.N<br>R.DVWGIEGPIDAAFTR.I | 51<br>50 |
| 2 | Transtiretina | gi\|219978 | 0,06 | 123 | 70 | R.YTIAALLSPYSYSTTAVVTNPK.E<br>K.ALGISPFHEHAEVVFTANDSGPR.R | 97<br>56 |
| 3 | Alfa-1-antitripsina | gi\|177827 | 0,31 | 95 | 35 | R.DTVFALVNYIFFK.G<br>K.TDTSHHDQDHPTFNK.I | 71<br>57 |
| 4 | Alfa-1-antitripsina | gi\|177827 | 0,37 | 130 | 41 | K.LQHLENELTHDIITK.F<br>R.DTVFALVNYIFFK.G | 64<br>63 |
| 5 | Vitronectina | gi\|119571467 | 0,41 | 126 | 19 | R.SIAQYWLGCPAPGHL.- | 110 |
| 6 | Alfa-1-antitripsina | gi\|177827 | 0,50 | 142 | 47 | R.TLNQPDSQLQLTTGNGLFLSEGLK.L | 137 |
| 7 | Ig gama-1 | gi\|121039 | 0,30 | 74 | 30 | K.FNWYVDGVEVHNAK.T<br>R.VVSVLTVLHQDWLNGK.E | 89<br>33 |
| 8 | Alfa-1-antitripsina | gi\|177827 | 0,56 | 91 | 35 | R.TLNQPDSQLQLTTGNGLFLSEGLK.L<br>R.DTVFALVNYIFFK.G<br>K.TDTSHHDQDHPTFNK.I | 143<br>67<br>59 |
| 9 | Alfa-1-antitripsina | gi\|177827 | 0,22 | 184 | 48 | K.LQHLENELTHDIITK.F<br>R.DTVFALVNYIFFK.G<br>K.DTEEEDFHVDQVTTVK.V | 97<br>79<br>52 |
| 10 | Antitrombina Iii | gi\|999513 | 0,41 | 239 | 63 | K.AFLEVNEEGSEAAASTAVVIAGR.S<br>K.EQLQDMGLVDLFSPEK.S<br>K.TSDQIHFFFAK.L<br>R.FATTFYQHLADSK.N | 176<br>83<br>69<br>65 |

Conforme os resultados mostrados na Tabela 2.2, os fragmentos de apolipoproteína A-I foram identificados como sendo as proteínas mais significantemente afetadas, mostrando uma sobre-expressão em pacientes bipolares tratados com lítio em relação aos pacientes bipolares não tratados com esta droga.

Na Figura 2.6, são mostrados os resultados das análises por MS/MS dos *spots* protéicos 1, 2 e 3, marcados em vermelho na Figura 2.5. Os fragmentos de peptídeos identificados, derivados da apolipoproteína A-I, estão destacados em negrito (PMF) e sublinhados (MS/MS) nas seqüências. Combinando as informações obtidas a respeito dos peptídeos trípticos identificados (Figura 2.6) com aquelas do gel de eletroforese bidimensional (Figura 2.5), é possível observar que o *spot* 1, que apresentou um pI experimental de aproximadamente 7, refere-se a um fragmento C-terminal da apolipoproteína A-I, que possui um pI teórico (calculado a partir da seqüência de aminoácidos) igual a 6,7, o que corrobora com o resultado visualizado no gel. Observações e cálculos similares caracterizam os *spots* 2 e 3 como fragmentos N-terminais da apolipoproteína A-I, com massas molares de cerca de 14 kDa, que possuem um pI ácido (teoricamente calculado como 4,5), o que está de acordo com as posições encontradas no gel de eletroforese.

Com base nestas informações, foi possível, portanto, identificar estas proteínas por 2-D DIGE e MALDI-TOF MS/MS como fragmentos da apolipoproteína A-I. Além disso, estes resultados corroboram com aqueles obtidos na análise por SELDI-TOF MS, onde três proteínas com massas molares de 14,0; 14,1 e 14,8 kDa foram detectadas (vide Tabela 2.1) como sendo sub-expressas em pacientes bipolares não tratados com lítio, mas cujos níveis foram restaurados a aproximadamente aquele do grupo controle pelo tratamento com lítio (vide Figura 2.4 (a)).

A respeito dos fragmentos da apolipoproteína A-I, Kunitake *et al.* [22] identificaram que fragmentos com massas molares de aproximadamente 26 e 14 kDa são encontrados no sangue após a venopunção. Anticorpos monoespecíficos para a apolipoproteína A-I reconheceram os fragmentos desta proteína, que têm

as seqüências N-terminais idênticas àquela reportada para a proteína intacta. A degradação da apolipoproteína A-I e a quantidade de fragmentos proteolíticos poderiam ser minimizadas pela adição de inibidores de protease logo após a venopunção. Neste trabalho, a adição destes inibidores não foi efetuada, o que pode explicar a identificação de fragmentos da apolipoproteína A-I ao invés da proteína intacta. Entretanto, a possibilidade de um processamento proteolítico alterado da apolipoproteína A-I na presença do transtorno afetivo bipolar e/ou do tratamento com lítio não deve ser totalmente descartada, mas sim, pode vir a ser um alvo de estudos futuros.

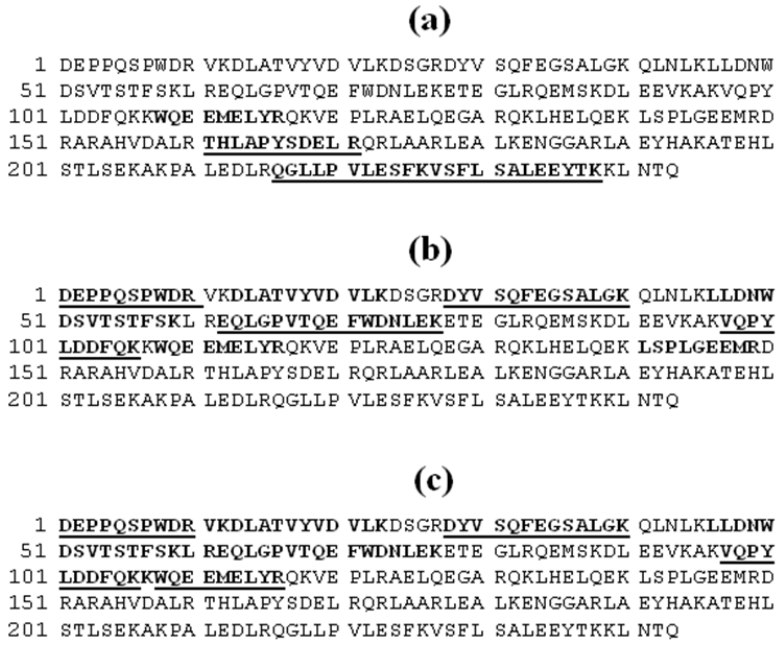



**Figura 2.6.** Identificação dos *spots* protéicos: **(a)** 1, **(b)** 2 e **(c)** 3, marcados em vermelho na Figura 2.5, referentes à apolipoproteína A-I. Os fragmentos de peptídeos identificados estão destacados em negrito (PMF) e sublinhados (MS/MS) nas seqüências.

Na Figura 2.7, é mostrado o gel de eletroforese da análise por 2-D DIGE realizada na faixa de pH entre 3 e 11, sendo que as amostras de soro sangüíneo foram preparadas por imunodepleção. Nesta análise, uma proteína de 28 kDa foi detectada como sendo a proteína que apresentou maior sub-expressão nos pacientes bipolares não tratados com lítio. Esta proteína foi identificada como sendo a apolipoproteína A-I intacta, com uma cobertura de seqüência de 56%.

Assim sendo, a apolipoproteína A-I apresentou o mesmo comportamento previamente observado nas análises por SELDI-TOF MS e 2-D DIGE em faixa de pH mais restrita e com diferente preparo da amostra de soro: sobre-expressão em pacientes tratados com lítio, com conseqüente sub-expressão em pacientes não tratados com esta droga.

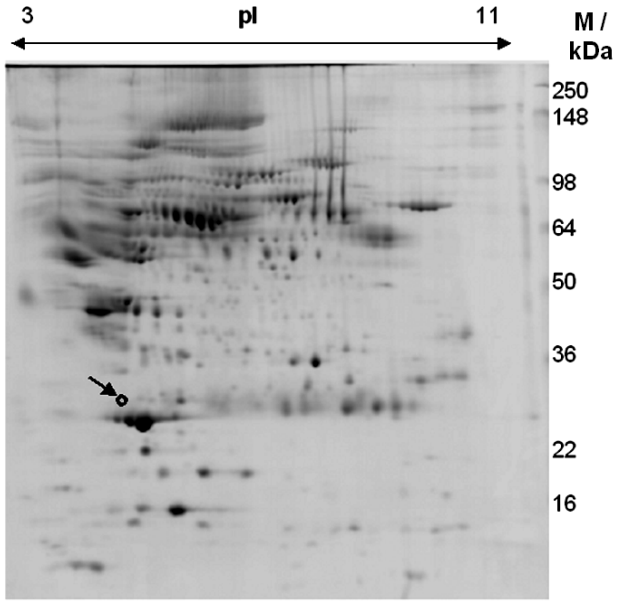



**Figura 2.7.** Análise por 2-D DIGE (faixa de pH entre 3 e 11) do soro sangüíneo de pacientes bipolares tratados com lítio (n = 15) e não tratados com lítio (n = 10). A proteína em destaque é a apolipoproteína A-I (28 kDa).

Como a apolipoproteína A-I é um marcador da doença arterial coronária, a determinação de sua concentração em soro sangüíneo é muito importante e realizada em diversos hospitais. Com base neste fato, a análise clínica de rotina (imunoturbidimetria) foi utilizada para a quantificação da apolipoproteína A-I e a análise estatística para os resultados obtidos é ilustrada na Figura 2.8.

A partir desta análise, foi detectada uma diferença estatisticamente significante ao comparar os grupos de pacientes bipolares entre si ($p$ = 0,0390, teste $t$ bicaudal não-pareado). Para este experimento, foram utilizadas todas as amostras de soro coletadas, descritas na Tabela 1.1 do Capítulo 1. A concentração desta proteína foi similar, ao comparar o grupo controle com o grupo de pacientes bipolares sob tratamento com lítio e, mais uma vez, menor em

pacientes bipolares não tratados com lítio. Apesar de neste experimento haver a limitação de que os grupos controle e de pacientes bipolares não eram completamente idênticos em termos de faixa etária e gênero, a apolipoproteína A-I foi detectada com o mesmo comportamento observado nas análises por SELDI-TOF MS, onde um grupo controle mais homogêneo foi utilizado. Estas observações sugerem que os níveis de apolipoproteína A-I podem ser indicadores robustos para o transtorno afetivo bipolar e seu tratamento com lítio.

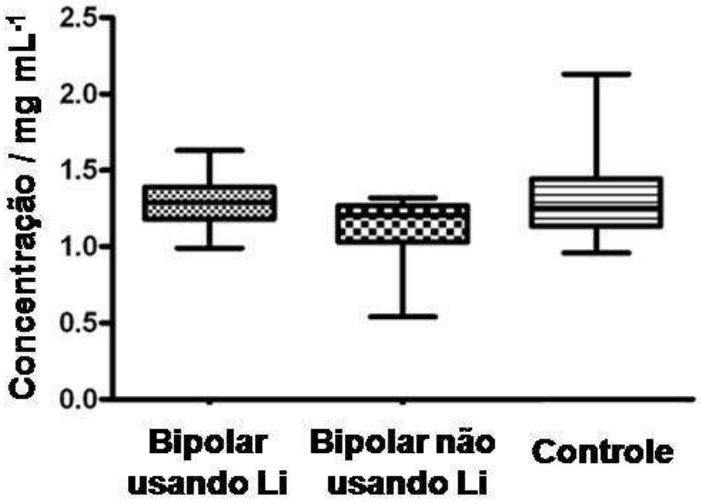



**Figura 2.8.** Análise estatística para as concentrações de apolipoproteína A-I, determinadas por análise imunoturbidimétrica.

Conforme mostrado na Tabela 2.3, a proteína que mostrou a maior sub-expressão em pacientes bipolares tratados com lítio foi a transtiretina, que foi reportada na literatura como sendo sub-expressa em pacientes com esquizofrenia [23] e depressão [24]. A alfa-1-antitripsina, que também apresentou sub-expressão em pacientes bipolares tratados com lítio, é descrita como sendo alterada na presença da esquizofrenia [25]. Estas proteínas, assim como a apolipoproteína A-I, são consideradas proteínas de fase aguda.

