



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA**

ELISA CASTAÑEDA SANTA CRUZ

**ESTUDO METALÔMICO E PROTEÔMICO EM AMOSTRAS DE SORO
DE PACIENTES COM TRANSTORNO BIPOLAR E ESQUIZOFRENIA E AS
ASSOCIAÇÕES COM OS TRATAMENTOS**

**CAMPINAS
2020**

ELISA CASTAÑEDA SANTA CRUZ

**ESTUDO METALÔMICO E PROTEÔMICO EM AMOSTRAS DE SORO
DE PACIENTES COM TRANSTORNO BIPOLAR E ESQUIZOFRENIA E AS
ASSOCIAÇÕES COM OS TRATAMENTOS**

Tese de Doutorado apresentada ao Instituto de Química da
Universidade Estadual de Campinas como parte dos
requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutora em
Ciências.

Orientadora: Profa. Dra. Alessandra Sussulini

**O arquivo digital corresponde à versão final da Tese defendida pela aluna Elisa
Castañeda Santa Cruz e orientada pela Profa. Dra. Alessandra Sussulini.**

**CAMPINAS
2020**

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Química
Simone Luiz Alves - CRB 8/9094

Santa Cruz, Elisa Castañeda, 1986-
Sa59e Estudo metalômico e proteômico em amostras de soro de pacientes com transtorno bipolar e esquizofrenia e as associações com os tratamentos / Elisa Castañeda Santa Cruz. – Campinas, SP : [s.n.], 2020.

Orientador: Alessandra Sussulini.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Metalômica. 2. Proteômica. 3. Marcadores biológicos. 4. Transtornos mentais. 5. Espectrometria de massa. I. Sussulini, Alessandra, 1981-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Metallomic and proteomic study in serum samples of patients with bipolar disorder and schizophrenia and the associations with treatments

Palavras-chave em inglês:

Metallomics

Proteomics

Biological markers

Mental disorders

Mass spectrometry

Área de concentração: Química Analítica

Titulação: Doutora em Ciências

Banca examinadora:

Alessandra Sussulini [Orientador]

Giuseppe Palmisano

Rachel Ann Hauser-Davis

Solange Cadore

Carlos Henrique Inacio Ramos

Data de defesa: 02-12-2020

Programa de Pós-Graduação: Química

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-1044-6191>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/5090237622528881>

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Alessandra Sussulini (Orientadora)

Prof. Dr. Giuseppe Palmisano (USP-SP)

Profa. Dra. Rachel Ann Hauser-Davis (Fiocruz - RJ)

Profa. Dra. Solange Cadore (IQ - Unicamp)

Prof. Dr. Carlos Henrique Inacio Ramos (IQ - Unicamp)

A Ata da defesa assinada pelos membros da Comissão Examinadora, consta no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

Este exemplar corresponde à redação final da Tese de Doutorado defendida pela aluna **ELISA CASTAÑEDA SANTA CRUZ**, aprovada pela Comissão Julgadora em 2 de dezembro de 2020.

Dedico este trabalho a toda minha família. Em especial aos meus sobrinhos Áaron e Micaela, espero, com humildade, poder influir neles no caminho da ciência.

*“Our doubts are traitors,
and make us lose the good we oft might win,
by fearing to attempt.”*

Measure for Measure *by William Shakespeare*

AGRADECIMENTO

Nada nunca é fácil, tudo exige esforço, dedicação e até sacrifício para conseguir o que se deseja. Seguir a vida acadêmica é, sem dúvida, o mais desafiador. Esse período que levei para fazer o doutorado foi marcado por muitos desafios que me ajudaram a amadurecer ainda mais minha forma de pensar. Hoje posso dizer que estou muito satisfeita com o que fiz nesta etapa, apesar que a Tese ter uma grande chance de não representar todo o trabalho que ela exigiu.

Agradeço a toda minha família, pela compreensão e apoio emocional durante todos esses anos cumprindo meus sonhos.

Ao meu quase noivo Fabrício e à família dele. Obrigada por ser meu parceiro e melhor amigo, por estar ao meu lado em todos os momentos mais estressantes e por saber me ouvir. Obrigado por me tornar uma pessoa melhor a cada dia e espero continuar crescendo junto onde seja.

Agradeço a quem foi orientadora do meu projeto de tese na UNI, a Prof^a. Dr^a. Ana C. Valderrama. A ela e a outros pelo treinamento e inspiração no início da carreira acadêmica.

Aos meus primeiros *home-mates* engenheiros de Campinas, Camila, Adrian, Lucas e Lenon, obrigada pela amizade, pelas comidinhas e pelos momentos que compartilhamos no tempo que vivemos juntos.

A Donizete F., Carlos L. y Matheus B., o trio de homens maravilhosos que conheci no Lab com quem partilhei muitos cafés filosóficos, *covers* e suportaram as minhas infinitas questões sobre a língua portuguesa. Eles sempre terão um espaço no meu coração.

Agradeço aos peruanos que conheci aqui, agora amigos para sempre. Wilner V., Carlos G., Edson G. e Paulo S., obrigado por me puxar das orelhas sempre que precisei, pelas visitas inesperadas e pelas conversas de apoio. Sei que sempre contarei com vocês!

Aos meus amigos da vida, Jesús (Xuxo) e Karla, que sempre me acompanharam e suportaram os meus dramas, aconselharam-me e ajudaram-me no que podiam.

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Alessandra Sussulini, sobretudo pela contínua paciência, por ter me proporcionado as colaborações e não menos importante, por ter me proporcionado indiretamente a oportunidade de me sentir novamente parte de um grupo.

À Dona Flávia S. cuja entrada no grupo foi essencial para mim, tanto pessoal como profissionalmente. Aprendi e continuo aprendendo sempre que converso com você, você é minha “Pepe Grillo” e referência de mulher lutadora, espero que nunca percamos o contato.

Às pequenas Naomi e Mariana, alunas de iniciação científica, que me deram a oportunidade de mostrar que posso passar alguns conhecimentos e que fazer ciência não é chato.

Aos demais colegas do grupo LABIOMICS, Aline, Luan, Luidy, Larissa, Henrique, Taynara e Emerson. Apesar de ter compartilhado pouco com vocês, aprendi com cada um.

Agradeço aos professores Dr. Marcos Zezzi e Dr. Wagner Fontes pela colaboração no desenvolvimento da minha tese.

Às meninas que conheci durante as colaborações, Katherine, Luana e Isabelle, que tornaram aqueles dias de trabalho pesado mais leves e compartilharam conhecimentos valiosos para mim.

Por fim, gostaria também de agradecer a todos do IQ da Unicamp, em especial aos funcionários da CPG, pela ajuda e apoio que sempre têm com quaisquer dúvidas relacionadas à pós-graduação.

Agradeço ao CNPq pela concessão da bolsa de doutorado no Brasil (Processo 141439 / 2016-5).

Agradeço à FAEPEX pelo auxílio ponte.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

O transtorno bipolar (TB) e a esquizofrenia (ESZ) são doenças mentais que afetam aproximadamente 1 % da população mundial e podem ter um impacto negativo para a sociedade em aspectos sociais e econômicos. Em termos de diagnóstico, ambas as doenças são classificadas separadamente de acordo com o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-5). No entanto, apresentam sobreposição de sintomas no diagnóstico, dificultando o tratamento. Diante disso, um dos desafios é realizar ou complementar o diagnóstico com informação clínica. Atualmente, alguns transtornos mentais têm sido abordados por estudos baseados em metalômica e proteômica utilizando diferentes matrizes. Assim, esta Tese consistiu em realizar análises globais de metais e proteínas em amostras de soro de pacientes com TB e ESZ com objetivo de identificar potenciais biomarcadores de resposta, e baseado nos resultados avaliar uma possível associação aos tratamentos empregados. Em termos do perfil metalômico, determinaram-se concentrações diferencialmente significativas dos elementos Fe, Zn e Se em ambas as doenças quando comparadas com o grupo controle e que são possivelmente afetadas durante o tratamento. As modulações das concentrações desses elementos foram relacionadas ao estresse oxidativo, podendo ser usado como indicador a razão Cu/Zn. Quanto ao perfil proteômico, encontraram-se 25 proteínas diferenciais estatisticamente significativas. Análises bioinformáticas mostraram que a maioria destas proteínas participam nas cascatas de complemento e coagulação, apresentando-se em níveis opostos entre as doenças. Esta mesma característica foi encontrada nas principais vias de sinalização do sistema imune e da hemostase. Além disso, uma análise das associações entre proteínas, vias metabólicas e doenças sugere uma intervenção terapêutica para a prevenção de riscos de comorbidades para TB e ESZ. Por fim, a proposta do uso de um método seletivo de dimetilação de cisteína oxidada para a quantificação de proteínas relacionadas ao estresse oxidativo foi otimizada. Em conclusão, as abordagens aplicadas destacaram a presença de estresse oxidativo e de processos de inflamação em ambas as doenças apesar do tratamento. Os resultados obtidos neste trabalho de Tese demonstram que as alterações nas concentrações de elementos e proteínas combinados podem proporcionar um maior entendimento da biologia molecular do TB e da ESZ, fornecendo uma visão holística relacionada aos seus mecanismos fisiopatológicos.

ABSTRACT

Bipolar disorder (BD) and schizophrenia (SCZ) are mental illnesses that affect approximately 1 % of the world population and can be a burden to society in social and economic aspects. In terms of diagnosis, both diseases are separately classified according to the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-5). However, they present overlapping symptoms in the diagnosis, making treatment difficult. Therefore, one of the challenges is to perform or complement the diagnosis with clinical information. Some mental disorders have been studied based on metallomics and proteomics approaches using different matrices. Thus, this Thesis consisted of performing a global analysis of metals and proteins in serum samples of patients with BD and SCZ, aiming to identify potential prognostic biomarkers. Based on the results, to evaluate a possible association with the employed treatments. In terms of the metallomic profile, Fe, Zn, and Se were determined as significantly differential for both diseases compared to the healthy group; moreover, these metals are possibly modulated during treatment. Concentration imbalances of these elements were related to oxidative stress, and the Cu/Zn ratio can be used as an indicator. As for the proteomic profile, 25 significantly differential proteins were found. Bioinformatics analysis demonstrated that most of these proteins participate mainly in the complement and coagulation cascades, with opposite expressions between diseases. This same characteristic was found for the immune system and hemostasis main metabolic pathways. Furthermore, an analysis of the associations among proteins, metabolic pathways, and diseases suggested a therapeutic intervention to prevent comorbidity risks for BD and SCZ. Finally, the proposal for using a selective method for dimethylation of oxidized cysteine quantification of proteins related to oxidative stress has been optimized and is currently available. In conclusion, the applied approaches highlighted ongoing oxidative stress and inflammation processes in both diseases despite treatment. Altogether, the result obtained in this Thesis demonstrates that concentration/ abundance imbalances of the overlapping elements and proteins can provide a greater understanding of BD and SCZ molecular biology, originating new insights related to their pathophysiological mechanisms.

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

<i>2D-DIGE:</i>	<i>Eletroforese diferencial em gel bidimensional</i>
<i>AA:</i>	<i>Absorção atômica</i>
<i>ACN:</i>	<i>Acetonitrila</i>
<i>ADN:</i>	<i>Ácido desoxirribonucleico</i>
<i>AF:</i>	<i>Ácido fórmico</i>
<i>ANOVA:</i>	<i>Análise de variância</i>
<i>ANVISA:</i>	<i>Agência Nacional de Vigilância Sanitária</i>
<i>BSA:</i>	<i>Albumina de soro bovino</i>
<i>CC:</i>	<i>Componente celular</i>
<i>CEs:</i>	<i>Contagem de espectros</i>
<i>CS:</i>	<i>Controle saudável</i>
<i>CysDML:</i>	<i>Dimetilação seletiva de cisteína</i>
<i>DA:</i>	<i>Doença de Alzheimer</i>
<i>DAVID:</i>	<i>Database Annotation Visualization, and Integrated Discovery</i>
<i>DCV:</i>	<i>Doença cardiovascular</i>
<i>DDA:</i>	<i>Análise de dados dependentes</i>
<i>DP:</i>	<i>Desvio padrão</i>
<i>DSM-5:</i>	<i>Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais</i>
<i>DTT:</i>	<i>Ditiotreitol</i>
<i>ESI:</i>	<i>Ionização por electrospray</i>
<i>ESZ:</i>	<i>Esquizofrenia</i>
<i>FC:</i>	<i>Fold change</i>
<i>FCS:</i>	<i>Fluido cerebrospinal</i>
<i>Fe:</i>	<i>Ferro</i>
<i>FM:</i>	<i>Função molecular</i>
<i>FPLC:</i>	<i>Cromatografia líquida da proteína rápida</i>
<i>GO:</i>	<i>Gene Ontology</i>
<i>GPx:</i>	<i>Glutathione peroxidase</i>
<i>HCD:</i>	<i>Dissociação por colisão de alta energia</i>
<i>IAA:</i>	<i>Iodoacetamida</i>
<i>ICAT:</i>	<i>Marcação de afinidade codificada por isótopos</i>
<i>ICP-AES:</i>	<i>Espectrometria de emissão atômica com fonte de plasma acoplado indutivamente</i>
<i>ICP-MS:</i>	<i>Espectrometria de massas com fonte de plasma acoplado indutivamente</i>
<i>IMC:</i>	<i>Índice de massa corporal</i>
<i>IPP:</i>	<i>Interações proteína-proteína</i>
<i>iTRAQ:</i>	<i>Marcação isobárica para quantificação relativa e absoluta</i>
<i>KEGG:</i>	<i>Enciclopédia de Genes e Genomas Kyoto</i>
<i>LC:</i>	<i>Cromatografia líquida</i>
<i>LFQ:</i>	<i>Quantificação livre de marcadores</i>

Li:	Lítio
LOD:	Limite de detecção
LOQ:	Limite de quantificação
MDD:	Transtorno depressivo maior
MeOH:	Metanol
MetS:	Síndrome metabólica
MS:	Espectrometria de massas
NEM:	N-etilmaldeimida
Ni:	Níquel
nLC:	Nano cromatografia líquida
NMR:	Ressonância magnética nuclear
OLZ:	Olanzapina
OxCysDML:	Dimetilação seletiva de cisteína oxidada
PB:	Processo biológico
PBS:	Solução tampão fosfato-salino
PD:	Doença de Parkinson
PTMs:	Modificações pós-traducionais
QTOF:	Combinação de analisadores quadrupolo e tempo de voo
r:	Coeficiente de correlação
r ² :	Coeficiente de correlação da curva analítica
RNS:	Espécies reativas de nitrogênio
ROS:	Espécies reativas de oxigênio
RSS:	Espécies reativas de enxofre
SDS:	Dodecil sulfato de sódio
Se:	Selênio
SILAC:	Análise da razão de isótopos estáveis em aminoácidos em cultura de células
SNC:	Sistema nervoso central
SOD:	Superóxido dismutase
TB:	Transtorno bipolar
TBL:	Pacientes com transtorno bipolar tratados com lítio
TBN:	Pacientes com transtorno bipolar tratados com outros medicamentos, exceto lítio
TEAB:	Brometo de tetraetilamônio
TFA:	Ácido trifluoroacético
TMTs:	Tandem mass tags
TOF	Tempo de voo
Try:	Tripsina
u:	Unidade de massa atômica
UV-Vis:	Espectroscopia UV-visível
XIC:	Cromatograma de íon extraído
Y:	Ítrio
Zn:	Zinco

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1. Metais essenciais e a sua localização celular (26,37,38).....	28
Tabela 1.2. Metais estudados por diferentes técnicas e em diferentes matrizes	33
Tabela 1.3. Características dos participantes incluídos no estudo	37
Tabela 1.4. Parâmetros instrumentais utilizados na avaliação do perfil multielementar em amostras de soro por ICP-MS	38
Tabela 1.5. Métodos de preparo de amostras	40
Tabela 1.6. <i>p</i> -valor do teste- <i>t</i> entre os Métodos I, II e III.....	40
Tabela 1.7. Recuperação, limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) do método ($\mu\text{g L}^{-1}$) e coeficiente de correlação da curva analítica (r^2)	41
Tabela 1.8. Concentrações dos macro/microelementos quantificados nas amostras de soro	42
Tabela 1.9. Concentrações determinadas ($\mu\text{g L}^{-1}$) dos elementos determinados em 37 amostras de soro humano: TBL ($n = 7$), TBN ($n = 8$), CS ($n = 11$), e ESZ ($n = 11$)...42	42
Tabela 1.10. Análise estatística por ANOVA e teste <i>t</i> de Welch	43
Tabela 1.11. Relação entre Cu e Zn entre os grupos TBN, TBL, ESZ e CS.....	48
Tabela 1.12. Correlações de Pearson entre os níveis dos macro/microelementos para os grupos TBL e ESZ	52
Tabela 1.13. Correlações de Pearson entre os níveis dos macro/microelementos para os grupos TBN e CS	53
 Tabela 2.1. Estudo de biomarcadores em soro e plasma de pacientes com TB e ESZ	 62
Tabela 2.2. Características dos participantes incluídos no estudo	68
Tabela 2.3. Análise estatística por teste <i>t</i> e ANOVA.....	74
Tabela 2.4. Valores de <i>fold change</i> ($\log_2\text{FC}$) para as 25 proteínas diferenciais estatisticamente significativas	75
Tabela 2.5. Análise de enriquecimento de Gene Ontology para as 25 proteínas diferenciadas	80
Tabela 2.6. Análise de vias de sinalização por REACTOME	81

Tabela 2.7. Análise de agrupamentos (cluster) significativamente enriquecidos de proteínas com abundâncias alteradas entre os grupos TB e ESZ calculados por DAVID <i>Bioinformatics Resources</i> 6.8.....	83
--	----

Tabela 3.1. Lista de proteínas identificadas na fração de proteínas não ligadas à resina.....	111
--	-----

Tabela 3.2. Proteínas identificadas na fração das lavagens com tampão Tris/EDTA.....	112
---	-----

Tabela 3.3. Lista de proteínas identificadas na fração das lavagens com NaCl	113
---	-----

Tabela 3.4. Lista de proteínas identificadas na fração das lavagens com ACN/TFA.....	113
---	-----

Tabela 3.5. Proteína identificada na fração das lavagens com HAc.....	113
--	-----

Tabela 3.6. Proteína identificada na fração de eluição após marcação e lavagens com TEAB.....	114
--	-----

Tabela 3.7. Identificação e quantificação das replicatas da amostra Bipolar/Controle pelo método OxCysDML.....	116
---	-----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Modelo simplificado de um sistema biológico, mostrando a relação das ciências ômicas. M: metal. Adaptação de (29).	26
Figura 1.2. Exemplo de captação e trânsito de um íon metálico dentro de uma célula. MC: membrana celular; P: proteína; E: enzima. Adaptado de (30).	29
Figura 1.3. Gráficos <i>box-plot</i> para a concentração dos metais no soro (média $\pm$ DP; n = 37) e valor de <i>p</i> do teste <i>t</i> de Welch dentre os quatro grupos estudados em pares para (a) Se, (b) Zn e (c) Fe.....	44
Figura 1.4. Correlações de Pearson entre as concentrações de elementos, considerando o índice de massa corporal (IMC) entre os grupos: (a) ESZ e TBL (a diagonal inferior esquerda representa as correlações de elementos no grupo ESZ e a diagonal superior direita, no grupo TBL) e (b) CS e TBN (a diagonal inferior esquerda representa as correlações dos elementos no grupo CS e a diagonal superior direita, no grupo TBN).	51
 Figura 2.1. Marcação isotópica e isobárica (a) Quantificação isotópica por SILAC, (b) Kit comercial iTRAQ para quantificação isobárica. Esquema mostrando como ocorre a marcação e mistura das amostras após a reação química individual de cada amostra em diferente condição. NHS: grupo amino reativo.	58
Figura 2.2. Métodos de quantificação livre de marcadores. Baseada tanto pela contagem de espectros como cálculo de intensidade da área sob a curva (117).	59
Figura 2.3. Relação de abundâncias das proteínas entre os grupos.....	73
Figura 2.4. Perfil de abundância de proteínas diferenciais por Volcano plots: <i>p</i> -valor vs. $\log_2(FC)$. Volcano plot comparando os grupos: (a) TB e CS, (b) ESZ e CS, (c) TB e ESZ. Pontos vermelhos representam proteínas em maior abundância, enquanto os pontos verdes representam proteínas em menor abundância.	77
Figura 2.5. Classificação das proteínas diferencialmente abundantes identificadas em processos biológicos (BP) e vias nas quais participam, e sua quantidade relativa (%). (a) GO terms representados para a categoria BP e principais processos coloridos. A linha vertical indica um <i>p</i> -valor de 0,05. (b) Principais vias de sinalização alteradas determinadas pelo REACTOME.....	82

Figura 2.6. Interactoma de ESZ e TB: interactoma de ambos os transtornos psiquiátricos é mostrada como um gráfico, onde as proteínas* são mostradas como nodos e as IPPs como bordas conectando os nodos. Nodos coloridos de acordo com $\log_2(FC)$ determinados para ESZ/TB: nodos verdes proteínas com menor abundância, enquanto vermelhos para proteínas com maior abundância. IPP: interação proteína-proteína. *Proteínas listadas na Tabela 2.3 , exceto IGLC6. Gráfico obtido pelo app Sting do Cytoscape.	85
Figura 2.7. Relação entre enriquecimento das proteínas diferenciadas, vias, termos GO, doenças e fármacos. A análise de associação funcional foi realizada por ToppCluster. Hexágono vermelho: proteína diferenciada.	88
Figura 2.8. Estrutura molecular de (a) olanzapina e (b) clozapina.	89
 Figura 3.1. Modificações pós-traducionais (PTMs) oxidativas das proteínas que possuem grupo tiol da cisteína frente aos níveis das espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS). Adaptação de (235).....	95
Figura 3.2. Estrutura do reagente ICAT. Adaptação de (267).....	98
Figura 3.3. (a) Mecanismo de reação da marcação por dimetilação, (b) esquema de marcação “leve” e “pesada”, com o deslocamento de massa.....	100
Figura 3.4. Representação do workflow para o método de dimetilação da cisteína oxidada (OxCysDML). Adaptação da referência (275).....	102