No próximo item, as alterações em nível protéico na presença do transtorno afetivo bipolar e seu tratamento com lítio são descritas e comparadas com resultados previamente reportados na literatura.

## 4.3. Alterações em nível protéico: identificação de potenciais biomarcadores do transtorno afetivo bipolar e do tratamento com lítio

As apolipoproteínas têm emergido como sendo fatores importantes em doenças psiquiátricas, tais como o transtorno afetivo bipolar e a esquizofrenia. Três apolipoproteínas foram detectadas como sendo sobre-expressas em cérebros de indivíduos com doenças neuropsiquiátricas: apolipoproteína D, E e L [26]. Membros da família das apolipoproteínas, incluindo a apolipoproteína A-I, D, E e L, são constituintes da fração dos lipídeos de alta densidade e conhecidas por apresentarem funções importantes no transporte de colesterol em células periféricas. Tais proteínas são também reconhecidas por desempenhar um papel no metabolismo neural e glial, e podem estar envolvidas na pré-disposição e na patofisiologia da doença de Alzheimer e de outras demências [26,27].

Como as apolipoproteínas desempenham um papel importante no metabolismo lipídico, um desequilíbrio na homeostase dos lipídeos na presença do transtorno afetivo bipolar ou outras doenças psiquiátricas pode ser uma forte hipótese. Levin *et al.* [28] suportaram esta teoria indiretamente. Os autores encontraram em soro de pacientes esquizofrênicos, dentre outras proteínas sub-expressas, cinco apolipoproteínas que apresentaram níveis significantemente menores. Quatro destas apolipoproteínas são constituintes da fração lipoprotéica de alta densidade, que está envolvida na regulação dos níveis de ácidos graxos livres. Assim sendo, a sub-expressão da apolipoproteína A-I em soro de pacientes bipolares em relação a indivíduos saudáveis encontrada nas análises proteômicas corroboram com estes resultados e com aqueles apresentados no Capítulo 1 [29], envolvendo análises metabonômicas, que indicaram alterações no metabolismo de lipídeos de pacientes bipolares em relação aos controles, bem como entre pacientes bipolares tratados com lítio ou com outras drogas excluindo o lítio.

Dean *et al.* [27] descreveram um decréscimo no nível da apolipoproteína E em amostras de plasma de pacientes bipolares não medicados, mas um acréscimo nos níveis desta proteína em pacientes tratados com estabilizadores de

humor (valproato de sódio ou carbonato de lítio), sugerindo que tais drogas podem afetar a homeostase de lipídeos. No presente trabalho, o mesmo comportamento foi descrito para a apolipoproteína A-I, ou seja, sobre-expressão em pacientes bipolares tratados com lítio e sub-expressão em pacientes não tratados com esta droga. Assim sendo, a hipótese de que as drogas estabilizadoras de humor desempenham um papel importante na homeostase de lipídeos é sustentada, sendo que isto pode vir a ser um alvo de futuros estudos do mecanismo de ação de tais drogas.

Durante o desenvolvimento deste trabalho de Tese, duas publicações reportaram investigações similares para a esquizofrenia, utilizando os mesmos métodos para determinação do perfil protéico em amostras de fluido cérebro-espinhal, cérebro, tecidos periféricos [30] e soro [28]. Assim como reportado neste trabalho para o transtorno afetivo bipolar, Huang *et al.* [30] identificaram um decréscimo nos níveis da apolipoproteína A-I em pacientes com esquizofrenia. Pela comparação do perfil protéico por SELDI-TOF MS, a apolipoproteína A-I foi detectada com um menor nível em pacientes bipolares com relação aos controles, bem como em pacientes não tratados com lítio com relação aos tratados com esta droga, conforme observado nas análises por 2-D DIGE e MALDI-TOF MS/MS. Com isso, é possível concluir que esta proteína deve participar na patofisiologia do transtorno afetivo bipolar da mesma maneira que na esquizofrenia. Entretanto, a apolipoproteína A-I não pode ser utilizada para diferenciar tais transtornos, pelo contrário, ela sugere uma desregulação relacionada a ambas as doenças. A literatura reporta [31] que os transtornos esquizofrênico e bipolar são similares (mas não em mesmo nível) em certos aspectos epidemiológicos, tais como: idade de início, risco vitalício, curso da doença, distribuição mundial, risco de suicídio, influência de gênero (homens e mulheres com mesmo risco para ambos os grupos dos transtornos) e susceptibilidade genética. O aumento nos níveis de apolipoproteína A-I em pacientes bipolares tratados com lítio aponta uma possível influência do tratamento na homeostase de lipídeos, o que pode justificar a eficácia do uso do lítio em bipolares, que é descrita desde a metade do século

passado por atuar nas fases de mania e depressão, além de reduzir significantemente as taxas de suicídio.

Alguns estudos sugerindo o uso de ômega-3 como suplemento alimentar visando a redução dos sintomas do trantorno afetivo bipolar vêm sendo propostos [32,33]. Os constituintes primários do ômega-3, ácido docosahexanóico e ácido eicosapentanóico, exercem um efeito inibitório na rota de sinalização celular, o que é similar ao mecanismo de ação proposto de estabilizadores de humor, como o lítio e o valproato. Tais estudos corroboram com os resultados apresentados neste trabalho no sentido de que os pacientes bipolares não tratados com lítio apresentaram um menor nível de lipídeos, os quais podem ser restaurados pelo tratamento com lítio ou, então, por suplementação nutricional.

A apolipoproteína A-I, a transtiretina e a alfa-1-antitripsina são proteínas de fase aguda, isto é, são proteínas cuja concentração aumenta ou diminui em resposta a processos inflamatórios. Tais processos são descritos na literatura como sendo relacionados à fenomenologia, à patofisiologia, à comorbidade e ao tratamento do transtorno afetivo bipolar [34].

Corroborando com os resultados encontrados na literatura previamente discutidos [23,25], Yang *et al.* [35] reportaram que a apolipoproteína A-I e a transtiretina são sub-expressas (proteínas de fase aguda negativas) em pacientes esquizofrênicos, enquanto que a alfa-1-antitripsina é sobre-expressa no plasma destes pacientes (proteína de fase aguda positiva).

Para o transtorno afetivo bipolar, a apolipoproteína A-I também foi descrita como sendo uma proteína de fase aguda negativa, sendo que seus níveis foram recuperados após o tratamento com lítio. A alfa-1-antitripsina, considerada uma proteína de fase aguda positiva em esquizofrenia [25,35], foi detectada com uma sobre-expressão no caso de pacientes bipolares não tratados com lítio no presente estudo, mostrando, portanto, um comportamento similar.

Já a transtiretina, foi reportada como sendo sub-expressa em fluido cérebro espinhal de pacientes com esquizofrenia [23] e depressão [24] (proteína de fase aguda negativa). Porém, neste trabalho, esta proteína foi detectada com uma sobre-expressão em soro sangüíneo de pacientes bipolares não tratados com lítio.

Com base nesta observação, é possível formular uma hipótese de que esta proteína pode vir a ser um biomarcador diferencial entre pacientes esquizofrênicos e bipolares, sugerindo um ponto a ser considerado em estudos avaliando a eficácia do lítio no tratamento do transtorno afetivo bipolar.

## 5. CONCLUSÕES PARCIAIS

A análise proteômica de fluidos biológicos é uma estratégia que vem sendo muito utilizada na detecção de biomarcadores potenciais para a diagnose e o tratamento de doenças. Neste Capítulo, duas metodologias proteômicas independentes (SELDI-TOF MS e 2-D DIGE associada à MALDI-TOF MS/MS) possibilitaram a identificação exploratória de diferentes perfis protéicos em soro sangüíneo, ao comparar indivíduos saudáveis com pacientes bipolares tratados com lítio ou outras drogas excluindo o lítio.

Uma das proteínas que apresentou maiores alterações em seus níveis foi a apolipoproteína A-I. Tal proteína apresentou uma sub-expressão no grupo de pacientes bipolares, independentemente do tratamento, em relação ao grupo controle. Porém, no caso de pacientes bipolares tratados com lítio, seu nível foi restaurado a aproximadamente aquele do grupo controle. Este mesmo comportamento foi observado por meio de análise clínica de rotina (imunoturbidimetria), corroborando com os resultados das análises proteômicas.

Como a apolipoproteína A-I participa do metabolismo lipídico, as alterações observadas em seus níveis suportam a provável hipótese de que os mecanismos patológicos que resultam no fenótipo do transtorno afetivo bipolar e que as rotas de ação do lítio como tratamento são afetados pelo desequilíbrio na homeostase de lipídeos. Assim sendo, fazem-se necessárias novas investigações visando elucidar o papel da apolipoproteína A-I na patofisiologia do transtorno afetivo bipolar, bem como na rota mecanística de ação do lítio como tratamento.

A apolipoproteína A-I, assim como a transtiretina e a alfa-1-antitripsina, é uma proteína de fase aguda, associada a processos inflamatórios. Ao comparar o comportamento destas proteínas encontrado neste trabalho com aquele descrito

na literatura para pacientes esquizofrênicos, observou-se que a transtiretina mostrou uma variação diferencial em seus níveis, podendo vir a ser um marcador diferencial entre pacientes tratados que possuem estes transtornos psiquiátricos.

Assim sendo, ao combinar os resultados obtidos neste trabalho com aqueles reportados na literatura, é possível suportar as hipóteses de que o metabolismo de lipídeos e os processos inflamatórios podem contribuir para os mecanismos patológicos que resultam no fenótipo do transtorno afetivo bipolar, bem como no mecanismo de ação do lítio como tratamento.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] B Domon, R Aebersold, *Review - Mass spectrometry and protein analysis*, **Science** 312 (2006) 212-217.

[2] R Aebersold, M Mann, *Mass spectrometry-based proteomics*, **Nature** 422 (2003) 198-207.

[3] M Kinter, NE Sherman, **Protein sequencing and identification using tandem mass spectrometry**, John Wiley & Sons, New York (2000).

[4] M Cretich, F Damin, G Pirri, M Chiari, *Protein and peptide arrays: Recent trends and new directions*, **Biomol Eng** 23 (2006) 77-88.

[5] X Yu, D Xu, Q Cheng, *Label-free detection methods for protein microarrays*, **Proteomics** 6 (2006) 5493-5503.

[6] J Mei, D Kolbin, H Kao, B Porton, *Protein expression profiling of postmortem brain in schizophrenia*, **Schizophrenia Res** 84 (2006) 204-213.

[7] SI Novikova, F He, NJ Cutrufello, MS Lidow, *Identification of protein biomarkers for schizophrenia and bipolar disorder in the postmortem prefrontal cortex using SELDI-TOF-MS ProteinChip profiling combined with MALDI-TOF-PSD-MS analysis*, **Neurobiol Dis** 23 (2006) 61-76.

[8] E de Hoffmann, V Stroobant, **Mass spectrometry: principles and applications**, John Wiley & Sons, New York (2001).

[9] JN Adkins, SM Varnun, KJ Auberry, RJ Moore, NH Angell, RJ Smith, DL Springer, JG Pounds, *Toward a human blood serum proteome – Analysis by multidimensional separation coupled with mass spectrometry*, **Mol Cell Proteomics** 1 (2002) 947-952.

[10] JL Luque-Garcia, TA Neubert, *Sample preparation for serum/plasma profiling and biomarker identification by mass spectrometry*, **J Chromatogr A** 1153 (2007) 259-276.

[11] N Ahmed, GE Rice, *Strategies for revealing lower abundance proteins in two-dimensional protein maps*, **J Chromatogr, B: Anal Technol Biomed Life Sci 815** (2005) 39-50.

[12] E Boschetti, PG Righetti, *The ProteoMiner in the proteomic arena: A non-depleting tool for discovering low-abundance species*, **J Proteomics** 71 (2008) 255-264.

[13] L Guerrier, PG Righetti, E Boschetti, *Reduction of dynamic protein concentration range of biological extracts for the discovery of low-abundance proteins by means of hexapeptide ligand library*, **Nat Protocols** 3 (2008) 883-890.

[14] DW Speicher (editor), **Proteome Analysis. Interpreting the Genome**, Elsevier, London (2004).

[15] S Sriyam, S Sinchaikul, P Tantipaiboonwong, C Tzao, S Phutrakul, S Chen, *Enhanced detectability in proteome studies*, **J Chromatogr, B: Anal Technol Biomed Life Sci** 849 (2007) 91-104.

[16] D Wu, T Tomonaga, K Sogawa, M Satoh, M Sunaga, M Nezu, M Oh-Ishi, Y Kodera, T Maeda, T Ochiai, F Nomura, *Detection of biomarkers for alcoholism by two-dimensional differential gel electrophoresis*, **Alcohol Clin Exp Res** 31 (2007) 67S-71S.