SUMÁRIO

Introdução geral e justificativa.....	20
CAPÍTULO 1	
Associação entre macro/microelementos no soro de pacientes com transtorno bipolar e esquizofrenia considerando os efeitos do tratamento	23
1. Revisão bibliográfica.....	24
1.1. Elementos essenciais.....	24
1.2. Metalômica.....	25
1.3. Técnicas analíticas empregadas em metalômica.....	29
1.4. Estudos metalômicos em doenças neuropsiquiátricas.....	31
2. Objetivo.....	34
2.1. Objetivo geral	34
2.2. Objetivos específicos	34
3. Parte experimental.....	35
3.1. Materiais e reagentes.....	35
3.1.1. Equipamentos e materiais	35
3.1.2. Reagentes	35
3.2. Metodologia.....	35
3.2.1. Participantes do estudo	35
3.2.2. Coleta e armazenamento das amostras	36
3.2.3. Instrumentação e análise multielementar	37
3.2.4. Análises estatísticas	38
4. Resultados e discussões	39
4.1. Otimização do método	39
4.2. Determinação de elementos nas amostras de soro	41
4.2.1. Análises estatísticas	43
4.2.2. Correlação das concentrações dos elementos entre pacientes e controles	49
5. Conclusões parciais.....	54

CAPÍTULO 2

Estudo proteômico livre de marcadores em amostras de soro de pacientes com transtorno bipolar e esquizofrenia sob tratamento	55
1. Revisão bibliográfica.....	56
1.1 Proteômica	56
1.1.1. Quantificação por marcação	57
1.1.2. Quantificação livre de marcadores (LFQ)	58
1.2. Estudos proteômicos em transtornos psiquiátricos	60
1.3. Relação do sistema imunológico com TB e ESZ	63
2. Objetivo.....	65
2.1. Objetivo geral	65
2.2. Objetivos específicos	65
3. Parte experimental.....	66
3.1. Materiais e reagentes.....	66
3.1.1. Equipamentos e materiais	66
3.1.2. Tampões e soluções.....	67
3.2. Metodologia.....	67
3.2.1. Participantes do estudo	67
3.2.2. Coleta de amostras e armazenamento	68
3.2.3. Depleção e quantificação de proteínas.....	68
3.2.4. Digestão com tripsina	69
3.2.5. Dessalinização.....	70
3.2.6. Análises por espectrometria de massas	70
3.2.7. Identificação de proteínas.....	71
3.2.8. Análises estatísticas e de classificação	71
3.2.9. Anotação funcional e análise de enriquecimento de vias de sinalização	72
4. Resultados e discussões	73
4.1. Análises estatísticas e de classificação.....	73
4.2. Anotação funcional e análise de enriquecimento de vias de sinalização	79
5. Conclusões parciais.....	90

CAPÍTULO 3

Estudos de proteômica redox – marcação por dimetilação seletiva de cisteína oxidada (OxCysDML)	92
---	-----------

1. Revisão bibliográfica.....	93
1.1. Estresse oxidativo	93
1.2. Proteômica redox	94
1.3. Estresse oxidativo em transtorno bipolar e esquizofrenia	96
1.4. Técnicas analíticas aplicadas para a quantificação de proteínas redox	97
1.4.1. Dimetilação de cisteína oxidada (OxCysDML).....	100
2. Objetivos.....	103
2.1. Objetivo geral	103
2.2. Objetivos específicos	103
3. Parte Experimental	104
3.1. Materiais e reagentes.....	104
3.1.1. Equipamentos e materiais	104
3.1.2. Tampões e soluções.....	104
3.2. Metodologia.....	105
3.2.1. Otimização e aplicação do método OxCysDML.....	105
3.2.2. Depleção e quantificação de proteínas.....	105
3.2.3. NEM – bloqueio e precipitação de proteínas com acetona.....	106
3.2.4. Digestão com tripsina	106
3.2.5. Redução de peptídeos e enriquecimento na resina.....	106
3.2.6. Dimetilação na resina	107
3.2.7. Eluição e bloqueio dos tióis livres	108
3.2.8. Análises por espectrometria de massas	108
3.2.9. Análise de dados	109
4. Resultados e discussão	109
4.1. Otimização do método OxCysDML	109
5. Conclusões parciais.....	117
 Considerações finais	 118
Referências	121
ANEXO.....	149

Introdução geral e justificativa

O transtorno bipolar (TB) e a esquizofrenia (ESZ) são doenças mentais que afetam aproximadamente 1 % da população mundial. Estudos da Organização Mundial da Saúde (OMS) mostram que 1 % das pessoas que desenvolvem estas doenças podem vir a óbito ou são classificados como incapazes de contribuir para a sociedade, tendo assim, um impacto negativo tanto no ponto de vista social quanto do econômico (1–3).

No Brasil, o TB é uma doença psiquiátrica que afeta mais de 1 % da população. Conhecida também como transtorno afetivo bipolar, esta doença é caracterizada por eventos episódicos ao longo da vida, com um curso variável, sendo que as perturbações de humor ou afetivas podem ser positivas (mania ou hipomania) ou negativas (depressão). Estas alternâncias de distúrbios do humor e do nível de energia muitas vezes podem resultar em um comprometimento funcional e cognitivo, reduzindo a qualidade de vida dos pacientes. Uma das características principais da progressão da doença são duas fases de humor bem definidas, que oscilam entre si: a mania e a depressão. Entretanto, os fatores desencadeadores do TB ainda não são bem conhecidos. Alguns estudos recentes indicam que padrões bioquímicos, genéticos e ambientais podem desencadear a doença (4,5).

A prevalência estimada para a ESZ no país em 2015 foi de 0,8 % (6). É uma síndrome crônica de etiologia desconhecida, definida predominantemente por sinais de psicose. O distúrbio tem início, tipicamente, no final da adolescência ou início da idade adulta e inclui sintomas positivos, negativos, afetivos e cognitivos (7). Seu diagnóstico, geralmente, é realizado com base na presença de sintomas positivos em conjunto com a função social prejudicada, concomitantemente com a ausência de sintomas significativos de humor, de outras doenças neurológicas reconhecíveis, ou uso de substâncias que podem explicar os sintomas psicóticos (8).

De acordo com o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-5), essas doenças são classificadas separadamente. Entretanto, existe uma dificuldade na área clínica em discriminar estas doenças dada a sobreposição de sintomas da depressão (depressão particularmente psicótica), esquizofrenia, distúrbios esquizoafetivo e transtorno bipolar (9). Neste contexto, um “diagnóstico incorreto” pode ter implicações no tratamento, dado que o tratamento considerado

ideal para cada categoria principal de doença mental vai mudando no curso da progressão da doença. Além disso, essa inabilidade de discriminar a sintomatologia pode gerar efeitos adversos ou resultados negativos, tanto comportamentais quanto, em sintomas secundários. Como consequência, estes pacientes recebem múltiplos diagnósticos ao longo da vida.

Diante da não-especificidade, mencionadas anteriormente, o estudo e a determinação de biomarcadores específicos de diagnóstico pode ser particularmente útil para a diferenciação entre ESZ e TB proporcionando tratamentos com resultados de maior eficácia. Além disso, podem gerar conhecimento para a discriminação de outras doenças mentais importantes, especialmente no início do curso da doença (prognóstico), até a possibilidade de permitir a prevenção precoce das mesmas (10,11).

Em relação aos tratamentos convencionais, vários medicamentos são indicados e aprovados no presente cenário pela ANVISA, os quais são comumente usados no tratamento de ambos os transtornos, especialmente antipsicóticos. Esta classe de medicamentos é particularmente estudada em pacientes com ESZ, os quais apresentam relatos de efeitos colaterais, como, por exemplo, ganho de peso e desregulação do metabolismo da glicose (12,13).

Por serem doenças multifatoriais e envolverem em particular classes diferentes de biomoléculas, alguns estudos para a compreensão de transtornos mentais vêm sendo desenvolvidos por meio de análises proteômicas e metalômicas utilizando diferentes matrizes, como tecido cerebral (14,15), fluido cerebrospinal (16,17) e sangue (18,19). Dentre os eventos biológicos estudados nestas abordagens, o estudo de marcadores de estresse oxidativo é bastante avançado dada a sua associação na progressão e evolução destas doenças. Até hoje, têm sido identificadas biomoléculas e íons metálicos que podem ser considerados característicos das doenças; por exemplo, no caso de pacientes com TB, há relatos indicando que ocorrem alterações nas enzimas antioxidantes, na peroxidação de lipídeos e nos níveis de óxido nítrico (20). Em contrapartida, nos pacientes com ESZ, ocorre a diminuição de antioxidantes e/ou aumento na produção de espécies reativas que geram dano oxidativo aos lipídeos celulares, enzimas, carboidratos e DNA (21). De maneira similar, são estudados íons metálicos como Fe, Cu e Zn, os quais estão

relacionados com o estresse oxidativo em outras doenças neurodegenerativas, como Alzheimer e Parkinson (22).

Este trabalho de Tese está dividido em três capítulos empregando amostras de soro de pacientes com TB e ESZ sob tratamento. O **Capítulo 1** consistiu em realizar análises globais de íons metálicos utilizando a técnica de espectrometria de massas com fonte de plasma acoplado indutivamente (ICP-MS). O **Capítulo 2** foi baseado em análises globais de proteínas usando a técnica de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS). E o **Capítulo 3**, sendo uma abordagem mais específica, baseado na identificação de proteínas que contêm proteínas oxidadas as quais estariam relacionadas a processos redução e oxidação. Todos estes com objetivo geral de identificar potenciais biomarcadores relacionados à resposta dos tratamentos dos pacientes e realizar uma análise em função aos resultados obtidos comparados com a literatura. Espera-se que os perfis elementares e proteicos diferenciáveis possam embasar pesquisas envolvendo a descoberta de biomarcadores de resposta em doenças psiquiátricas, em especial aqueles relacionados ao processo de estresse oxidativo, bem como na elucidação de vias de sinalização relacionados às doenças estudadas.

CAPÍTULO 1

Associação entre macro/microelementos no soro de pacientes com transtorno bipolar e esquizofrenia considerando os efeitos do tratamento

1. Revisão bibliográfica

1.1. Elementos essenciais

Um dos princípios de classificação dos elementos químicos é a divisão em grupos de acordo com seu conteúdo no organismo de mamíferos. A primeira classificação é em “macroelementos”, que engloba os elementos encontrados em concentrações maiores a 100 mg L^{-1} , compreendendo O, C, H, N, Ca, P, K, Na, S, Cl e Mg. Alguns elementos deste grupo são chamados de “organógenos” (C, H, O, N, P e S) devido ao fato de que são os principais elementos envolvidos na formação de tecidos e órgãos. O segundo grupo é denominado “microelementos”, os quais se encontram numa faixa de concentração de $0,1$ a 100 mg L^{-1} . Entre estes elementos encontram-se Fe, Zn, Cu, Al, Mn, Pb, Cd, B, Sr, Mo, Cs e I. Apesar de se encontrarem em “baixas” concentrações, os microelementos não são elementos aleatórios nas substâncias biológicas, mas sim componentes de um sistema fisiológico complexo envolvido na regulação de funções vitais em todas as etapas do desenvolvimento do organismo vivo. Finalmente, um terceiro grupo é denominado “ultra microelementos”, cujas concentrações são menores que $0,01 \text{ mg L}^{-1}$. Dentre eles, destacam-se Se, Co, Ni, Li, Ag, Ti, Rb, Br, Ga e Ba (23).

Os 21 elementos essenciais, distribuídos entre metais (Na, Mg, K, Ca, Mn, Fe, Co, Cu, Zn, Mo e Ni) e não-metais (C, H, O, N, P, S, Cl, Br, I e Se), são indispensáveis para o funcionamento adequado dos organismos vivos e, portanto, são classificados como necessários para o desenvolvimento de funções bioquímicas específicas. Dentre os elementos não-essenciais encontram-se os tóxicos como Cd, Hg e Pb, cujas concentrações toleráveis variam dependendo do nível de exposição (24).

A essencialidade é a propriedade mais importante dos elementos químicos, sendo que sua obtenção depende apenas da dieta, uma vez que não podem ser sintetizados pelo organismo. Assim, um elemento é considerado essencial se a sua ausência ou ingestão insuficiente para o organismo e a sua reposição, da quantidade que falta deste elemento, elimina as manifestações clínicas da sua deficiência. Em 1996, a Organização Mundial da Saúde (OMS) definiu que um elemento é considerado essencial para um organismo quando a redução de sua exposição abaixo de

determinado limite resulta consistentemente em uma redução de alguma função fisiológica importante, ou quando o elemento faz parte de uma estrutura orgânica, desempenhando uma função vital no organismo. Estes podem estar envolvidos em mecanismos como: (i) função da regulação celular, (ii) manutenção e crescimento, e (iii) neuromodulação, dentre outros (25,26).

Deste modo, devido à importância destes elementos nos sistemas vivos, e a sua relação com um desempenho ineficiente das funções biológicas quando acontece algum desbalanceamento, há um interesse de abordar o estudo de elementos químicos em determinados processos biológicos, o que é possível por meio da metalômica.

1.2. Metalômica

Semelhantemente à genômica e à proteômica, que consistem respectivamente no estudo do genoma e proteoma como uma relação aplicada às biomoléculas, a metalômica é definida como o estudo do metaloma, considerando as interações e conexões funcionais de íons metálicos e outras espécies metálicas com genes, proteínas, metabólitos e outras biomoléculas em sistemas biológicos (**Figura 1.1**), cujo objetivo final é fornecer uma compressão global e sistemática da captação, transporte, função e excreção de metais em sistemas biológicos (27,28).

O metaloma refere-se à compreensão da biodistribuição de elementos, ou seja, ao equilíbrio de concentrações dos íons metálicos livres contidos num compartimento celular, célula ou organismo (29). Assim, o metaloma pode ser abordado por diferentes graus de aproximação: como um conjunto de concentrações totais de elementos num determinado volume ou massa (conhecido como ionoma), em um local específico (tecido ou compartimento celular) ou em um conjunto de complexos metálicos como uma determinada classe de ligantes, tais como metaloproteoma ou metalometaboloma, referente à totalidade dos metais que interagem com metabólitos (30).

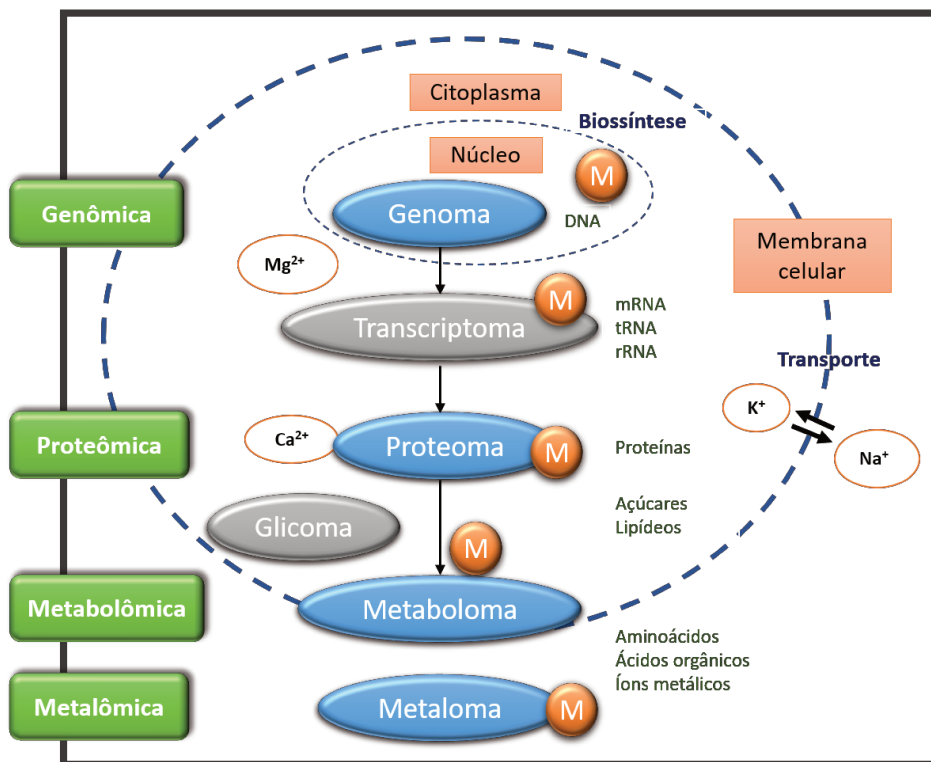


Figura 1.1. Modelo simplificado de um sistema biológico, mostrando a relação das ciências ômicas. M: metal. Adaptação de (29).

Dentro do uso complementar da metalômica para questões de especiação, novas abordagens como o estudo do metaloproteoma e metalometaboloma surgiram. As metaloproteínas são definidas como proteínas cuja função é conferida pelo metal, o que significa que a proteína precisa se ligar ao metal (cofator) para desempenhar sua função biológica. Esta função pode ser catalítica, ocorrendo por meio de reações por meio de transferência ou armazenamento de elétrons de íons metálicos com atividade redox, até estabilização da estrutura de uma proteína terciária ou quaternária. Aproximadamente um terço de todas as proteínas precisam de metais para exercer suas funções (31,32).

O termo metalometabólito é definido como um complexo metálico com um bioligante endógeno produzido por uma reação bioquímica ou por uma metalobiomolécula biologicamente alterada e introduzida no organismo (como um metalofármaco). Embora estes compostos sejam pouco estudados, há referências de estudos de resíduos de metaloquelatos residuais em água provenientes de hospitais e de plantas de tratamento, além da especiação de compostos cancerostáticos no ambiente ou em fluidos biológicos. Como exemplo, há um estudo sobre o

monitoramento de metabólitos de oxaliplatina em urina de pacientes com câncer colorretal, cujo objetivo é detectar algumas biomoléculas produzidas pela biotransformação de produtos ou complexos após a administração dos fármacos, os quais podem induzir efeitos secundários como a neurotoxicidade (33,34).

Com a finalidade de complementar a **Figura 1.1**, a **Figura 1.2** mostra de forma geral a captação e trânsito de um íon metálico para dentro de uma célula, em conjunto com as biomoléculas que participam nesses processos. Alguns destes mecanismos podem ser reversíveis ou irreversíveis e, durante o processo, o estado de oxidação do metal pode mudar. Assim, este pode ingressar ou sair através de canais, bombas ou permutadores (*exchangers*) localizados na membrana celular. Para o transporte do íon metálico no interior da célula, ele pode ser cofator de diferentes enzimas (E) ou proteínas (P_x), ligando-se as mesmas reversível ou irreversivelmente. A participação de metais no núcleo se dá pelo reconhecimento de outras proteínas, como fatores de transcrição, as quais por sua vez podem interagir no metabolismo do DNA irreversivelmente para gerar uma produção controlada (sínteses) de todas as proteínas e enzimas que podem fazer parte desse processo. A **Tabela 1.1** mostra alguns exemplos de metaloproteínas e metaloenzimas que podem ser encontradas no interior ou exterior da célula através de vesículas, como lisossomos e endossomos (29,35).

Tabela 1.1. Metais essenciais e a sua localização celular (26,37,38)

Metal	Proteína / Enzima	Localização
Cálcio	Cubilina	Lisossomo, exossomo
Cobalto	Vitamina B12 (metilcobalamina)	Lisossomo
Cobre	Enzima: ceruloplasmina, citocromo C oxidase, lisil oxidase, SOD, tirosinase, dopamina β -mono-oxigenase	EC, RE / mitocôndria, núcleo
Ferro	Transferrina, ferritina Enzima: ferroxidase	EC, RE, endossomo
Magnésio	Proteína transportadora de Mg-1 Estrutura do RNA, enolase	RE, MC Núcleo, citoplasma
Manganês	Enzimas: arginase, piruvato carboxilase, glutamina sintetase, SOD-Mn	EC, citoplasma, mitocôndria
Molibdênio	Enzima: xantina dehidrogenase/oxidase, aldeído oxidase Molibdopterina	EC, citoplasma Citoplasma, núcleo
Selênio	Glutathione peroxidases (GPxs) Tioredoxina redutases (TrxRs) Transportador de Se, selenoproteína P	Citoplasma, EC, MC Citoplasma, mitocôndria EC
Sódio	Bomba de Na ⁺ /K ⁺ ATPase	MC
Zinco	Transportador de zinco Metaloenzimas: fosfatase alcalina, álcool desidrogenase, RNA polimerase, SOD	MC, endossomo Núcleo, citoplasma

EC: extracelular, RE: retículo endoplasmático, MC: membrana celular, SOD: superóxido dismutase.

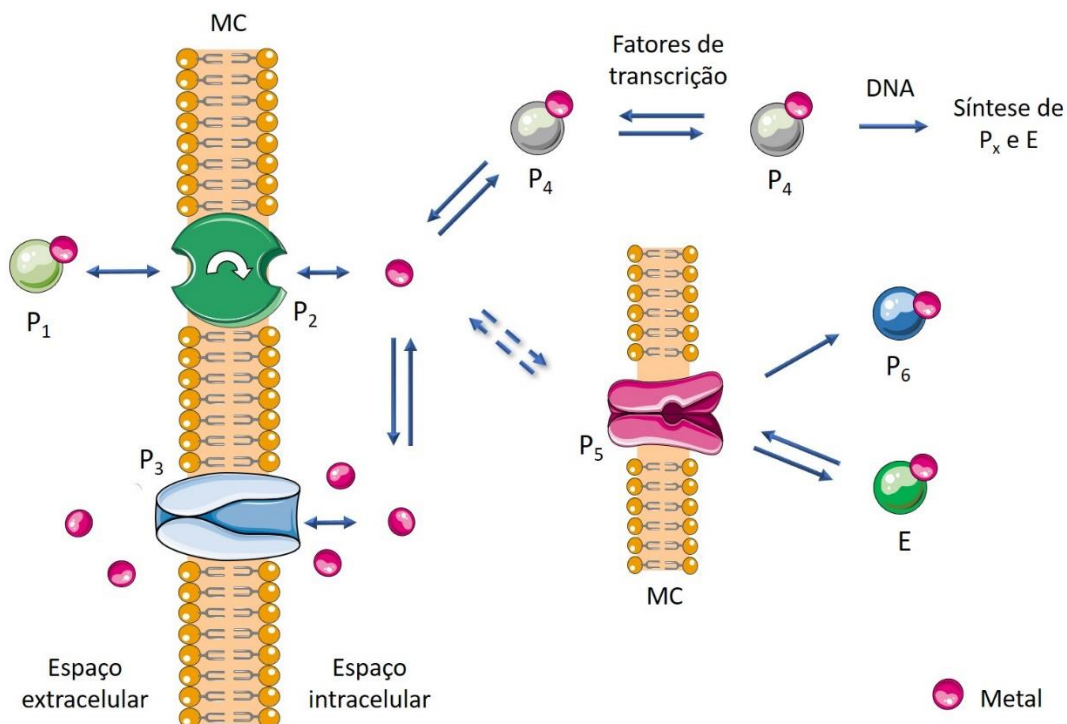


Figura 1.2. Exemplo de captação e trânsito de um íon metálico dentro de uma célula. MC: membrana celular; P: proteína; E: enzima. Adaptado de (30).