[17] D Wessel, UI Flügge, *A method for the quantitative recovery of protein in dilute-solution in the presence of detergents and lipids*, **Anal Biochem** 138 (1984) 141-143.

[18] T Berkelman, T Stenstedt, **2-D Electrophoresis - Principles and Methods**, Amersham Biosciences, Uppsala (1998).

[19] G Candiano, M Bruschi, L Musante, L Santucci, GM Ghiggeri, B Carnemolla, P Orecchia, L Zardi, PG Righetti, *Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis*, **Electrophoresis** 25 (2004) 1327-1333.

[20] O Jahn, D Hesse, M Reinelt, HD Kratzin, *Technical innovations for the automated identification of gel-separated proteins by MALDI-TOF mass spectrometry*, **Anal Bioanal Chem** 386 (2006) 92-103.

[21] JC Miller, JN Miller, **Statistics for Analytical Chemistry**, 3ª edição, Ellis Horwood Limited, Chichester (1993).

[22] ST Kunitake, GC Chen, SF Kung, JW Schilling, DA Hardman, JP Kane, *Pre-beta high density lipoprotein – unique disposition of apolipoprotein A-I increases susceptibility to proteolysis*, **Arterioscler** 10 (1990) 25-30.

[23] JTJ Huang, FM Leweke, D Oxley, L Wang, N Harris, D Koethe, CW Gerth, BM Nolden, S Gross, D Schreiber, B Reed, S Bahn, *Disease biomarkers in cerebrospinal fluid of patients with first-onset psychosis*, **PLoS Med** 3 (2006) 348.

[24] GM Sullivan, JA Hatterer, J Herbert, X Chen, SP Roose, E Attia, JJ Mann, LB Marangell, RR Goetz, JM Gorman, *Low levels of transthyretin in the CSF of depressed patients*, **Am J Psychiatry** 156 (1999) 710-715.

[25] Y Yang, C Wan, H Li, H Zhu, Y La, Z Xi, Y Chen, L Jiang, G Feng, L He, *Altered levels of acute phase proteins in the plasma of patients with schizophrenia*, **Anal Chem** 78 (2006) 3571-3576.

[26] EA Thomas, JG Sutcliffe, *The neurobiology of apolipoproteins in psychiatric disorders*, **Mol Neurobiol** 26 (2002) 369-388.

[27] B Dean, A Digney, S Sundram, E Thomas, E Scarr, *Plasma apolipoprotein E is decreased in schizophrenia spectrum and bipolar disorder*, **Psychiatry Res** 158 (2008) 75-78.

[28] Y Levin, L Wang, E Schwarz, D Koethe, FM Leweke, S Bahn, *Global proteomic profiling reveals altered proteomic signature in schizophrenia serum*, **Mol Psychiatry** (2009), no prelo.

[29] A Sussulini, A Prando, DA Maretto, RJ Poppi, L Tasic, CEM Banzato, MAZ Arruda, *Metabolic profiling of human blood serum from treated patients with bipolar disorder employing $^{1}H$ NMR spectroscopy and chemometrics*, **Anal Chem** 81 (2009) 9755-9763.

[30] JTJ Huang, L Wang, S Prabakaran, M Wengenroth, HE Lockstone, D Koethe, CW Gerth, S Gross, D Schreiber, K Lilley, M Wayland, D Oxley, FM Leweke, S Bahn, *Independent protein-profiling studies show a decrease in apolipoprotein A1 levels in schizophrenia CSF, brain and peripheral tissues*, **Mol Psychiatry** 13 (2008) 1118-1128.

[31] WH Berrettini, *Are schizophrenic and bipolar disorders related? A review of family and molecular studies*, **Biol Psychiatry** 48 (2000) 531-538.

[32] AL Stoll, WE Severus, MP Freeman, S Rueter, HA Zboyan, E Diamond, KK Cress, LB Marangell, *Omega-3 fatty acids in bipolar disorder*, **Arch Gen Psychiatry** 56 (1999) 407-412.

[33] T Turnbull, M Cullen-Drill, A Smaldone A, *Efficacy of omega-3 fatty acid supplementation on improvement of bipolar symptoms: a systematic review*, **Arch Psychiatry Nursing** 22 (2008) 305-311.

[34] BI Goldstein, DE Kemp, JK Soczynska, RS McIntyre, *Inflammation and the phenomenology, pathophysiology, comorbidity, and treatment of bipolar disorder: A systematic review of the literature*, **J Clin Psychiatry** 70 (2009) 1078-1090.

[35] Y Yang, C Wan, H Li, H Zhu, Y La, Z Xi, Y Chen, L Jiang, G Feng, L He, *Altered levels of acute phase proteins in the plasma of patients with schizophrenia*, **Anal Chem** 78 (2006) 3571-3576.

# CAPÍTULO 3

# ESTUDOS METALÔMICOS

# 1. OBJETIVOS

Neste Capítulo, os objetivos consistiram na comparação dos perfis metalômicos (ionômicos e metaloproteômicos) das amostras de soro sangüíneo de indivíduos saudáveis e pacientes bipolares tratados com lítio ou outras drogas excluindo o lítio, bem como na identificação e determinação de íons metálicos e semimetálicos livres ou ligados a proteínas diferenciais entre estes grupos.

A etapa dos estudos metaloproteômicos foi realizada no Centro de Pesquisas de Jülich (Alemanha), em colaboração com a Dra. Johanna Sabine Becker.

# 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

## 2.1. Metaloproteínas e proteínas ligadas a metais

Aproximadamente 30% das proteínas e enzimas contêm íons metálicos ou semimetálicos em suas estruturas, sendo que cerca de 40% destes elementos são cruciais para manter suas funcionalidades biológicas [1,2], o que justifica o crescente interesse na identificação e quantificação dos mesmos em metaloproteínas e proteínas ligadas a metais.

As metaloproteínas constituem o grupo de proteínas que contêm um cofator metálico, incorporado por meio de ligações específicas (ligações covalentes). Este cofator pode ser um íon metálico isolado ou pode estar coordenado a um composto orgânico não-protéico. Já as proteínas ligadas a metais (*metal-binding proteins*) constituem o grupo de proteínas onde os íons metálicos são incorporados por ligações não-específicas, que são facilmente perdidas durante o manuseio da amostra (isolamento e diluição) ou, então, durante a separação eletroforética, sob a influência de um campo elétrico [3-5].

As metaloproteínas e as proteínas ligadas a metais apresentam um papel importante na fisiologia, exercendo diferentes funções, tais como a regulação da

homeostase de íons metálicos, a desintoxicação, a participação em imuno-reações não-específicas, o transporte e o armazenamento de oxigênio e a regulação da expressão genética. Além disso, muitas dessas proteínas atuam como marcadores de patologias no sangue humano, tais como a mioglobina, que é relacionada ao infarto do miocárdio, ou a hemoglobina e a transferrina, que são relacionadas à anemia [6].

Devido à importância destas biomoléculas, recentemente, uma nova área científica, denominada metalômica, foi proposta por Haraguchi [7]. Esta área envolve a integração de estudos tradicionalmente analíticos com estudos inorgânicos e bioquímicos [8]. Uma discussão mais aprofundada sobre este tema será apresentada a seguir.

## 2.2. Metalômica

A metalômica é um campo de pesquisa que deve estar em simbiose com a genômica e a proteômica, pois a síntese e as funções metabólicas dos genes e das proteínas não ocorrem sem a presença de íons metálicos ou metaloenzimas, que são metaloproteínas que atuam como catalisadores biológicos na regulação das reações biológicas e das funções fisiológicas em células e órgãos [7].

A proteômica envolve o estudo das propriedades das proteínas (nível de expressão, modificações pós-traducionais, interações, entre outros) em uma larga escala, de modo a obter uma visão global dos processos celulares [9]. Já a metalômica tem como principais objetivos a verificação da distribuição das espécies metálicas e semimetálicas, bem como a elucidação dos aspectos fisiológicos e funcionais das biomoléculas que contenham íons metálicos em suas estruturas, tais como as metaloproteínas e as proteínas ligadas a metais [7,10]. Na metalômica, os metais ou semimetais presentes em um sistema biológico (células, tecidos, fluidos ou organismos) na forma livre ou complexada, são definidos como metalomas [11].

Assim, de acordo com as definições propostas na literatura recente, a *metalômica* consiste no estudo dos *metalomas*, que é subclassificada em

*ionômica*, quando o metaloma é avaliado na forma de *íons livres*, e em *metaloproteômica*, quando é visada a determinação do conjunto de *complexos metálicos (ou semimetálicos) com ligantes protéicos* [12].

O estudo do metaloma pode fornecer informações sobre: (i) como um elemento (metal ou semimetal) está distribuído entre os compartimentos celulares de um determinado tipo de célula; (ii) seu meio de coordenação (em qual biomolécula está incorporado ou por qual bioligante está complexado); (iii) as concentrações das espécies metálicas individuais presentes; e (iv) a estrutura da biomolécula [7,11].

A etapa inicial de qualquer estudo metalômico consiste na separação das proteínas da amostra de interesse, utilizando métodos de separação de alta resolução, como a cromatografia líquida e gasosa ou a eletroforese capilar ou em gel. A seguir, as proteínas são identificadas por meio de técnicas de espectrometria de massas molecular, utilizando métodos de ionização suave como a MALDI e a ESI. E, por fim, os íons metálicos e semimetálicos são identificados e quantificados por meio de técnicas espectrométricas, como a fluorescência de raios-X, a espectrometria de absorção atômica e a ICP-MS [5]. A seguir, os conceitos e aplicações envolvendo a ICP-MS para a quantificação de elementos ligados a proteínas serão discutidos.

## 2.3. ICP-MS para a quantificação de elementos complexados com proteínas

Recentemente, o potencial da ICP-MS como uma técnica complementar para a quantificação de proteínas vem sendo explorado com o objetivo de identificar e quantificar diferentes elementos e suas espécies ligados a metaloproteínas e proteínas ligadas a metais.

A espectrometria de massas molecular tem um papel fundamental em estudos proteômicos. Porém, ela sozinha não pode identificar e quantificar metais ou semimetais ligados a proteínas, devido aos seus limites de detecção

insuficientes para matrizes biológicas, que são ricas em sais [13]. Tal técnica é capaz de fornecer informações estruturais a respeito das proteínas, enquanto a espectrometria de massas elementar (ICP-MS) é ideal para identificar e quantificar elementos ligados às proteínas, de modo que essas técnicas tornam-se complementares na análise de metaloproteínas e proteínas ligadas a metais.

Enquanto a MALDI e a ESI são fontes de ionização suaves, com energia suficiente somente para converter moléculas grandes em íons sem fragmentação, a fonte de ICP opera a altas temperaturas (6000 a 10000 K), fornecendo energia suficiente para volatilizar, dessolvatar, atomizar e ionizar os átomos elementares formados. As ligações químicas das proteínas são prontamente quebradas e os elementos são ionizados a íons positivamente carregados. Tais íons são introduzidos no analisador de massas e separados de acordo com suas razões massa/carga (*m/z*). Como a forte ionização causa a perda da informação estrutural das proteínas, a mesma deve ser obtida por meio de técnicas de espectrometria de massas molecular, demonstrando, portanto, que as técnicas de espectrometria de massas molecular e elementar devem ser empregadas de modo sinérgico para que a identificação e quantificação de metaloproteínas e proteínas ligadas a metais seja possível [14].

As principais características da ICP-MS para a análise de proteínas são: (i) alto rendimento analítico; (ii) limites de detecção baixos para a maioria dos elementos; (iii) efeitos de matriz mínimos; (iv) resposta específica aos heteroátomos (metais, semimetais ou não-metais); (v) capacidade de até 8 ordens de magnitude da faixa dinâmica linear; (vi) informação das proporções isotópicas; e (vii) acoplamento simples a outros métodos de separação [15,16].

Como um exemplo de aplicação, Boulyga *et al.* [17] empregaram a cromatografia de exclusão por tamanho acoplada em linha com a ICP-MS no estudo da especiação de íons metálicos em tecidos cancerosos de tireóide em comparação com tecidos saudáveis, de modo a verificar mudanças na especiação das metaloproteínas no tecido afetado patologicamente. Tal estudo determinou a presença de espécies ligadas a cádmio, cobre, chumbo e zinco em tecidos de tireóide saudáveis, enquanto que estas espécies não foram detectadas em tecidos

cancerosos, apontando uma distribuição dos íons metálicos completamente diferente em tecidos cancerosos.

A eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) é, em geral, o método de separação mais utilizado em análises de proteínas, por possuir a capacidade de separar centenas de proteínas em um único gel. Após a separação por PAGE, os *spots* de proteínas podem ser analisados por ICP-MS de duas maneiras:

(i) em solução, onde uma prévia digestão assistida por radiação microonda dos *spots* de proteínas é feita [18] e a solução resultante é inserida no nebulizador do equipamento; ou

(ii) *in situ*, onde o gel é analisado diretamente, utilizando ablação a laser (LA-ICP-MS) [19-22].

Poucas aplicações envolvendo a digestão assistida por radiação microonda de *spots* de proteínas antes da análise por ICP-MS são encontradas na literatura recente [23,24], pois este método requer mais tempo e é mais passível de apresentar contaminação e/ou perdas de amostra. A seção seguinte descreve o uso da LA-ICP-MS para a quantificação de elementos ligados a proteínas, após separação por PAGE.

## 2.3.1. PAGE-LA-ICP-MS

A LA-ICP-MS é uma técnica que utiliza um laser para ablar uma amostra sólida (por exemplo, a superfície de um gel de eletroforese ou um tecido biológico) e arrastar o aerossol formado por um fluxo contínuo de argônio para a fonte de ICP, sendo que os íons formados são analisados no espectrômetro de massas [14,15,25]. A detecção por LA-ICP-MS é rápida e robusta e o sinal é, teoricamente, diretamente proporcional à quantidade de elemento presente no *spot* de proteína [25]. A LA-ICP-MS é aplicada para análise micro local de amostras sólidas (biológicas e ambientais), com resolução espacial na faixa de µm [14].

Existem três estratégias de ablação a laser para a detecção de elementos ligados a proteínas separadas por PAGE via LA-ICP-MS:

(i) imagem [19,22],
(ii) varredura em linha através dos *spots* [20], e
(iii) análise micro local dos *spots* [21].

Os principais parâmetros para a determinação de elementos ligados a proteínas por PAGE-LA-ICP-MS são a sensibilidade (habilidade de detectar um elemento presente no gel) e a resolução (habilidade de distinguir entre dois *spots* ou linhas vizinhas do mesmo elemento ou isótopo) [26]. Em termos de sensibilidade, os parâmetros mais influentes são o tamanho do *spot* do laser e a velocidade de varredura, nos modos de imagem e varredura em linha, e o número de tiros do laser, na análise micro local dos *spots* de proteínas.

A principal limitação do uso de técnicas de PAGE para a identificação e quantificação de elementos ligados a proteínas envolve a preservação da ligação elemento-proteína, pois muitos complexos são instáveis e podem ser destruídos por troca com impurezas de metais contidas no gel [25]. A SDS-PAGE possui o maior poder de resolução entre as técnicas de PAGE. Entretanto, uma vez que o preparo de amostra para a SDS-PAGE requer o uso de um agente redutor (como o β-mercaptoetanol ou DTT) e o detergente SDS desnatura as proteínas, perdas de íons metálicos podem acontecer durante a separação das proteínas, especialmente no caso das proteínas ligadas a metais. A PAGE nativa tem sido explorada como uma alternativa a este problema, uma vez que a estrutura terciária das proteínas é preservada durante a separação. Porém, o uso desta técnica não é garantia suficiente de assegurar a preservação da ligação elemento-proteína, uma vez que outros componentes dos tampões podem complexar metais, perturbando o equilíbrio entre espécies ligadas e não ligadas. Outra desvantagem da PAGE nativa refere-se à resolução, por ser restrita a separações em uma dimensão, pois os protocolos de 2-D PAGE requerem o uso de reagentes desnaturantes [27].

Jiménez *et al.* [27] reportaram a problemática devido a perdas de metais na separação por PAGE antes da análise por LA-ICP-MS. Para isso, os autores estudaram duas metaloproteínas: a tiroglobulina, contendo iodo, e a superóxido dismutase (SOD), contendo cobre e zinco. A detecção quantitativa de iodo em tiroglobulina foi possível usando SDS-glicina PAGE ou PAGE nativa seguida de análise por LA-ICP-MS. Porém, a detecção de cobre e zinco em SOD por LA-ICP-MS dependeu das condições do método de PAGE, uma vez que eles foram apenas detectados usando SDS-tricina PAGE. Perdas de cobre e zinco foram atribuídas à glicina, quando esta era usada como íon de arraste na separação por PAGE, devido à formação de complexos de cobre e zinco. Em ambos os casos, a PAGE nativa gerou resultados similares àqueles obtidos pelo método SDS-glicina PAGE.

De modo a estudar a formação de proteínas contendo cobre, ferro e zinco em uma amostra de cérebro humano, Becker *et al.* [20] usaram marcadores isotópicos enriquecidos ($^{54}$Fe, $^{65}$Cu e $^{64}$Zn) e dopados a proteínas de cérebro de pacientes com Alzheimer, anteriormente à separação por 2-D PAGE. Os *spots* de proteínas foram analisados por LA-ICP-MS e foram medidas as proporções isotópicas $^{54}$Fe/$^{56}$Fe, $^{65}$Cu/$^{63}$Cu e $^{67}$Zn/$^{64}$Zn nas proteínas contendo metais. As medidas de proporções isotópicas obtidas por LA-ICP-MS indicaram certos *spots* de proteínas com uma composição isotópica natural de cobre, ferro e/ou zinco. Tais proteínas já continham os metais investigados e mostraram-se estáveis o suficiente para sobreviver às condições desnaturantes durante a eletroforese em gel. Entretanto, as proteínas que apresentaram uma razão isotópica modificada dos metais em comparação com a razão isotópica natural demonstraram o acúmulo dos marcadores dentro dos complexos protéicos. A identificação das proteínas foi realizada por MALDI-FTICR-MS, e as proteínas contendo cobre e zinco mostraram-se estáveis às condições redutoras durante a separação por 2-D PAGE e ao acúmulo do marcador isotópico enriquecido.

Estes exemplos da literatura mostram que, embora a PAGE nativa é uma boa alternativa para prevenir perdas de metais durante a separação eletroforética, a 2-D PAGE não deve ser completamente descartada como uma opção para a

separação de proteínas antes da detecção e quantificação de elementos por ICP-MS, uma vez que nem todas as proteínas são susceptíveis à quebra das ligações com elementos durante a eletroforerese em gel.

# 3. PARTE EXPERIMENTAL

## 3.1. Equipamentos e acessórios

Os equipamentos utilizados no desenvolvimento dos experimentos descritos neste Capítulo são listados a seguir. Os mesmos se encontram disponíveis no Grupo de Espectrometria, Preparo de Amostras e Mecanização (GEPAM), com exceção do espectrômetro de massas ICP-MS acoplado com sistema de ablação a laser e do secador de géis, que foram usados no Centro de Pesquisas de Jülich, Alemanha.

- Espectrômetro de massas ICP-MS Elan DRCe (Perkin Elmer, Norwalk, EUA)
- Espectrômetro de massas ICP-MS 7500ce (Agilent, Tóquio, Japão) acoplado com sistema de ablação a laser UP266 (New Wave, Fremont, EUA)
- Misturador vortex, modelo M-37600 (Thermolyne, Dubuque, EUA)
- Secador de géis, modelo 583 (Bio-Rad, Hercules, EUA)
- Ultracentrífuga, modelo Bio-Spin-R (Bio Agency, São Paulo, Brasil)
- Vidrarias de uso rotineiro em laboratório de química analítica

## 3.2. Reagentes e soluções

Todas as soluções foram preparadas utilizando-se água desionizada (≥ 18,2 MΩ cm), obtida por um sistema de purificação Milli-Q, e reagentes de grau analítico. Os frascos plásticos, vidrarias e demais utensílios de laboratório foram

descontaminados por meio de imersão em $HNO_3$ 10% (v/v), por 12 h. Depois, o material foi lavado três vezes com água Milli-Q e seco a temperatura ambiente. A seguir, é apresentada a lista dos reagentes utilizados nos experimentos descritos neste Capítulo:

- Ácido nítrico, $HNO_3$, M = 63,01 g $mol^{-1}$ (J.T. Baker, Phillipsburg, EUA)
- Solução padrão multielementar (Perkin Elmer, Norwalk, EUA)
- Triton X-100, $C_{14}H_{22}O(C_2H_4O)_{10}$, M = 647 g $mol^{-1}$ (J.T. Baker, Phillipsburg, EUA)

## 3.3. Determinação de íons livres em soro sangüíneo por ICP-MS

Para a determinação de íons livres nas amostras de soro sangüíneo por ICP-MS, estas foram primeiramente diluídas 10 vezes com solução de Triton X-100 a 0,05% (m/v) e $HNO_3$ a 0,5% (v/v) [28]. Após a diluição, as amostras foram analisadas em um espectrômetro de massas ICP-MS Elan DRCe. A análise semiquantitativa foi realizada em triplicata, e as seguintes regiões de razão massa/carga foram avaliadas: 6-15, 19-39, 42-210 e 230-240 u., com voltagem no quadrupolo igual a 0,4 V. Os fluxos de gás nebulizador, de gás auxiliar, de gás do plasma e de injeção da amostra foram de 0,91, 1,2, 15 e $1,5.10^{-3}$ L $min^{-1}$, respectivamente. A voltagem das lentes foi de 8,5 V e a potência da radiofreqüência foi de 1200 W. Após a realização das medidas, os dados foram transferidos para uma planilha do programa Microsoft Excel, onde foi realizada a análise estatística (análise de variância: fator único - ANOVA) dos mesmos.

## 3.4. Determinação de elementos ligados a proteínas por PAGE-LA-ICP-MS

Anteriormente às análises por LA-ICP-MS, as amostras de soro sangüíneo do grupo controle (n = 25), do grupo de pacientes bipolares tratados com lítio (n =

15) e do grupo de pacientes bipolares tratados com outras drogas excluindo o lítio (n = 10) foram reunidas e, então, um gel de eletroforese foi obtido para cada um dos grupos, em duplicata, de maneira similar àquela descrita nos itens 3.4 e 3.5 do Capítulo 2. O preparo de amostras utilizado foi com o *kit ProteoMiner* e a faixa de pH utilizada foi entre 4 e 7. A marcação com os corantes fluorescentes não foi necessária neste caso e a coloração dos géis foi feita com prata [29], para o gel destinado à análise por LA-ICP-MS, e com Coomassie coloidal, para o gel destinado à identificação das proteínas por MALDI-TOF MS/MS (realizada conforme o item 3.6 do Capítulo 2).

Os géis corados com prata foram secos a vácuo em secador de gel, por 2 h, usando o ciclo de gradiente de temperatura até 80 °C. A ablação a laser dos *spots* de proteínas para detectar elementos contidos nas mesmas foi realizada com um laser Nd: YAG. O material ablado foi transportado por um fluxo carregador de argônio até a fonte de ICP. Os íons formados no ICP foram extraídos no espectrômetro de massas quadrupolar e separados de acordo com suas razões massa/carga (*m/z*). Os modos de ablação usados foram imagem, varredura em linha através dos *spots* e análise micro local dos *spots* de proteínas. A Tabela 3.1 resume os parâmetros instrumentais utilizados para as análises por LA-ICP-MS.

**Tabela 3.1.** Parâmetros experimentais utilizados nas análises por LA-ICP-MS dos *spots* de proteínas contidos em géis de eletroforese

| **ICP-MS** | ICP-QMS, Agilent 7500ce |
|---|---|
| **Potência de RF / W** | 1500 |
| **Fluxo do gás carregador / mL min$^{-1}$** | 1,2 |
| **Sistema de ablação a laser** | New Wave UP 266 |
| **Comprimento de onda do laser Nd: YAG / nm** | 266 |
| **Densidade de potência do laser / W cm$^{-2}$** | $10^9$ |
| **Duração do pulso do laser / ns** | 20 |
| **Repetição de freqüência / Hz** | 20 |
| **Velocidade de varredura / µm s$^{-1}$** | 150 |
| **Tamanho do *spot* do laser / µm** | 110 (modo imagem) e 160 (modo de varredura em linha e análise micro local dos *spots*) |

# 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

## 4.1. Avaliação do perfil ionômico por ICP-MS

A análise ionômica foi realizada a partir da semiquantificação das amostras de soro sangüíneo por ICP-MS. Após a análise por ICP-MS, os dados foram analisados estatisticamente por análise de variância: fator único (ANOVA), sendo que o nível de confiança utilizado foi igual a 95%. Do total de 26 íons detectados, 14 mostraram diferenças estatisticamente significantes entre os três grupos estudados: As, B, Cl, Cr, Fe, K, Li, Mg, P, S, Se, Si, Sr e Zn. Todos estes elementos (com exceção do boro) foram encontrados em maior nível nos pacientes bipolares em relação aos controles. Apenas lítio e zinco foram encontrados em maior nível nos pacientes bipolares tratados com lítio em relação aos não tratados com esta droga, sendo que no caso do lítio tal comportamento já era previsto, devido ao uso do mesmo como tratamento neste grupo de pacientes. Considerando os demais elementos, os pacientes bipolares não tratados com lítio apresentaram os maiores níveis em relação aos outros grupos estudados.

A Tabela 3.2 mostra as concentrações determinadas para alguns dos íons diferenciais (Li, Cr e Sr), escolhidos aleatoriamente, que corroboram com os resultados observados previamente nas análises semiquantitativas.

**Tabela 3.2.** Concentrações de alguns íons diferenciais (média ± desvio padrão)

| | | | Concentrações / µg $L^{-1}$ | | |
|---|---|---|---|---|---|
| **Metal** | **Limite de detecção** | **Limite de quantificação** | **Controle** | **Bipolares tratados com Li** | **Bipolares não tratados com Li** |
| Li | 0,021 | 0,069 | 82 ± 14 | 7953 ± 453 | 91 ± 22 |
| Cr | 0,148 | 0,494 | 331 ± 28 | 351 ± 66 | 352 ± 30 |
| Sr | 0,073 | 0,244 | 28 ± 7 | 42 ± 15 | 60 ± 19 |

Diversas anormalidades bioquímicas observadas em populações que possuem doenças comportamentais são relacionadas à química do cérebro. Por exemplo, o cobre é um fator importante na conversão da dopamina a norepinefrina, e o zinco é necessário para que ocorra uma síntese eficiente do ácido gama-aminobutírico (neurotransmissor inibitório) [30,31].

De acordo com estudos que demonstraram alterações na concentração de zinco no cérebro induzidas por drogas antidepressivas e choques eletroconvulsivos em ratos, é possível concluir que o zinco possui um papel significante no mecanismo de terapias antidepressivas. Além do mais, as alterações no nível de zinco no sangue podem ser consideradas como um marcador da depressão: uma menor concentração de zinco no sangue (soro ou plasma) é encontrada em pacientes deprimidos em relação aos indivíduos saudáveis, sendo que, quanto maior a gravidade da doença (pacientes resistentes ao tratamento), menores as concentrações de zinco [32,33]. Assim sendo, o maior nível de zinco encontrado no soro de pacientes com transtorno afetivo bipolar tratados com lítio corrobora com os estudos que demonstram que o zinco possui uma função no mecanismo de terapias para o tratamento de transtornos psiquiátricos, bem como demonstra a eficiência do lítio no tratamento do transtorno afetivo bipolar.

Na literatura recente [34], um trabalho semelhante foi realizado para a análise de íons metálicos em amostras de soro e sangue de pacientes com a doença de Alzheimer. A determinação de Al, Ba, Be, Bi, Cd, Co, Cr, Hg, Li, Mn, Mo, Ni, Pb, Sb, Sn, Sr, Tl, V, W e Zr foi realizada com o uso de um espectrômetro SF-ICP-MS. Na presença da doença de Alzheimer, as diferenças encontradas em amostras de soro foram os maiores níveis de mercúrio e estanho ($p \leq 0,01$) e, em amostras de sangue, os maiores níveis de cobalto, lítio, manganês e estanho e os menores níveis de molibdênio ($p < 0,01$).

As diferenças encontradas nos níveis de alguns íons em soro sangüíneo apontam que o perfil ionômico é alterado na presença do transtorno afetivo bipolar, bem como possibilita a diferenciação entre os pacientes tratados com lítio ou com outros fármacos exceto o lítio. Embora tais alterações não possam ser

explicadas por meio de um modelo simples, alguns elementos mostraram desempenhar um papel de biomarcadores potenciais para o transtorno afetivo bipolar e/ou seu tratamento com lítio.

## 4.2. Modo de ablação a laser para a detecção de elementos ligados a proteínas

Na Figura 3.1, é mostrada a imagem de um gel bidimensional de proteínas de soro de pacientes bipolares tratados com lítio. Estão destacadas algumas das regiões do gel e os *spots* utilizados para as análises por LA-ICP-MS. Antes de comparar os grupos controle e de pacientes bipolares tratados com lítio ou não em termos de metais ligados a proteínas, foi realizado um estudo sobre o modo de ablação a laser, empregando os modos de imagem, varredura em linha através dos *spots* e análise micro local dos *spots* de proteínas.

A principal diferença entre estas distintas estratégias para a análise por LA-ICP-MS consiste no tempo de execução; enquanto o modo de imagem consome mais tempo (cerca de 2 a 6 horas para uma região de gel de 3 $cm^2$, com uma resolução de 160 µm), a análise micro local dos *spots* é mais rápida (cerca de 30 s para analisar um *spot* individual). Entretanto, o modo de imagem tem a vantagem de permitir a visualização da distribuição dos metais ao longo das proteínas contidas em uma região de gel, como pode ser visto na Figura 3.2, que mostra as imagens obtidas para Ag, Mg, Zn, Fe, Ca, Na, Sr e Ti na seção 1 (S1) do gel de eletroforese de soro de pacientes bipolares tratados com lítio (vide Figura 3.1). Os parâmetros experimentais adicionais para o modo de imagem (juntamente com aqueles descritos na Tabela 3.1) foram: 121 linhas, 169,3 pontos por linha e distância entre cada linha de 30 µm.

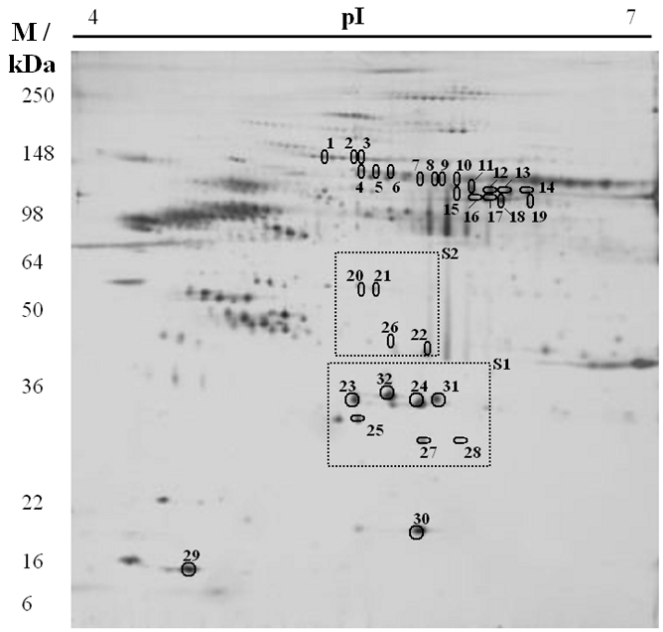



**Figura 3.1.** Eletroferograma 2-D PAGE (gel corado com prata) para 150 µg de proteínas de soro sangüíneo de pacientes bipolares tratados com lítio (n = 15).

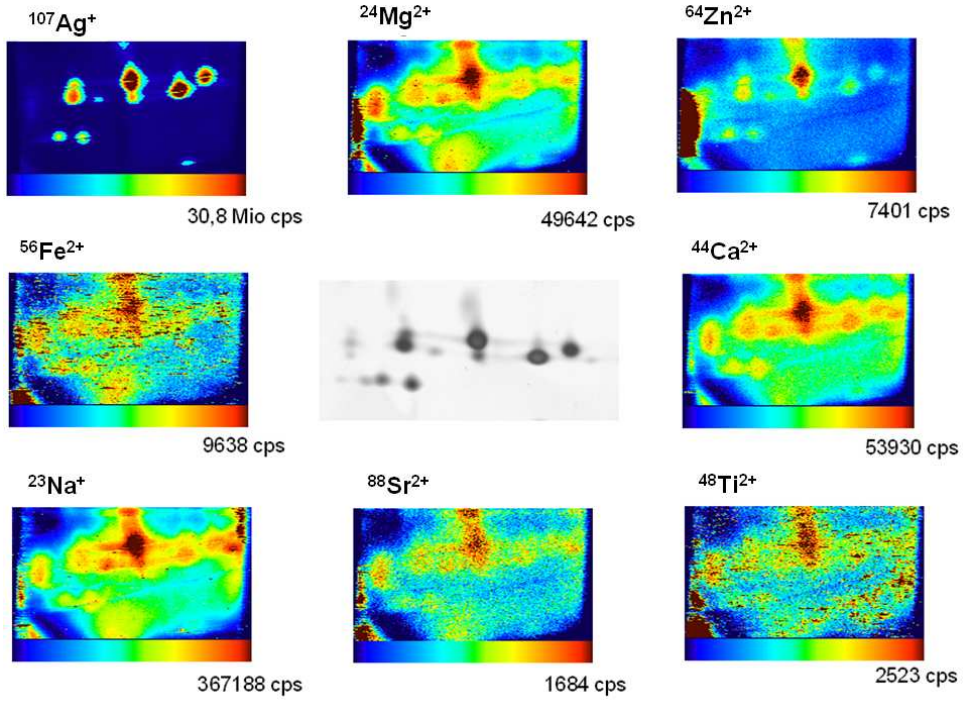
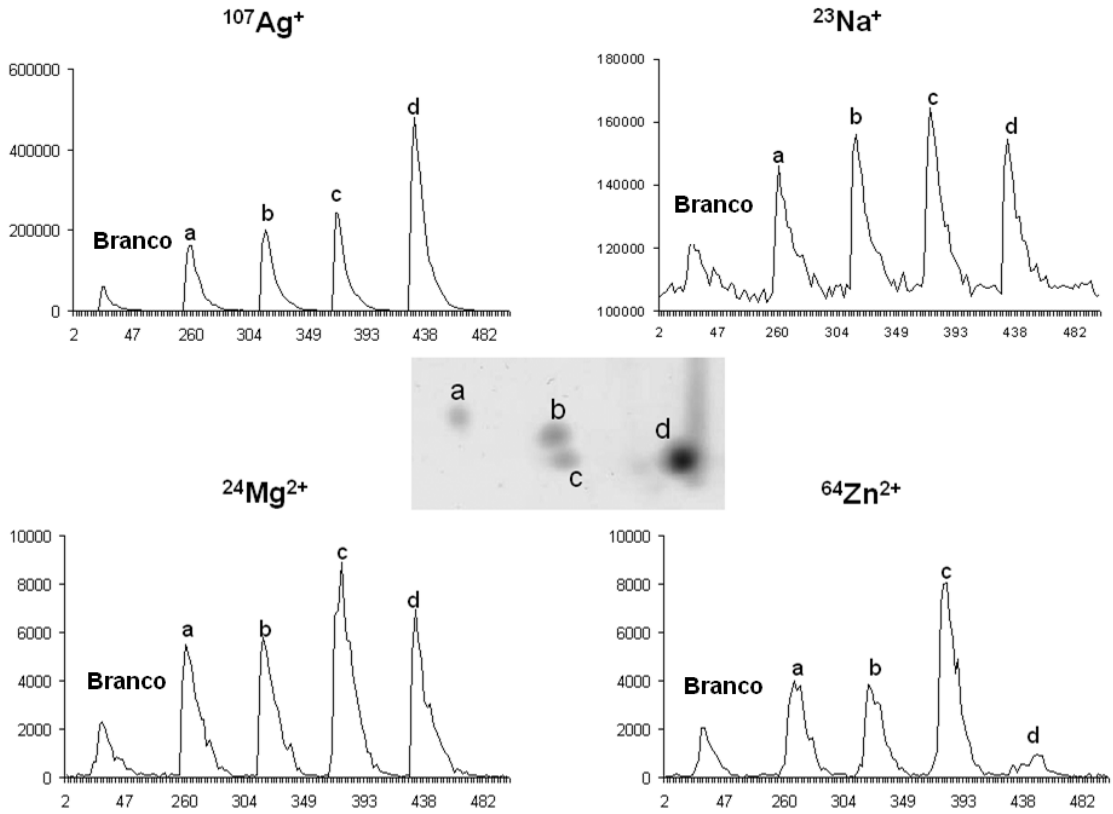



**Figura 3.2.** Imagens da distribuição de Ag, Mg, Zn, Fe, Ca, Na, Sr e Ti na seção 1 (S1) do gel de eletroforese de soro de pacientes bipolares tratados com lítio (veja Figura 3.1). A escala abaixo das imagens se refere à intensidade dos íons em contagens por segundo (cps).