1.3. Técnicas analíticas empregadas em metalômica

As concentrações totais dos elementos em diferentes amostras biológicas são geralmente determinadas por técnicas analíticas altamente sensíveis, como a espectrometria de emissão atômica com fonte de plasma acoplado indutivamente (do inglês *Inductively coupled plasma optical emission spectrometry*, ICP-IOS) e a espectrometria de massas com fonte de plasma acoplado indutivamente (do inglês *Inductively coupled plasma mass spectrometry*, ICP-MS). Assim, o heteroátomo presente nas espécies que constituem o metaloma ou metaloproteoma pode ser usado como um marcador para sua quantificação.

A espectrometria de massas (MS) é sem dúvida uma das técnicas analíticas mais importantes atualmente e é amplamente empregada para a detecção e quantificação de elementos e moléculas, obtendo concentrações em níveis de traço até de ultra traço. Os acoplamentos de técnicas analíticas têm como objetivo fornecer a resolução suficiente para evitar coeluição de outra espécie do mesmo elemento, quando é usada a detecção por ICP-MS, ou de qualquer outra espécie concomitante

facilmente ionizável capaz de suprimir a ionização do analito, quando usada a MS para moléculas.

A técnica de ICP-MS possui especificidade isotópica, capacidade de detecção multielementar com alta sensibilidade, poder de detecção excepcional em partes por trilhão (ppt, dependendo da natureza da amostra) e ampla faixa dinâmica linear em níveis de traços, independentemente do ambiente de coordenação do metal e da matriz das amostras. Além disso, apresenta facilidade de acoplamento com outras técnicas de separação, como cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), cromatografia gasosa (GC) e eletroforese capilar (CE), o que torna possível a abordagem da metalômica dentro de outras ômicas (36,37).

Amostras complexas com alto teor de carbono, entre elas as biológicas, são consideradas um desafio devido às interferências espectrais em análises por ICP-MS. Estas interferências espectrais podem ser geradas por razões massa-carga (m/z) iguais de espécies poliatômicas ou isobáricas, como $^{40}\text{Ar}^{13}\text{C}^+$ com $^{53}\text{Cr}^+$ e $^{40}\text{Ar}^+$ com $^{40}\text{Ca}^+$, respectivamente. Apesar de ser possível minimizar ou suprimir estas interferências usando uma célula de colisão, ainda é considerado mais apropriado realizar análises de soluções com baixo conteúdo de carbono (38). Interferências não-espectrais também podem se apresentar durante a análise de amostras de sangue. Portanto, altas concentrações de solutos inorgânicos e orgânicos podem causar alterações na geração, transporte e/ou propriedades do aerossol no plasma. Além disso, sais dissolvidos podem levar a um bloqueio parcial da tocha injetora ou dos cones do equipamento de ICP-MS (39). Nesse contexto, é importante o desenvolvimento de procedimentos de decomposição é importante antes da introdução de amostras em equipamentos baseados em técnicas de espectrometria atômica com introdução de amostras líquidas. Além disso, a otimização do método empregado deve ser considerada para obter resultados confiáveis e garantir a segurança durante o preparo, como é no caso dos métodos por via úmida, uma vez que são empregados ácidos concentrados.

Nos métodos empregados no tratamento de amostras de sangue a serem analisados diretamente por ICP-MS, realiza-se a decomposição da matéria orgânica para obtenção dos macro/microelementos. Os tratamentos podem ser por via úmida, como diluição simples em solução ácida (adição de um agente oxidante) (40), ou em conjunto com Triton X-100 (41), ou por via seca como numa mufla ou aquecimento

com micro-ondas para secar até obter cinzas e em seguida, realizar fazer uma diluição ácida (42).

Como alternativa para ambos os tipos de vias, úmida e seca, pode ser empregado o método de decomposição com forno assistido por radiação micro-ondas. Na digestão de compostos orgânicos, um ácido concentrado é usado, geralmente ácido nítrico, para decompor a matriz. No método de decomposição por micro-ondas, são usados frascos fechados que são capazes de suportar alta pressão e altas temperaturas gerando uma oxidação eficiente para este tipo de matriz. Além disso, garante que o emprego de ácidos concentrados seja seguro. Dentre os benefícios, encontram-se a redução de tempo de reação e o uso de baixas quantidades de reagentes empregados, quando comparados aos métodos comuns. Ao mesmo tempo, cumpre com as recomendações de química verde através da diminuição da geração de gases tóxicos para o ambiente (43–45). Como consequência, o método de preparo de amostra assistido por micro-ondas é aplicado para tratamento de amostras biológicas para diferentes abordagens ômicas (46–48).

1.4. Estudos metalômicos em doenças neuropsiquiátricas

Evidências pré-clínicas e clínicas indicam uma potencial correlação entre as razões das concentrações em soro ou plasma de elementos essenciais e a severidade em transtornos psiquiátricos tem sido estudada. Um exemplo é a proporção das concentrações de Mg e Zn em pacientes com depressão (49). Outro exemplo mais explorado é a razão dos microelementos Cu/Zn, usada como um índice relacionado ao desequilíbrio entre processos de inflamação e o estresse oxidativo no desenvolvimento e progressão de algumas doenças, como renais e sanguíneas (50–52). Dentre os radicais livres produzidos durante o estresse oxidativo, as espécies reativas de oxigênio (ROS) e as espécies reativas de nitrogênio (RNS) são as mais relacionadas a distúrbios psiquiátricos, como transtorno bipolar e esquizofrenia (20,53).

Uma insuficiência dos metais essenciais pode resultar em alterações na cognição, função imune e desenvolvimento (54). Nesse contexto, foi sugerido que desequilíbrios nos níveis de metais contribuem para a fisiopatologia de diferentes doenças cerebrais (55,56), incluindo o transtorno bipolar e a esquizofrenia (57,58).

A **Tabela 1.2** foi gerada a partir da seleção de artigos científicos numa busca na base de dados no site **Web of Science**, usando termos chave “*psychiatric disorders*”, “*serum/ plasma/ CSF*”, e “*elements/ microelements*”. Como pode se observar na **Tabela 1.2**, quatro micronutrientes, em particular, Cu, Fe, Zn, e Al, foram estudados em diferentes matrizes para uma variedade de transtornos mentais, especialmente esquizofrenia. No entanto, outros elementos como Se, Ni, P e Mn não foram investigados anteriormente de forma profunda.

Com isso, há uma necessidade de realizar estudos aprofundados sobre a relação destes elementos químicos que estão envolvidos no desencadeamento de diversas doenças psiquiátricas. Neste sentido, a metalômica é uma estratégia que fornece informações relevantes além de complementar as outras abordagens ômicas.

Assim, baseado na literatura, foram escolhidos 11 macro/microelementos (K, Mg, Mn, Zn, Fe, Se, Ca, Co, Ni, P e Al) a serem avaliados nas amostras de soro de pacientes diagnosticados com transtorno bipolar e esquizofrenia. Quanto à seleção da matriz de análise, foi escolhido o soro sanguíneo devido ao fato que a obtenção não é tão invasiva quando comparada com o fluido cérebro-espinhal. A diferença entre soro e plasma é que o soro é obtido por coagulação natural do sangue e separado por centrifugação, enquanto o plasma emprega anticoagulantes como ácido etileno-diamino tetra-acético (EDTA), e como este agente quelante pode formar complexos muito estáveis com cálcio, há risco de perder ou detectar quantidades menores que as reais durante as análises. Como método de tratamento de amostra foi utilizada a decomposição assistida por radiação micro-ondas compatível para análises de elementos por ICP-MS.

Tabela 1.2. Metais estudados por diferentes técnicas e em diferentes matrizes

Matriz	Metal	Técnica	Doença	Ref.
Soro	↓Cu / ↓Zn, Cs, Se	ICP-MS	DP / ESZ	(59,60)
	↑Al, Ca, Mg ↓Cu, Fe	AA	DP	(61)
	↑ (As, Cr, Fe, K, Mg, Se, Si, Zn) ↓B	ICP-MS	TB	(57)
	↑Mn / Al, Pb ↓ Se, Cu / Ca, Cd, Co, Cr, Fe, Ni, Sn	ICP-MS	ESZ	(62,63)
	↓Zn	AA / ICP-MS	DA, DP / TB	(64–66)
	↓Fe, Zn, Co	ICP-MS	DA, DP	(67)
	↑Fe, Ni ↓Mn, Mo	ICP-MS	ESZ	(68)
	↑Mg ↓Ca, Fe, Zn	UV-Vis	ESZ	(69)
	↑Al, P, Zn, Fe ↓Na, Ca, Mg, K	ICP-MS	ESZ	(60)
	↑Cu ↓ Mn, Fe	AA	ESZ	(62)
FCS	↑Ca, Cr, Mg ↓Al, Co, Fe, Mn, Si, Zn	AA	DP	(61)
	↑Cu	AA	DP	(70)

FCS: fluido cerebrospinal, ICP-MS: espectrometria de massas com fonte de plasma acoplado indutivamente, AA: absorção atômica, UV-Vis: espectrofotometria UV-Visível, DP: doença de Parkinson, DA: doença de Alzheimer, ↑: níveis altos do analito comparado com controle saudável ou outra doença, ↓: níveis baixos do analito comparado com controle saudável ou outra doença.

2. Objetivo

2.1. Objetivo geral

O objetivo deste estudo foi avaliar a associação entre as concentrações de macro e microelementos (K, Mg, Mn, Zn, Fe, Se, Ca, Cu, Ni, P e Al) em amostras de soro de pacientes com transtorno bipolar (TB) e esquizofrenia (ESZ) comparados com participantes saudáveis, considerando os efeitos de diferentes tratamentos.

2.2. Objetivos específicos

- Otimização do método para extração dos metais usando como padrão de matriz um *pool* das amostras de soro de participantes saudáveis (controle);
- Selecionar os isótopos dos elementos com maior porcentagem de recuperação;
- Determinar as concentrações dos íons nas amostras de soro dos pacientes com TB e ESZ por ICP-MS;
- Aplicar análises estatísticas para detectar possíveis diferenças entre as amostras de pacientes e o grupo controle (composto por indivíduos saudáveis);
- Reportar a correlação entre os elementos quantificados e os tratamentos, incluindo o índice de massa corporal para cada grupo estudado;
- Determinar os valores das relações Cu/Zn para cada doença e comparar com o grupo controle.

3. Parte experimental

3.1. Materiais e reagentes

3.1.1. Equipamentos e materiais

- Tubos de polipropileno de 15 e 50 mL;
- Tubos criogênicos de 1,8 mL;
- Sistema de purificação Milli-Q Advanced A 10 (Millipore, EUA);
- Centrífuga, modelo MIKRO 220R (Andreas Hettich, Alemanha);
- Forno de micro-ondas DGT100 Plus (Provecto Analítica, Brasil);
- Espectrômetro de massas do tipo quadrupolo com fonte de plasma indutivamente acoplado ICP-MS 2030 (Shimadzu, Japão).

3.1.2. Reagentes

- HCl 37 % v/v (Merck, EUA);
- HNO₃ 69 % v/v (Merck, EUA);
- H₂O₂ 30 % v/v (Merck, EUA);
- Água ultrapura com resistividade de 18 MΩ cm;
- Soluções padrão de 1000 µg mL⁻¹: Y, K, Mg, Mn, Zn, Fe, Se, Ca, Cu, Ni, P e Al.

3.2. Metodologia

3.2.1. Participantes do estudo

Onze indivíduos com ESZ sob tratamento, sete pacientes com TB tratados com lítio (TBL) e oito pacientes com TB tratados com outros medicamentos, exceto lítio (TBN), participaram do estudo, assim como onze controles saudáveis (CS). Todos

os pacientes se encontravam em fase estável ou eutímia. As amostras de sangue foram coletadas no Hospital das Clínicas (Universidade Estadual de Campinas, Brasil). Os controles eram compostos de indivíduos sem nenhum distúrbio psiquiátrico conhecido. Além disso, nenhum indivíduo apresentava diabetes, insuficiência renal ou outras doenças metabólicas para evitar interferências com a pesquisa. O protocolo do estudo foi revisado e aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Estadual de Campinas (protocolo 775/2010). Os participantes do estudo foram informados sobre o objetivo da pesquisa e o termo de consentimento livre e esclarecido foi assinado por cada um dos participantes.

3.2.2. Coleta e armazenamento das amostras

O sangue foi coletado em tubos Vacutainer, aguardando 30 minutos antes de ser colocado no gelo, deixado coagular por mais 30 minutos e centrifugado a 3500 *g* por 15 minutos a 4 °C. O soro obtido foi dividido em alíquotas, transferido para tubos de polipropileno contendo uma solução aquosa de 0,01 % (m/v) de azida de sódio e armazenado a -80 °C até o momento das análises.

Conforme apresentado na **Tabela 1.3**, os pacientes estavam sob uso de medicamentos, entre eles: carbamazepina e valproato como anticonvulsivos; lítio como estabilizador do humor; clonazepam como ansiolítico; olanzapina, quetiapina, aripiprazol, risperidona e clozapina como antipsicóticos; venlafaxina e sertralina como antidepressivos.

Tabela 1.3. Características dos participantes incluídos no estudo

Parâmetro	TBL	TBN	ESZ	CS
Idade (anos); média (DP)	30 (9,5)	31 (11,0)	33,7 (7,9)	35,9 (7,0)
Gênero F/M; n (%)	4/3 (57/43)	6/2 (75/25)	3/8 (27/73)	7/4 (64/36)
IMC; kg/m ² ; média (DP)	24,9 (4,9)	24,6 (4,0)	30,4 (2,5)	24,0 (4,0)
Fumante, %	28,6	25,0	18,2	9,1
Tratamento; n (%)				
Anticonvulsivos	2 (28,6)	5 (62,5)	1 (9,1)	--
Estabilizadores de humor	7 (100)	--	--	--
Ansiolíticos	1 (14,3)	--	2 (18,2)	--
Antipsicóticos	6 (85,7)	5 (62,5)	9 (81,8)	--
Antidepressivos	--	--	3 (27,3)	--

DP: desvio padrão, IMC: índice de massa corporal, TBL: pacientes com transtorno bipolar tratados com lítio, TBN: pacientes com transtorno bipolar tratados com outros medicamentos, exceto lítio, ESZ: pacientes com esquizofrenia, CS: controle saudável.

3.2.3. Instrumentação e análise multielementar

Um espectrômetro de massas do tipo quadrupolo com fonte de plasma indutivamente acoplado ICP-MS, um forno de micro-ondas DGT100 Plus e uma solução de referência certificada de ítrio (⁸⁹Y) como padrão interno foram empregadas neste estudo. Água ultrapura (resistividade de 18,2 MΩ cm) obtida de um sistema de purificação Milli-Q foi usada para a preparação de todas as soluções aquosas para as análises.

As amostras de soro foram decompostas (ou mineralizadas) usando um forno de micro-ondas DGT100 Plus de frasco fechado contendo um sistema para tubos criogênicos de 1,8 mL (71). Foram adicionados, após etapa de otimização, 125 µL de HNO₃ subdestilado e 84 µL de H₂O₂ a 40 µL de soro. Ademais, foram adicionados antes da decomposição como padrão interno 4 µL de uma solução de ítrio (⁸⁹Y, 500 µg L⁻¹). Após 15 minutos de reação à temperatura ambiente, foi aplicado o seguinte programa de microondas: (i) 60 s a 300 W, (ii) 120 s a 500 W, (iii) 120 s a 800 W e (iv) 60 s a 500 W. Em seguida, as amostras foram diluídas para 2,0 mL com água Milli Q. Cada amostra foi tratada em triplicata e cinco replicatas técnicas foram medidas. Para quantificação de K, P e Ca, as amostras foram diluídas 20 vezes. Todos os parâmetros de ICP-MS estão apresentados na **Tabela 1.4**. Para a análise por ICP-MS, uma ampla faixa de *m/z* foi selecionada para cobrir o maior número de elementos possível para a análise quantitativa multielementar.

Tabela 1.4. Parâmetros instrumentais utilizados na avaliação do perfil multielementar em amostras de soro por ICP-MS

Condições da fonte	Valores
Potência de radiofrequência (kW)	1,2
Profundidade de amostragem (mm)	5
Gás do plasma (L min ⁻¹)	8
Gás auxiliar (L min ⁻¹)	1,1
Gás nebulizador (L min ⁻¹)	0,7
Condições da cela	
Gás de colisão	He
Gás da célula (mL min ⁻¹)	6
Voltagem da cela (V)	-21
Filtro de energia (V)	7

3.2.4. Análises estatísticas

Os dados adquiridos foram normalizados em relação à intensidade do pico do padrão interno. Por fim, os dados foram analisados usando ferramentas estatísticas univariadas no software Excel, como o teste *t* de Welch e a análise de variância unidirecional (*one-way* ANOVA). Para a análise de correlação de Pearson, foi realizada a normalização pela mediana das amostras e o auto escalamento na plataforma MetaboAnalyst 3.0, e extraídas as tabelas com os coeficientes de correlação entre os níveis de elementos para as doenças e o grupo controle saudável. Todos os resultados foram avaliados com nível de confiança de 95 % e significância estatística com *p*-valor < 0,05.

4. Resultados e discussões

4.1. Otimização do método

Inicialmente, foram determinados os volumes de ácido nítrico e de peróxido necessários para obtenção da maior extração dos metais da matriz. Além disso, levou-se em consideração outras limitações como a da disponibilidade de volume das amostras, e o do teor de acidez após as respectivas diluições que deveria ser menor que 5 % (v/v), como requisito técnico do equipamento utilizado.

Foi empregado um *pool* de amostras controle suficiente para acompanhar toda a etapa de otimização. Assim, partiu-se da metodologia de referência desenvolvida por nosso grupo (60) que foi adaptada, uma vez que era necessário trabalhar com uma quantidade menor de amostra. Como mostrado na **Tabela 1.5**, foram realizadas variações nas proporções do ácido e do peróxido. Para essas avaliações, os métodos foram realizados em triplicatas e com cinco leituras independentes, identificando apenas alguns elementos e isótopos.

O Método I foi um ajuste em proporções do método de referência, que consistiu em ajustar o volume final a 2 mL, diminuindo a diluição da amostra e mantendo a acidez. No Método II foram mantidas as quantidades da amostra e o fator de diluição, sendo apenas modificada a concentração final de acidez. A **Tabela 1.6** mostra que entre, os métodos I e II, não há diferença significativa, conseguindo assim, diminuir o teor de acidez de 5,4 % inicial a 4,06 % (v/v). No entanto, após as decomposições das amostras, observou-se em vários tubos resíduos brancos que poderiam ser indicativos de decomposição incompleta e/ou deposição residual. Em consequência, procurou-se na literatura onde foram relatadas análises com outra proporção da mistura de ácido:peróxido, sendo esta de 3:2 (72) no qual o método III foi baseado, que aplica uma maior quantidade de peróxido comparado com o método inicial, que emprega a proporção 5:1. Nessa última proporção, diferenças significativas foram obtidas em pelo menos três elementos, mostrando uma extração maior e melhor decomposição desde que não foram observados mais resíduos nos tubos. Em consequência, o método III foi selecionado com as novas condições de tratamento de amostra, permitindo a continuidade da otimização.

Tabela 1.5. Métodos de preparo de amostras

	Método I	Método II	Método III
Amostra (μL)	40	40	40
HNO ₃ (μL)*	166	125	125
H ₂ O ₂ (μL)*	33	25	84
Tempo de pré-reação	15 min		
Programa no micro-ondas	1 min a 300 W; 2 min a 500 W; 2 min a 800 W e 1 min a 500 W		
Volume final	2 mL	2 mL	2 mL
Diluição (amostra)	50	50	50
Diluição (acidez)	12	16	16
% Acidez final	5,40	4,06	4,06

*Ácidos concentrados

Tabela 1.6. *p*-valor do teste-*t* entre os Métodos I, II e III

	<i>p</i> -valor	
	Métodos I-II	Métodos II-III
⁶⁵ Cu	0,086	0,001*
⁵⁶ Fe	0,177	0,208
⁵⁷ Fe	0,155	0,043*
³⁹ K	0,193	0,007*
²⁴ Mg	0,104	0,062
⁵⁵ Mn	0,357	0,256
⁶⁶ Zn	0,465	0,062
⁶⁸ Zn	0,464	0,082

* *p*-valor < 0,05

Finalmente, usando o *pool* de amostras controle enriquecidos com concentrações conhecidas dos analitos a partir das soluções padrão, foram selecionados os isótopos dos metais tendo em consideração a abundância e a maior porcentagem de recuperação, a qual foi calculada utilizando a seguinte equação:

$$\text{Recuperação (\%)} = (\text{valor determinado} / \text{valor teórico}) \times 100$$

Os limites de detecção e quantificação foram determinados usando o desvio padrão do branco (DP) e a pendente (*m*), sendo 3 x (DP/*m*) e 10 x (DP/*m*), respectivamente. Como mostra a **Tabela 1.7**, os isótopos selecionados que cumprem

as duas condições mencionadas foram: ^{63}Cu , ^{27}Al , ^{56}Fe , ^{66}Zn , ^{24}Mg , ^{60}Ni , ^{55}Mn , ^{78}Se , ^{39}P , ^{31}K e ^{44}Ca .

Tabela 1.7. Recuperação, limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) do método ($\mu\text{g L}^{-1}$) e coeficiente de correlação da curva analítica (r^2)

Analito	Número de massa	Recuperação (%)	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Coef. de correlação (r^2)
Cu	65	93,9	0,03	0,10	0,9998
Cu	63	97,1	0,04	0,13	0,9997
Al	27	117	0,32	1,07	0,9981
Fe	57	113	0,09	0,3	0,9999
Fe	56	119	0,1	0,33	0,9912
Zn	68	81,6	0,32	1,08	0,9998
Zn	66	77,6	0,31	1,04	1,0000
Mg	24	112	0,08	0,26	0,9990
Ni	62	87,8	0,02	0,07	0,9991
Ni	60	88,4	0,004	0,01	0,9987
Mn	55	111	0,010	0,02	0,9999
Se	78	108	0,020	0,07	0,9990
Se	76	108	0,21	0,7	0,9986
P	31	88,6	0,87	2,9	0,9979
K	39	93,5	3,7	12,4	0,9984
Ca	44	98,8	4,6	15,3	0,9981
Ca	42	95,1	25,4	84,8	0,9908

4.2. Determinação de elementos nas amostras de soro

Após a etapa de otimização, foram estabelecidas duas curvas analíticas para a quantificação dos elementos nas amostras respectivas. Cada uma das curvas (**Tabela 1.8**) foi composta por sete pontos preparados em solução de 1 % (v/v) de ácido nítrico. Uma solução constituída por uma mistura de Al, Cu, Fe, Zn, Mn, Ni, Se e Mg foi utilizada para construir uma primeira curva analítica (1º) empregada para a quantificação das amostras após a decomposição. Uma outra curva analítica (2º) contendo P, Ca e K foi empregada para a quantificação das amostras diluídas 20 vezes. Cada ponto usou uma solução padrão de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ de cada elemento

levando em consideração as diluições necessárias sendo preparadas no dia de análise.