A Figura 3.3 ilustra os resultados da análise micro local dos *spots* para Ag, Na, Mg e Zn na seção 2 (S2), bem como da análise por varredura em linha do *spot* 25 (na seção 1, S1) de um gel de eletroforese de soro de pacientes bipolares tratados com lítio (vide Figura 3.1). Os brancos utilizados para estas análises por LA-ICP-MS foram regiões do gel que não continham *spots* de proteínas.

As limitações da análise micro local dos *spots* de proteínas consistem na aparição de sinais ambíguos e na dificuldade de identificar os mesmos. No modo de varredura em linha, a limitação é que partículas de poeira contendo metais como cobre, zinco, manganês e alumínio podem aparecer como sinais, embora sejam mais fáceis de serem distinguidos daqueles de metais ligados a proteínas [26]. De modo a solucionar este problema, uma boa alternativa é realizar o preparo da amostra em uma sala limpa ou então utilizar o modo de imagem para verificar a presença de metais ligados às proteínas (porém, necessitando de mais tempo para a análise).

**(a)**



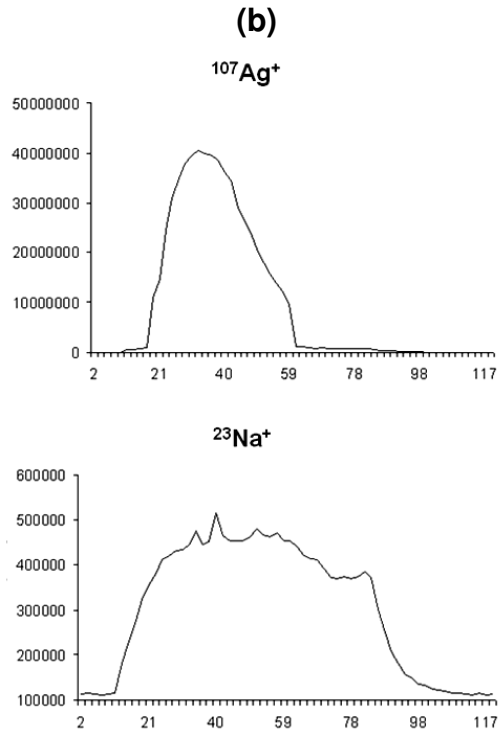



**Figura 3.3.** Detecção de elementos (intensidade em cps *x* tempo em segundos) para: **(a)** análise micro local dos *spots* da seção 2 (S2) para Ag, Na, Mg e Zn, e **(b)** varredura em linha para Ag e Na no *spot* 25 (S1) do gel de eletroforese de soro de pacientes bipolares tratados com lítio (veja Figura 3.1).

Neste trabalho, como foram analisados os géis inteiros, de modo a comparar os metais ligados a proteínas de pacientes bipolares sob diferentes tratamentos e indivíduos saudáveis, foi empregada a análise micro local dos *spots* de proteínas, utilizando uma sala limpa para o preparo de amostras, evitando, assim, possíveis sinais de contaminantes.

## 4.3. Detecção de elementos ligados a proteínas de soro de pacientes com transtorno afetivo bipolar por LA-ICP-MS

A Tabela 3.3 mostra os resultados para a detecção de metais ligados às proteínas de soro selecionadas, marcadas na Figura 3.1. Ao comparar o grupo controle com os grupos de pacientes bipolares, foi possível observar uma

diferenciação em termos de elementos contidos em proteínas. Os principais elementos detectados em todos os grupos foram sódio, magnésio, zinco, cálcio e ferro. O manganês foi encontrado apenas no grupo controle; o cobalto foi encontrado somente nos grupos controle e pacientes bipolares tratados com lítio; potássio e titânio foram detectados apenas nos grupos de pacientes bipolares; e o fósforo foi detectado somente nos grupos controle e pacientes bipolares não tratados com lítio.

O lítio não pôde ser detectado nas análises por LA-ICP-MS, pois as proteínas ligadas a lítio são descritas como sendo perdidas ou existentes em concentrações muito baixas em plasma sangüíneo humano [35]. A literatura também reporta que o padrão das proteínas ligadas a lítio em plasma para um paciente com transtorno afetivo bipolar é diferente daquele de um indivíduo controle, além de que, virtualmente, todo o lítio é ligado a proteínas de baixa massa molar com aproximadamente 1000 Da, que não podem ser visualizadas no gel de eletroforese bidimensional.

De acordo com a Tabela 3.3, os *spots* de proteínas 20, 21, 29 e 31 apresentaram metais ligados a proteínas somente no grupo de pacientes bipolares tratados com lítio. Já os *spots* de proteínas 4, 5, 6, 23, 27, 28 e 32 apresentaram um maior número de metais ligados a proteínas no grupo de pacientes bipolares tratados com lítio em relação ao grupo controle.

Foi também possível observar que alguns metais foram trocados em algumas proteínas, principalmente comparando o grupo controle e um dos grupos de pacientes bipolares. Por exemplo, o sódio foi deslocado por potássio nas proteínas 7, 16 e 30; o magnésio foi deslocado por cálcio nas proteínas 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 e 18, ou por zinco nas proteínas 14, 15 e 32; e o ferro foi substituído por estrôncio na proteína 24. Os íons metálicos trocados possuem a mesma carga e números atômicos similares.

**Tabela 3.3.** Elementos diferenciais detectados nos *spots* de proteínas, marcados na Figura 3.1, ao comparar o grupo controle com os grupos de pacientes bipolares tratados com lítio ou não

| ***Spot*** | **Controle** | **Bipolares tratados com lítio** | **Bipolares não tratados com lítio** |
|---|---|---|---|
| 1 | Mg, Mn, Co, Zn, Sr | Na, Mg, Zn | Na, Mg, Fe, Zn |
| 2 | Mg, Zn | Na, Mg, Fe | Na, Mg, Fe, Zn |
| 3 | Mg | Na, Mg, Fe | Na, Mg, Fe, Zn |
| 4 | Mg | Na, Mg, Fe, Zn | - |
| 5 | Mg, Zn | Na, Mg, Fe, Zn | - |
| 6 | Mg | Na, Mg, Fe, Zn | - |
| 7 | Na, Mg, Zn | - | K |
| 8 | Na, Mg, Zn | - | Zn, Ca |
| 9 | Na, Mg, Zn | - | Ca |
| 10 | Na, Mg, Zn | - | Ca |
| 11 | Na, Mg | - | Ca |
| 12 | Na, Mg | - | Ca |
| 13 | Na, Mg | - | Ca |
| 14 | Na, Mg | Zn | Ca |
| 15 | Na, Mg | Zn | Ca |
| 16 | Na, Mg | K | Ca |
| 17 | Na, Mg | - | Ca |
| 18 | Na, Mg | - | Ca |
| 19 | Na, Mg | - | Na |
| 20 | - | Na, Mg, Ca, Zn | - |
| 21 | - | Na, Ca, Zn | - |
| 22 | - | Na | Ca |
| 23 | Zn | Na, Mg, Co, Zn, Sr | - |
| 24 | Na, Mg, Ca, Fe | Na, Mg, Ca, Sr | - |
| 25 | Zn | Na, Mg, Zn | Na, K, Ti, Fe, Zn |
| 26 | - | Na, Ca, Zn | Ca |
| 27 | Ca | Na, Mg, Ca, Ti, Fe, Zn, Sr | - |
| 28 | Ca | Na, Mg, Ca, Ti, Fe, Zn, Sr | - |
| 29 | - | Na, Mg, Sr, Fe, Zn | - |
| 30 | Na, P | Na, Mg, Fe, Zn, Sr | P, K |
| 31 | - | Na, Mg, Ca, Fe, Co, Zn, Sr | - |
| 32 | Zn | Na, Mg | - |

## 4.4. Identificação de proteínas por MALDI-TOF MS/MS e correlação com os elementos ligados

De modo a correlacionar os diferentes elementos encontrados em proteínas com suas estruturas e funções, a identificação das mesmas foi realizada por espectrometria de massas molecular (MALDI-TOF MS/MS). A Tabela 3.4 mostra as identidades das proteínas previamente analisadas por LA-ICP-MS, que estão marcadas e numeradas na Figura 3.1.

Na Figura 3.4 é mostrado o espectro de massas para uma das proteínas identificadas, a apolipoproteína A-I (*spot* 27, Figura 3.1). Ela foi identificada com *score* de PMF igual a 147 e cobertura de seqüência de 61%, e com *ion score* MS/MS igual a 223.

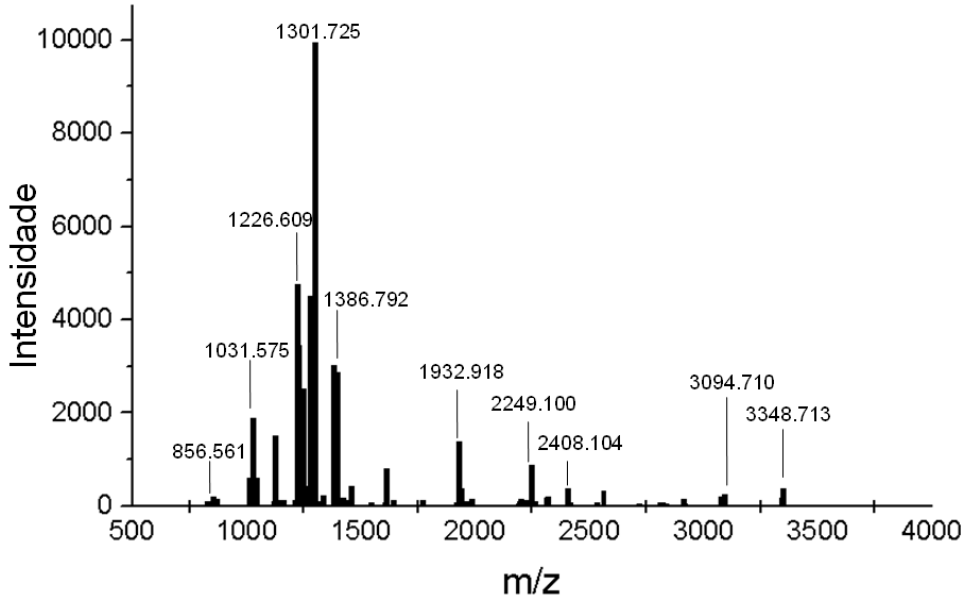



**Figura 3.4.** Espectro de massas para o *spot* 27 (vide Figura 3.1).

Algumas das proteínas identificadas nesta análise (apolipoproteína A-I, transtiretina e vitronectina) foram previamente reportadas como sendo diferenciais ao comparar os grupos de pacientes bipolares tratados com lítio ou outras drogas excluindo o lítio (vide Capítulo 2).

**Tabela 3.4.** Identificação das proteínas marcadas na Figura 3.1 por MALDI-TOF MS/MS

| *Spot* | Identidade da proteína | Número de acesso | M / kDa | Resíduos de Cys |
|---|---|---|---|---|
| 1 | Fibulina-1 | P23142 | 77,21 | 80 |
| 2 | Fibulina-1 | P23142 | 77,21 | 80 |
| 3 | Fibulina-1 | P23142 | 77,21 | 80 |
| 4 | Complemento C1s subcomponente | P09871 | 76,68 | 40 |
| 5 | Complemento C1s subcomponente | P09871 | 76,68 | 40 |
| 6 | Complemento C1s subcomponente | P09871 | 76,68 | 40 |
| 7 | Vitronectina | P04004 | 54,31 | 21 |
| 8 | Vitronectina | P04004 | 54,31 | 21 |
| 9 | Vitronectina | P04004 | 54,31 | 21 |
| 10 | Vitronectina | P04004 | 54,31 | 21 |
| 11 | Vitronectina | P04004 | 54,31 | 21 |
| 12 | Vitronectina | P04004 | 54,31 | 21 |
| 13 | Vitronectina | P04004 | 54,31 | 21 |
| 14 | Vitronectina | P04004 | 54,31 | 21 |
| 15 | Vitronectina | P04004 | 54,31 | 21 |
| 16 | Vitronectina | P04004 | 54,31 | 21 |
| 17 | Vitronectina | P04004 | 54,31 | 21 |
| 18 | Vitronectina | P04004 | 54,31 | 21 |
| 19 | Vitronectina | P04004 | 54,31 | 21 |
| 20 | Clusterina | 10909 | 52,50 | 26 |
| 21 | Clusterina | 10909 | 52,50 | 26 |
| 22 | Clusterina | 10909 | 52,50 | 26 |
| 23 | Soro amilóide P-componente | P02743 | 25,39 | 4 |
| 24 | Soro amilóide P-componente | P02743 | 25,39 | 4 |
| 25 | Ácido siálico ligado a Ig lectina | Q96LC7 | 74,54 | 24 |
| 26 | Ácido siálico ligado a Ig lectina | Q96LC7 | 74,54 | 24 |
| 27 | Apolipoproteína A-I | P02647 | 30,78 | 4 |
| 28 | Apolipoproteína A-I | P02647 | 30,78 | 4 |
| 29 | Transtiretina | P02766 | 15,89 | 4 |
| 30 | Complemento C4-A | P0C0L4 | 192,77 | 58 |
| 31 | Complemento C4-A | P0C0L4 | 192,77 | 58 |
| 32 | Complemento C4-A | P0C0L4 | 192,77 | 58 |

A apolipoproteína A-I (*spots* 27 e 28, Figura 3.1), reportada anteriormente como sendo sub-expressa em pacientes bipolares não tratados com lítio, não apresentou metais ligados no caso deste grupo, conforme mostra a Tabela 3.3. Entretanto, no grupo controle, o cálcio foi detectado nesta proteína, bem como no grupo de pacientes bipolares tratados com lítio, onde outros metais (sódio, magnésio, titânio, ferro, zinco e estrôncio) ligados a esta proteína também foram encontrados.