Tabela 1.8. Concentrações dos macro/microelementos quantificados nas amostras de soro

Curva	Analitos	Curva analítica ($\mu\text{g L}^{-1}$)
1°	Al, Cu, Fe, Zn	1; 5; 10; 20; 30; 40; 50
	Ni, Mn, Se	0,2; 0,5; 0,8; 1; 2; 5; 10
	Mg	50; 100; 200; 250; 300; 400; 500
2°*	P, Ca, K	20; 50; 100; 200; 250; 300; 400

*empregada apenas para quantificação das amostras diluídas.

Na **Tabela 1.9** são reportadas as médias e desvio padrão (DP) para as concentrações determinadas das 37 amostras analisadas dos grupos ESZ e CS, e dos subgrupos TB. Microelementos como Al, Ni, e Mn não foram considerados, uma vez que as concentrações determinadas foram menores do que o limite de quantificação (LOQ).

Tabela 1.9. Concentrações determinadas ($\mu\text{g L}^{-1}$) dos elementos determinados em 37 amostras de soro humano: TBL (n = 7), TBN (n = 8), CS (n = 11), e ESZ (n = 11)

		TBL	TBN	CS	ESZ
⁶³ Cu	Média	893	1032	897	1089
	DP	106	332	212	338
⁵⁶ Fe	Média	700	548	421	632
	DP	396	92	121	279
⁶⁶ Zn	Média	516	497	589	488
	DP	58	34	50	88
²⁴ Mg*	Média	14,0	13,6	13,3	14,3
	DP	2,7	1,4	1,6	2,6
⁷⁸ Se	Média	22,1	32,2	37,6	31,8
	DP	4,0	5,9	5,5	3,1
³⁹ K*	Média	198	176	170	186
	DP	30	18	28	15
³¹ P*	Média	112	109	115	118
	DP	19	15	17	16
⁴⁴ Ca*	Média	95	98	95	98
	DP	32	23	13	19

*Concentração em $\mu\text{g mL}^{-1}$

4.2.1. Análises estatísticas

Realizou-se a análise estatística univariada (**Tabela 1.10**) correspondente ao teste *one-way* ANOVA, a qual indicou dois elementos estatisticamente diferenciados dentre os 4 grupos estudados e *p*-valores do teste *t* de Welch entre combinações de dois a dois grupos. Os dois primeiros elementos, Se e Zn, apresentaram os menores *p*-valores por ANOVA. Um terceiro elemento com *p*-valor < 0,05 foi o Fe, ao comparar os grupos ESZ e TBN com o grupo CS. Esses três elementos foram usados para o desenvolvimento das respectivas discussões.

Tabela 1.10. Análise estatística por ANOVA e teste *t* de Welch

Elemento	<i>p</i> -valor TBL–TBN	<i>p</i> -valor CS– TBL	<i>p</i> -valor CS–ESZ	<i>p</i> -valor TBN– ESZ	<i>p</i> -valor CS–TBN	<i>p</i> -valor TBL–ESZ	<i>p</i> -valor ANOVA
Se	3,2E-03*	5,2E-06*	4,3E-03*	0,860	0,056	2,2E-05*	2,0E-06*
Zn	0,442	0,010*	3,0E-03*	0,785	2,2E-04*	0,464	2,7E-03*
K	0,106	0,056	0,101	0,219	0,556	0,266	0,080
Fe	0,344	0,054	0,037*	0,448	0,019*	0,695	0,120
Cu	0,339	0,963	0,132	0,730	0,306	0,177	0,329
P	0,744	0,748	0,663	0,222	0,470	0,464	0,695
Mg	0,734	0,536	0,312	0,505	0,713	0,815	0,754
Ca	0,815	0,999	0,566	0,966	0,681	0,749	0,963

* *p*-valor < 0,05

A **Figura 1.3** mostra o gráfico *box-plot* desses elementos diferenciais para uma representação visual de suas concentrações determinadas nos grupos estudados. Na **Figura 1.3a**, os grupos TBL, TBN e ESZ apresentam concentrações de Se diferencialmente menores do que o CS e, considerando os grupos de pacientes, a concentração de Se foi menor no grupo TBL do que nos grupos TBN e ESZ, embora não haja diferenciação estatística entre ESZ e TBN. Na **Figura 1.3b**, observa-se que a concentração de Zn nos grupos TBL, TBN e ESZ é significativamente menor do que no CS, mas os grupos não apresentam diferenciação estatística entre si. Finalmente, na **Figura 1.3c**, o Fe apresenta concentrações mais altas para os grupos TBN e ESZ quando comparado ao grupo CS. As médias do Cu no soro foram elevadas nos grupos ESZ em comparação com o grupo CS (**Tabela 1.9**); no entanto, a diferença não foi estatisticamente significativa. Macroelementos como K, P, Mg e Ca não foram

discriminativos na análise estatística, pois apresentaram concentrações semelhantes entre pacientes e indivíduos saudáveis.

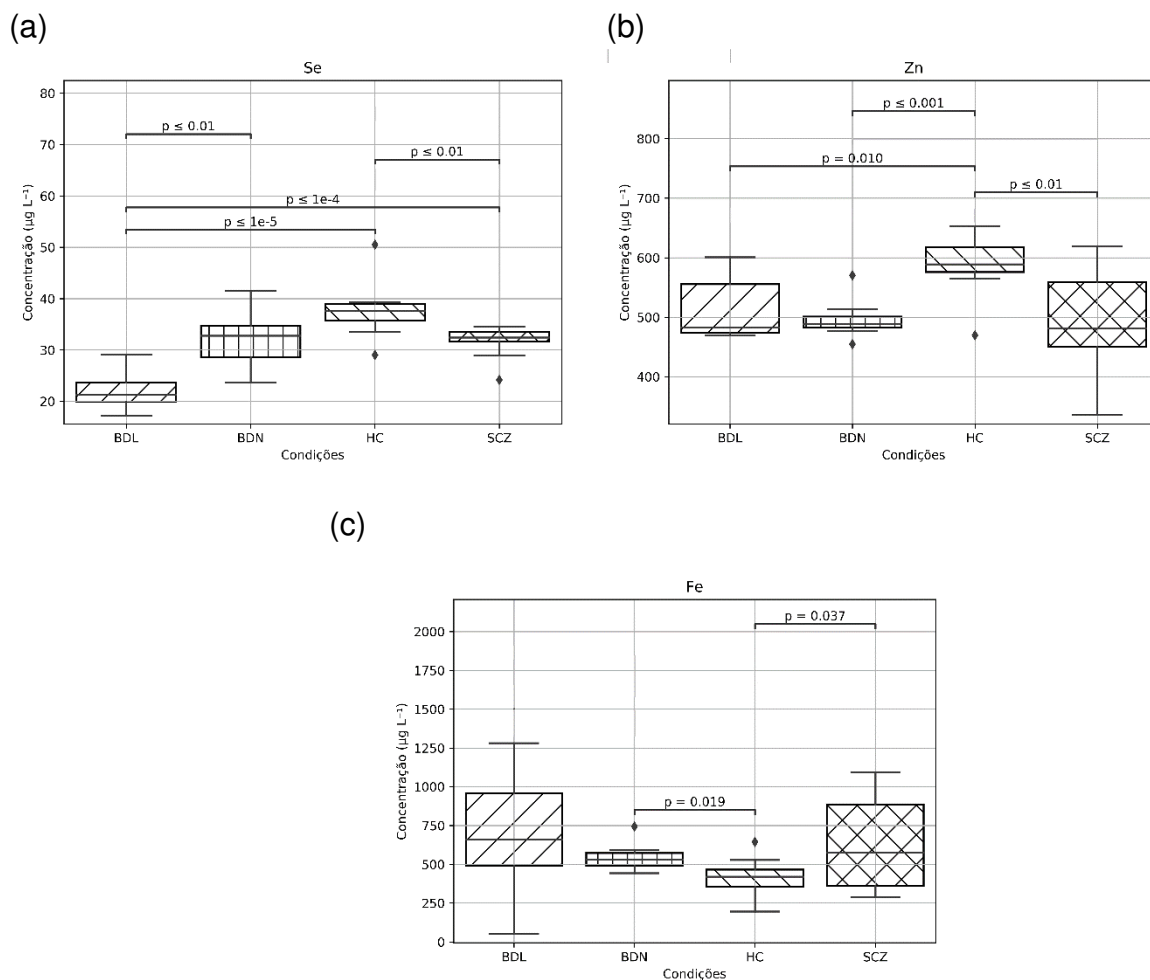


Figura 1.3. Gráficos *box-plot* para a concentração dos metais no soro (média $\pm$ DP; $n = 37$) e valor de p do teste t de Welch dentre os quatro grupos estudados em pares para (a) Se, (b) Zn e (c) Fe.

Na literatura, não há dados concretos sobre as alterações nas concentrações de Fe, Cu, e Zn no soro de pacientes recém-diagnosticados com ESZ comparado com controles saudáveis. Porém, há relatos de baixa concentração de Se em pacientes com ESZ comparados com CS (58,73), independentemente do tratamento com antipsicóticos (62,74). Neste trabalho, foram determinadas concentrações baixas do Se no grupo ESZ comparado com CS (**Figura 1.3a**). Assim, pode-se inferir que o tratamento com antipsicóticos combinados não afeta significativamente os níveis deste elemento no soro.

Kaya *et al.* reportaram um estudo de microelementos comparando pacientes ESZ sob tratamento e CS, no qual níveis altos de Fe, Cu, Mg, Al e baixos níveis de Zn e Mn em soro foram quantificados (75). Estes resultados foram confirmados por nosso estudo para os níveis de Fe e Zn, mas outros microelementos não puderam ser comparados porque ou as concentrações determinadas se encontraram abaixo do LOQ ou os pacientes encontraram-se sob diferentes tipos de medicamentos.

Num estudo prévio realizado por nosso grupo de pesquisa, amostras de plasma foram empregadas para comparar os níveis de elementos em pacientes com ESZ antes e depois do tratamento com antipsicóticos (60), no qual o Fe foi encontrado em níveis maiores após seis semanas do tratamento. Embora este último seja um estudo usando amostras de plasma, de acordo com os elementos quantificados no presente trabalho, um aumento dos níveis séricos de Fe nos pacientes com ESZ tratados também é significativo nessa fração do sangue. Em outro estudo, onde amostras de plasma de pacientes tratados com ESZ e CS foram comparadas, elementos como Se e Zn não apresentaram diferença significativa, enquanto o Cu foi encontrado em níveis maiores (76). Comparando estes resultados (**Figura 1.3**), pode-se inferir que a fração do sangue é relevante para a determinação destes elementos, uma vez que podem ser obtidos resultados divergentes.

Para pacientes com transtorno bipolar sem tratamento e comparados com pacientes saudáveis, foram apresentadas concentrações elevadas de K, P, Cu, Al e Mn e baixas de Fe e Zn (77). Considerando que o presente estudo envolveu pacientes com TB sob tratamento, a medicação pode ser associada, então, a mecanismos de vias metabólicas nas quais K, P, Cu, Al e Mn estão envolvidos, pois, as concentrações não foram estatisticamente diferentes àsquelas determinadas no controle. Além disto, há evidência de baixas concentrações de Zn no soro em pacientes com TB na fase depressiva comparada com voluntários saudáveis (65,78). Assim, com as baixas concentrações de Zn encontrados para os pacientes com TB em comparação com CS (**Figura 1.3b**) e altas concentrações de Fe (**Figura 1.3c**), podemos sugerir que o tratamento sem lítio de alguma maneira afeta mecanismos relacionados ao Fe, desde que uma concentração alta foi determinada apenas para o grupo TBN. Ademais, os tratamentos com ou sem o lítio não afetaram os níveis de Zn no soro, já que em ambos os subgrupos, TBL e TBN, as concentrações encontraram-se mais baixas em relação

ao grupo controle após o tratamento ou se há modulação, podem não ser significativos.