A vitronectina (*spots* 7 a 19, Figura 3.1) foi reportada nos estudos proteômicos como sendo sub-expressa em pacientes bipolares tratados com lítio. Dentre as isoformas de vitronectina, somente os *spots* 14, 15 e 16 apresentaram um metal (zinco ou potássio) ligado no caso do grupo de pacientes bipolares tratados com lítio, enquanto que os grupos controle e pacientes bipolares tratados com outras drogas excluindo o lítio apresentaram pelo menos um metal ligado em todas as isoformas desta proteína.

Embora a apolipoproteína A-I e a vitronectina apresentaram nenhum ou poucos metais ligados quando reportadas como sub-expressas, a transtiretina (*spot* 29, Figura 3.1), reportada como sendo sub-expressa em pacientes bipolares tratados com lítio, apresentou somente metais ligados (sódio, magnésio, estrôncio, ferro e zinco) neste grupo. Este fato mostra que a regulação de uma proteína não pode ser determinada somente em termos dos resultados obtidos com a espectrometria de massas elementar, demonstrando que a combinação com a espectrometria de massas molecular é necessária para a obtenção de uma informação metaloproteômica completa.

## 5. CONCLUSÕES PARCIAIS

A partir das análises exploratórias das amostras de soro por ICP-MS, foi possível observar uma distinção nos perfis ionômicos ao comparar indivíduos do grupo controle e os pacientes bipolares. Além disso, os diferentes tratamentos (utilizando lítio ou não) também proporcionaram alterações no perfil ionômico das amostras, de modo que os íons diferenciais encontrados (As, B, Cl, Cr, Fe, K, Li,

Mg, P, S, Se, Si, Sr e Zn) podem vir a ser futuramente avaliados como marcadores potenciais para o transtorno afetivo bipolar e/ou seu tratamento com lítio.

A LA-ICP-MS é uma técnica potente para detectar proteínas ligadas a metais, previamente separadas por eletroforese em gel. Esta técnica pode ser empregada em diferentes modos de operação, fornecendo uma análise de alta resolução (modo de imagem) ou uma varredura rápida de todo o gel (modos de varredura em linha ou análise micro local dos *spots*), que é muito útil na comparação de géis de amostras submetidas a diferentes condições ou estados de saúde, como no caso do presente trabalho, onde pacientes bipolares tratados com lítio ou não foram comparados entre si e também com indivíduos controle.

A estratégia metaloproteômica empregando a combinação de PAGE-LA-ICP-MS e MALDI-TOF MS/MS gerou dados complementares que permitiram observar uma diferenciação em termos de metais ligados a proteínas de soro para cada um dos grupos estudados, controle e pacientes bipolares tratados com lítio ou não. Os principais metais ligados a proteínas que sofreram as maiores alterações na presença do transtorno afetivo bipolar e de seu tratamento com lítio foram Ca, Co, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ti e Zn. Oito proteínas diferentes (e algumas de suas isoformas) contendo metais ligados foram identificadas, com destaque para a apolipoproteína A-I, a transtiretina e a vitronectina, que haviam sido identificadas previamente nas análises proteômicas por apresentarem alterações em suas expressões.

Com base nos resultados deste trabalho exploratório, podem ser guiadas pesquisas futuras envolvendo a descoberta de biomarcadores iônicos e metaloprotéicos para o transtorno afetivo bipolar e/ou seu tratamento com lítio.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] L Banci, *Molecular dynamics simulations of metalloproteins*, **Curr Opin Chem Biol** 7 (2003) 143-149,

[2] YX Gao, CY Chen, ZF Chai, *Advanced nuclear analytical techniques for metalloproteomics*, **J Anal Atom Spectrom** 22 (2007) 856-866.

[3] Y Gao, C Chen, P Zhang, Z Chai, W He, Y Huang, *Detection of metalloproteins in human liver cytosol by synchrotron radiation X-ray fluorescence after sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, **Anal Chim Acta** 485 (2003) 131-137.

[4] VL Herald, JL Heazlewood, DA Day, AH Millar, *Proteomic identification of divalent metal cation binding proteins in plant mitochondria*, **FEBS Lett** 537 (2003) 96-100.

[5] JS Garcia, CS Magalhães, MAZ Arruda, *Trends in metal-binding and metalloprotein analysis*, **Talanta** 69 (2006) 1-15.

[6] H Stutz, G Bordin, AR Rodriguez, *Separation of selected metal-binding proteins with capillary zone electrophoresis*, **Anal Chim Acta** 477 (2003) 1-19.

[7] H Haraguchi, *Metallomics as integrated biometal science*, **J Anal At Spectrom** 19 (2004) 5-14.

[8] J Bettmer, *Metalloproteomics: a challenge for analytical chemists*, **Anal Bioanal Chem** 383 (2005) 370-371.

[9] WP Blackstock, MP Weir, *Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins*, **Trends Biotechnol** 17 (1999) 121-127.

[10] N Jakubowski, R Lobinski, L Moens, *Metallobiomolecules. The basis of life, the challenge of atomic spectroscopy*, **J Anal At Spectrom** 19 (2004) 1-4.

[11] J Szpunar, *Metallomics: a new frontier in analytical chemistry*, **Anal Bioanal Chem** 378 (2004) 54-56.

[12] S Mounicou, J Szpunar, R Lobinski, *Metallomics: the concept and methodology*, **Chem Soc Rev** 38 (2009) 1119-1138.

[13] R Lobinski, D Schaumlöffel, J Szpunar, *Mass spectrometry in bioinorganic analytical chemistry*, **Mass Spectrom Rev** 25 (2006) 255-289.

[14] JS Becker, N Jakubowski, *The synergy of elemental and biomolecular mass spectrometry: new analytical strategies in life sciences*, **Chem Soc Rev** 38 (2009) 1969-1983.

[15] M Wang, WY Feng, YL Zhao, ZF Chai, *ICP-MS-based strategies for protein quantification*, **Mass Spectrom Rev**, in press.

[16] A Sanz-Medel, M Montes-Bayón, MRF de la Campa, JR Encinar, J Bettmer, *Elemental mass spectrometry for quantitative proteomics*, **Anal Bioanal Chem** 390 (2008) 3-16.

[17] SF Boulyga, V Loreti, J Bettmer, KG Heumann, *Application of SEC-ICP-MS for comparative analyses of metal-containing species in cancerous and healthy human thyroid samples*, **Anal Bioanal Chem** 380 (2004) 198-203.

[18] A Sussulini, JS Garcia, MAZ Arruda, *Microwave-assisted decomposition of polyacrylamide gels containing metalloproteins using mini-vials: an auxiliary tool for metallomics studies*, **Anal Biochem** 361 (2007) 146-148.

[19] JS Becker, R Lobinski, JS Becker, *Metal-imaging in non-denaturing 2D electrophoresis gels by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS) for the detection of metalloproteins*, **Metallomics** 1 (2009) 312-316.

[20] JS Becker, M Zoriy, C Pickhardt, M Przybylski, JS Becker, *Investigation of Cu-, Zn- and Fe-containing human brain proteins using isotopic-enriched tracers by LA-ICP-MS and MALDI-FT-ICR-MS*, **Int J Mass Spectrom** 242 (2005) 135-144.

[21] L Tastet, D Schaumlöffel, R Lobinski, *ICP-MS-assisted proteomics approach to the identification of selenium-containing proteins in selenium-rich yeast*, **J Anal At Spectrom** 23 (2008) 309-317.

[22] JS Becker, M Zoriy, VL Dressler, B Wu, JS Becker, *Imaging of metals and metal-containing species in biological tissues and on gels by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS): A new analytical strategy for applications in life sciences*, **Pure Appl Chem** 80 (2008) 2643-2655.

[23] JS Becker, SF Boulyga, C Pickhardt, J Becker, S Buddrus, M Przybylski, *Determination of phosphorus in small amounts of protein samples by ICP-MS*, **Anal Bioanal Chem** 375 (2003) 561-566.

[24] A Sussulini, JS Garcia, MF Mesko, DP Moraes, EMM Flores, CA Pérez, MAZ Arruda, *Evaluation of soybean seed protein extraction focusing on metalloprotein analysis*, **Microchim Acta** 158 (2006) 173-180.

[25] S Mounicou, R Lobinski, *Challenges to metallomics and analytical chemistry solutions*, **Pure Appl Chem** 80 (2008) 2565-2575.

[26] A Raab, B Pioselli, C Munro, J Thomas-Oates, J Feldmann, *Evaluation of gel electrophoresis conditions for the separation of metal-tagged proteins with subsequent laser ablation ICP-MS detection*, **Electrophoresis** 30 (2009) 303-314.

[27] MS Jiménez, MT Gomez, L Rodriguez, L Martinez, JR Castillo, *Some pitfalls in PAGE-LA-ICP-MS for quantitative elemental speciation of dissolved organic matter and metallomics*, **Anal Bioanal Chem** 393 (2009) 699-707.

[28] PJ Parsons, F Barbosa Jr, *Atomic spectrometry and trends in clinical laboratory medicine*, **Spectrochim Acta** 62 (2007) 992-1003.

[29] A Shevchenko, M Wilm, O Vorm, M Mann, *Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels*, **Anal Chem** 68 (1996) 850-858.

[30] J Mendels, **Conceitos de Depressão**, Livros Técnicos e Científicos Editora Ltda., Rio de Janeiro (1972).

[31] WJ Walsh, LB Glab, ML Haakenson, *Reduced violent behavior following biochemical therapy*, **Physiol Behav** 82 (2004) 835-839.

[32] G Nowak, A Zieba, D Dudek, M Krósniak, M Szymaczek, M Schlegel-Zawadzka, *Serum trace elements in animal models and human depression. Part I: Zinc*, **Human Psychopharmacol** 14 (1999) 83-86.

[33] M Maes, E Vandoolaeghe, H Neels, P Demedts, A Wauters, HY Meltzer, C Altamura, R Desnyder, *Lower serum zinc in major depression is a sensitive marker of treatment resistance and of the immune/inflammatory response in that illness*, **Biol Psychiatry** 42 (1997) 349-358.

[34] B Bocca, A Alimont, G Bomboi, F Giubilei, G Forte, *Alterations in the level of trace metals in Alzheimer's disease*, **Trace Elem Electrolytes** 23 (2006) 270-276.

[35] WB Clarke, R Guscott, RM Lindstrom RM, *Binding of lithium and boron to human plasma proteins II – Results for a bipolar patient not on lithium therapy*, **Biol Trace Elem Res** 97 (2004) 117-124.

# CONCLUSÕES FINAIS

No presente trabalho de Tese, os perfis de metabólitos, proteínas e íons metálicos (livres ou complexados com proteínas) foram avaliados em amostras de soro sangüíneo de modo a observar alterações na presença do transtorno afetivo bipolar e seu tratamento com lítio.

As possíveis limitações deste estudo consistiram no número de amostras e no controle de alguns parâmetros, como a média de idades e a porcentagem de fumantes, entre os grupos. Entretanto, mesmo com estas limitações, foi possível observar padrões metabólicos, protéicos, iônicos e metaloprotéicos distintos entre os grupos estudados, onde as amostras pertencentes ao mesmo grupo apresentaram comportamentos similares, evidenciando a robustez das metodologias propostas. Além disso, o presente estudo possui caráter exploratório, não tendo a pretensão de apontar biomarcadores definitivos para o transtorno afetivo bipolar e seu tratamento com lítio, mas sim apontar biomarcadores potenciais.

No Capítulo 1, a análise do perfil metabonômico das amostras de soro, realizada com a combinação dos dados obtidos por $^{1}$H RMN e análise quimiométrica (PLS-DA), permitiu distinguir os indivíduos saudáveis (grupo controle) dos pacientes com transtorno afetivo bipolar, bem como os pacientes bipolares também puderam ser diferenciados de acordo com o tratamento, utilizando lítio ou não. A validação do modelo quimiométrico proposto foi realizada e a previsão das amostras do conjunto de validação em cada um dos grupos estudados foi precisa. A partir dos deslocamentos químicos observados nos espectros de $^{1}$H RMN, os metabólitos diferenciais entre os três grupos puderam ser identificados. Tais metabólitos consistem em lipídeos de glicoproteínas, lipídeos mono e poliinstaurados, e moléculas relacionadas ao metabolismo de lipídeos (acetato, colina, glutamato e *mio*-inositol).

No Capítulo 2, a avaliação do perfil protéico das mesmas amostras de soro sangüíneo foi também realizada, empregando duas técnicas analíticas independentes (SELDI-TOF MS e 2-D DIGE associada à MALDI-TOF MS/MS). A

partir dos resultados obtidos, foi possível identificar uma alteração significante nos níveis da apolipoproteína A-I, sendo que esta proteína foi sub-expressa em pacientes bipolares, independentemente do tratamento, mas que apresentou uma restauração ao nível do grupo controle após o tratamento com lítio. Tal comportamento foi também verificado por meio da quantificação da apolipoproteína A-I por imunoturbidimetria, que é um método de análise clínica de rotina, utilizado em hospitais. De acordo com as informações a respeito da função desta proteína e com as observações obtidas experimentalmente, foi possível formular a hipótese de que o metabolismo de lipídeos deve contribuir para os mecanismos patológicos que resultam no fenótipo do transtorno afetivo bipolar, bem como no mecanismo de ação do lítio como tratamento, de modo que se fazem necessárias investigações futuras a respeito do papel da apolipoproteína A-I na patofisiologia do transtorno afetivo bipolar.

Além da apolipoproteína A-I, a transtiretina e a alfa-1-antitripsina, que são proteínas de fase aguda, foram identificadas como sendo diferenciais entre os grupos estudados. Ao comparar o comportamento destas proteínas descrito neste trabalho com aquele descrito na literatura para pacientes esquizofrênicos, observou-se que a transtiretina mostrou uma variação diferencial em seus níveis, podendo vir a ser estudada como um marcador diferencial entre pacientes tratados que possuem estes transtornos psiquiátricos.

No Capítulo 3, foi observada uma distinção nos perfis ionômicos ao comparar indivíduos do grupo controle e os pacientes com transtorno afetivo bipolar a partir das análises das amostras de soro por ICP-MS. Além disso, os diferentes tratamentos (utilizando lítio ou não) também proporcionaram alterações no perfil ionômico das amostras, de modo que os íons diferenciais encontrados (As, B, Cl, Cr, Fe, K, Li, Mg, P, S, Se, Si, Sr e Zn) podem vir a ser avaliados como marcadores potenciais para o transtorno afetivo bipolar e/ou seu tratamento com lítio.

Os estudos metaloproteômicos, empregando a combinação de PAGE-LA-ICP-MS e MALDI-TOF MS/MS, também permitiram observar uma diferenciação em termos de metais ligados a proteínas de soro para cada um dos grupos

estudados, controle e pacientes bipolares tratados com lítio ou não. Os principais metais ligados a proteínas que sofreram alterações na presença do transtorno afetivo bipolar e de seu tratamento com lítio foram Ca, Co, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ti e Zn. Foram identificadas oito proteínas diferentes (e algumas de suas isoformas) contendo metais ligados, destacando-se a apolipoproteína A-I, a transtiretina e a vitronectina, que haviam sido identificadas previamente nas análises proteômicas por apresentarem alterações em suas expressões.

Assim, este trabalho abre novas perspectivas para a determinação de mecanismos patofisiológicos implicados no transtorno afetivo bipolar e para o entendimento da ação terapêutica do lítio. Além disso, os resultados obtidos representam um avanço na busca de biomarcadores para o transtorno afetivo bipolar, que poderiam vir a desempenhar no futuro, inclusive, um papel diagnóstico para a doença.

# ANEXOS

## ANEXO 1
## Características dos indivíduos do Grupo A

| Amostra | Idade | Sexo | Medicações | Dose / mg | Tempo de tratamento | Fumante | Histórico de depressão | Observações | Dia da coleta |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1A | 25 | F | Desogestrel e Etinilestradiol | 125 e 20 | 2 meses | N | S | Usou fluoxetina e imipramina | 12.07.07 |
| 2A | 24 | M | N | 0 | 0 | N | N | Teve tuberculose há 2 anos | 12.07.07 |
| 3A | 27 | M | N | 0 | 0 | N | N | 0 | 12.07.07 |
| 4A | 25 | M | N | 0 | 0 | N | N | 0 | 12.07.07 |
| 5A | 29 | F | Fluoxetina | 20 | 18 meses | N | S | 0 | 12.07.07 |
| 6A | 29 | F | N | 0 | 0 | N | N | 0 | 30.01.08 |
| 7A | 26 | M | N | 0 | 0 | N | N | 0 | 30.01.08 |
| 8A | 26 | M | N | 0 | 0 | N | N | 0 | 30.01.08 |
| 9A | 31 | F | N | 0 | 0 | N | N | 0 | 30.01.08 |
| 10A | 28 | M | N | 0 | 0 | N | N | 0 | 30.01.08 |
| 11A | 27 | F | Desogestrel e Etinilestradiol | 125 e 20 | 8 anos | N | S | Usou Citalopram | 05.03.08 |
| 12A | 23 | F | N | 0 | 0 | N | N | 0 | 05.03.08 |
| 13A | 28 | M | N | 0 | 0 | N | N | 0 | 05.03.08 |
| 14A | 42 | M | N | 0 | 0 | N | N | Usou Carbamazepina por 15 anos | 01.04.08 |
| 15A | 30 | F | Vitamina B12, B6, B1 e Diclofenaco de Sódio | 1000 mcg, 50, 50 e 50 | 15 dias | N | N | 0 | 01.04.08 |
| 16A | 26 | F | Tetraciclina e Limeciclina | 150 | 3 dias | N | N | 0 | 01.04.08 |
| 17A | 38 | M | N | 0 | 0 | N | N | 0 | 01.04.08 |
| 18A | 26 | M | N | 0 | 0 | N | N | Irmã bipolar | 01.04.08 |
| 19A | 27 | F | Citalopram e Etinilestradiol | 40 e 20 | 1 ano e 3 anos | N | S | 0 | 04.04.08 |
| 20A | 29 | M | N | 0 | 0 | N | N | 0 | 04.04.08 |
| 21A | 28 | F | Omeprazol | 40 | 2 anos | N | N | Tem gastrite | 11.04.08 |
| 22A | 28 | F | N | 0 | 0 | N | N | 0 | 11.04.08 |
| 23A | 29 | M | N | 0 | 0 | N | N | 0 | 11.04.08 |
| 24A | 19 | F | N | 0 | 0 | N | N | 0 | 11.04.08 |
| 25A | 36 | F | N | 0 | 0 | N | N | 0 | 11.04.08 |

## ANEXO 2
## Características dos indivíduos do Grupo B

| Amostra | Idade | Sexo | Medicações | Dose / mg | Fumante | Tempo de diagnose | Tempo de tratamento | Outras doenças | Observações | Dia da coleta |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1B | 33 | F | Li e Carbamazepina | 600 e NR | N | 44 meses | 2 anos | N | Usou Fluoxetina e Haloperidol | 18.05.07 |
| 2B | 21 | F | Li e Olanzapina | 900 e 5 | N | 2 anos | 2 anos | N | Usou Risperidona | 18.05.07 |
| 3B | 46 | F | Li, Ácido Valpróico e Tiroxina | 900, 1250 e NR | N | 28 anos | 20 anos | Hipotireoidismo | Usou Haloperidol | 25.05.07 |
| 4B | 18 | M | Li e Ácido valpróico | 1050 e 1000 | N | 15 meses | 1 ano | N | Usou Olanzapina | 25.05.07 |
| 5B | 61 | F | Li, Olanzapina e Clonazepam | 600, 5 e 2 | N | 4 anos | 1 mês | N | Usou Triptanol | 25.05.07 |
| 6B | 41 | F | Li | 1050 | N | 6 anos | 6 meses | N | Usou Fluoxetina e Haloperidol; parou de fumar há 5 anos | 06.06.07 |
| 7B | 43 | M | Li e Risperidona | 1650 e 3 | N | 3 anos | NR | N | Usou Clonazepam | 13.06.07 |
| 8B | 53 | F | Li | 1200 | N | 15 anos | 10 anos | N | Usou Olanzapina, Clonazepam, Triptanol e Bromazepam | 22.06.07 |
| 9B | 56 | M | Li, Fluoxetina e Clonazepam | 600, 1 e 2 | N | 5 meses | 5 meses | Glaucoma | Pai e mãe são primos; pai, tia e 2 irmãs bipolares | 29.06.07 |
| 10B | 35 | F | Li | 900 | N | NR | 4 anos | N | Usou Haloperidol e Diazepam | 06.07.07 |
| 11B | 41 | M | Li, Diazepam, Biperideno e Clorpromazina | 450, NR, NR e NR | S | 19 anos | 19 anos | N | Teve hepatite B há 6 anos e pneumonia há 5 anos (2 vezes); mãe, irmãos e outros parentes bipolares | 17.08.07 |
| 12B | 22 | F | Li e Clonazepam | NR | S | NR | NR | N | Usou Diazepam | 17.08.07 |
| 13B | 49 | F | Li e Lorazepam | 1050 e 4 | S | 3 anos | 3 anos | N | Teve melanoma há 10 anos e edema na perna | 17.08.07 |
| 14B | 33 | M | Li | 1200 | S | 2 anos | 2 anos | N | Usou Olanzapina e Clonazepam | 12.09.07 |
| 15B | 49 | M | Li, Risperidona e Ácido Valpróico | 600, 3 e 250 | N | NR | 2 meses | N | Teve trombose e infecção pulmonar; usou Diazepam e Haloperidol | 14.09.07 |

## ANEXO 3
## Características dos indivíduos do Grupo C

| Amostra | Idade | Sexo | Medicações | Dose / mg | Fumante | Tempo de diagnose | Tempo de tratamento | Outras doenças | Observações | Dia da coleta |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1C | 36 | F | Risperidona, Clonazepam, Fluoxetina e Diazpeam | NR[1] | N | 9 meses | 1 mês | N | Teve problemas na tireóide há 2 anos; usa antiinflamatórios | 27.06.07 |
| 2C | 68 | F | Carbamazepina, Ácido Valpróico e Diazepam | NR | N | 20 anos | 5 anos | Hipertensão, colesterol alto e diabetes | N | 15.10.07 |
| 3C | 30 | M | Ácido Valpróico | 750 | S | 2 anos | 3 meses | N | Usou Li | 19.10.07 |
| 4C | 20 | F | Ácido Valpróico | 250 | N | 4 anos | 3 anos | Gastrite | Usa Omeprazol; usou Li | 22.10.07 |
| 5C | 57 | F | Ácido Valpróico | NR | N | 3 anos | 3 anos | N | N | 24.10.07 |
| 6C | 50 | F | Quetiapina | 50 | S | 12 anos | 2 meses | Hipertensão, colesterol alto e diabetes | Usa Captopril; usou Carbamazepina | 07.11.07 |
| 7C | 22 | M | Ácido Valpróico e Lamotrigina | 500 e NR | N | 3 anos | 2 meses | N | Usou Li (3 anos atrás), Haloperidol, Rispidol e Olanzapina | 09.11.07 |
| 8C | 51 | F | Ácido Valpróico e Clonazepam | 1250 e 0,25 | N | 19 anos | 10 anos | N | Usou Li | 09.11.07 |
| 9C | 55 | F | Ácido Valpróico, Clonazepam e Olanzapina | 1250, 0,5 e 5 | N | 8 anos | 6 meses | N | Usou Li por 6 anos, teve intoxicação por Li há 6 meses | 28.11.07 |
| 10C | 26 | M | Ácido Valpróico e Citalopram | 625 e 30 | N | 9 anos | 1 mês | N | Usou Li (4 anos atrás) e Olanzapina | 21.12.07 |

[1] Não houve resposta para esta pergunta