Em um estudo prévio de nosso grupo, foram relatados elevados níveis de Fe, K, Mg, Se e Zn no soro em ambos os subgrupos de TB e comparados com CS (57). De forma semelhante, no presente estudo, corroborou-se as altas concentrações de Fe em ambos os subgrupos de TB comparados com CS e, assim, é possível concluir que a medicação está envolvida no aumento dos níveis de Fe. Uma explicação sobre as respostas divergentes para os outros elementos pode estar relacionada à combinação de medicamentos, incluindo os pacientes tratados com Li.

A relação entre o Se e o transtorno bipolar tem sido menos explorada que com a esquizofrenia, como descrito anteriormente. No entanto, em nossa análise mostra que para o grupo TBL, reportou-se a concentração mais baixa de Se entre os dois subgrupos de TB analisados. Isto pode indicar que o Li, de alguma maneira, possui efeito antagonista com Se, uma vez que uma diferença significativa foi encontrada entre ambos os subgrupos para este microelemento. Não há informação extra sobre estudos relacionando a baixa concentração de Se no soro de pacientes com TB. Um estudo adicional comparando CS com pacientes com TB antes e depois do tratamento seria interessante para confirmar os nossos resultados.

As principais funções biológicas do Fe estão relacionadas à participação como cofator de diversas proteínas, no transporte de oxigênio e metabolismo celular. Sabe-se que geralmente a concentração de Fe aumenta naturalmente com o envelhecimento em diferentes partes do cérebro podendo levar à estresse oxidativo. O estresse oxidativo pode desempenhar um papel em uma ampla gama de distúrbios neuropsiquiátricos, incluindo esquizofrenia e o transtorno bipolar (79). Há evidências de que níveis altos de Fe presentes em doenças neurodegenerativas podem levar a um aumento no estresse oxidativo devido à sua ação com H_2O_2 na reação de Fenton, o que aumenta a produção de $\cdot OH$ no cérebro podendo correlacionar este elemento com estresse oxidativo e as doenças (15,80). Portanto, as altas concentrações séricas de Fe apresentadas nos grupos TBN e ESZ vs. controle, podem estar associadas à presença de estresse oxidativo. Além disso, foram avaliadas as concentrações deste elemento segundo o gênero (M/F), e não foram encontradas diferenças significativas (p -valor > 0,05) dentro do grupo esquizofrenia, dos subgrupos bipolar e do controle, o que significa que os níveis não foram influenciados por esse

fator. Por outro lado, há indicativos, embora não robustos, sobre uma relação do incremento dos níveis de Fe no sangue em pessoas fumantes (81–83), que não foi considerado relevante neste estudo, dado que o número de participantes fumantes não é significativo em cada grupo estudado.

O selênio é um componente de selenoproteínas. Em particular, a glutathione peroxidase (GPx), que possui funções enzimáticas essenciais, incluindo proteção contra o estresse oxidativo e inflamação (84,85). Assim, como os resultados obtidos revelaram que o grupo ESZ e ambos os subgrupos TB apresentam uma deficiência de Se, podemos relacioná-los com uma diminuição dos níveis de poder antioxidante (86), em consequência, sendo susceptíveis aos processos de estresse oxidativo estando relacionados a esses distúrbios. Também, foi relatado que ingestão de Se em pacientes com esquizofrenia aumenta os níveis séricos de Cu e Zn (87), os quais apresentaram melhoras como aumento de apetite e da capacidade de memória após a suplementação, sendo esta última uma opção para regular as concentrações no sistema.

O zinco é também envolvido com inúmeras funções biológicas, e sua deficiência é caracterizada promover o retardo de crescimento, perda de apetite e comprometer o desempenho das funções imunológicas. Quando a condição de deficiência de Zn é apresentado, geralmente está relacionada à ingestão ou absorção insuficiente de Zn, perda ou maior demanda de Zn no organismo (88). Este déficit pode desencadear o progresso de inúmeras condições comportamentais, incluindo distúrbios psiquiátricos, como depressão e ansiedade (89). Por esses motivos, a redução na concentração desse elemento no presente estudo pode indicar que os pacientes são propensos a desenvolver esses distúrbios. Ademais, sabe-se que o Zn atua como cofator envolvido no sistema de defesa antioxidante, tendo papel protetor contra o estresse oxidativo em doenças como diabetes e doenças renais crônicas (90–92). Em contraste com os resultados aqui apresentados, o baixo nível desse elemento pode implicar que os pacientes estudados, tanto no grupo ESZ e nos subgrupos TB, estejam passando por processos de estresse oxidativo apesar do tratamento.

O cobre possui atividade num amplo número de processos biológicos, como contratilidade miocárdica, mielinização do sistema nervoso central, metabolismo do colesterol e da glicose, síntese hormonal e função imunológica (93). Além disso, também está relacionado à etiologia dos transtornos mentais (94). Embora o aumento

da concentração sérica de Cu não tenha sido significativo em pacientes com esquizofrenia, existem evidências que apontam um efeito prejudicial dos níveis elevados de Cu em pacientes com esse transtorno, aumentando ou mantendo a desregulação dopaminérgica (95).

Guo *et al.* apresentaram em seu estudo uma correlação positiva entre a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) e a razão Cu/Zn (51). A SOD é uma das enzimas antioxidantes que protegem a célula, mitigando os efeitos nocivos das ROS. Para a correta ativação dessa enzima, o Cu deve trabalhar em conjunto com o Zn, e a razão entre esses elementos, e não a quantidade absoluta de Cu ou Zn em si mesmos, que ajuda a enzima a ser ativada adequadamente (96). Portanto, foram determinadas as proporções séricas de Cu/Zn para cada condição. A **Tabela 1.11** mostra que a razão Cu/Zn é significativamente maior no grupo ESZ que no grupo CS, com valor de $p < 0,05$ e sem diferenciação significativa entre o grupo ESZ e os subgrupos TB. Embora a diferenciação entre os grupos TBL e ESZ não tenha mostrado significância estatística neste estudo, um número maior de indivíduos poderia revelar se a diferenciação é significativa ou não.

Tabela 1.11. Relação entre Cu e Zn entre os grupos TBN, TBL, ESZ e CS

	Cu/Zn				p-valores					
	TBN	TBL	CS	ESZ	CS - ESZ	TBL- ESZ	CS - TBL	TBL- TBN	CS - TBN	TBN- ESZ
Média	2,14	1,76	1,65	2,40	0,028*	0,084	0,669	0,245	0,177	0,444
DP	0,57	0,32	0,43	0,68						

* p -valor $< 0,05$; DP: desvio padrão

Por outro lado, Kunz *et al.* determinaram níveis significativamente altos de SOD em pacientes com ESZ sob tratamento e comparados com grupo saudável, enquanto nenhuma diferença significativa foi encontrada ao comparar o grupo saudável e pacientes com transtorno bipolar no estado eutímico (97). Além disso, num estudo realizado por Hendouei *et al.*, no qual pacientes com esquizofrenia foram submetidos a diferentes tratamentos com antipsicóticos, foi relatado um aumento da atividade da enzima SOD em pacientes tratados com clozapina em comparação com aqueles tratados com os outros fármacos (98). No total, o grupo ESZ do presente estudo estava sob tratamento com antipsicóticos, principalmente com clozapina, e de

acordo com a literatura mencionada, há uma correlação positiva entre a relação Cu/Zn e SOD. Esse desequilíbrio pode ocorrer como resultado de um desenvolvimento de mecanismo de proteção e adaptado durante o tratamento e/ou pode ser uma indicação da geração elevada ROS no grupo ESZ. Portanto, a relação Cu/Zn pode ser considerada como um biomarcador de estresse oxidativo. No entanto, é de interesse realizar a avaliação da SOD e desses metais num ensaio com um número maior de participantes para validar a correlação.

4.2.2. Correlação das concentrações dos elementos entre pacientes e controles

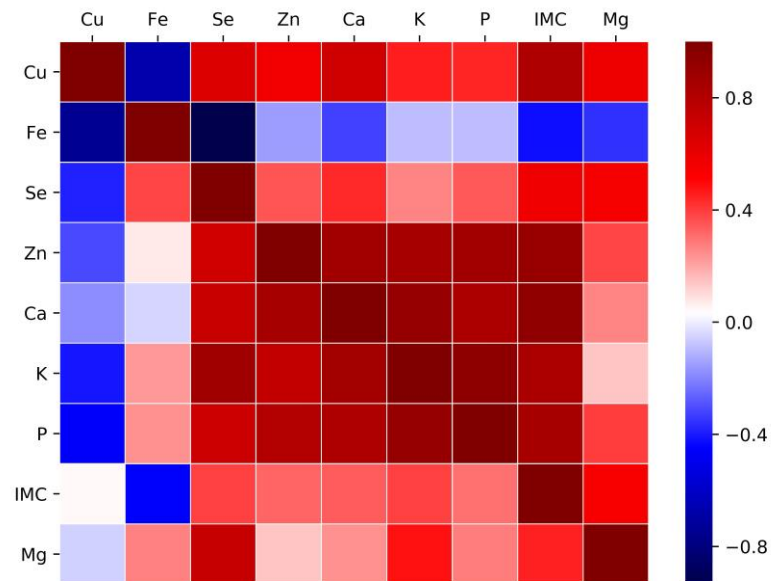
Para medir a força de associação linear entre duas variáveis foram realizadas as análises de correlação de Pearson. Assim, foi determinada a correlação entre as concentrações de elementos dos pacientes e indivíduos saudáveis, e ao mesmo tempo, encontrar alguma relação aos tratamentos. Além disso, o índice de massa corporal (IMC) dos participantes foi incluído como variável. Para melhor entendimento, os grupos TBL e ESZ foram plotados no mesmo gráfico para comparação, uma vez que os grupos TBN e CS apresentaram maior semelhança entre si. Portanto, a **Figura 1.4a** e **Tabela 1.12** apresentam correlações elementares entre as concentrações dos grupos TBL e ESZ. Para o grupo TBL, todas as variáveis, exceto Fe, apresentaram correlação positiva entre si e uma correlação negativa significativa foi observada entre Se e Fe ($r = -0,935$), enquanto no grupo ESZ, todas as variáveis (exceto Cu) exibiram correlações positivas entre si. Além disso, uma correlação negativa significativa foi determinada entre o Fe e o Cu ($r = -0,745$). A **Figura 1.4b** e **Tabela 1.13** mostram correlações variáveis entre os grupos TBN e CS. A maioria das variáveis (exceto Cu) apresentou correlação positiva entre os dois transtornos. Uma correlação negativa significativa foi encontrada apenas entre Fe e Cu nos grupos CS ($r = -0,830$) e TBN ($r = -0,786$).

Além da importância de avaliar a homeostase dos elementos, o IMC também pode indicar algumas correlações com os metais (99,100). Assim, o IMC foi avaliado nesse contexto, exibindo correlação positiva com todos os elementos, exceto com o Fe nos grupos ESZ e TBL (**Figura 1.4**). Enquanto que, para o CS e TBN, o IMC apresentou correlação positiva com todos os elementos, exceto com o Cu. Tendo em

vista a evidência de ganho de peso após tratamento antipsicótico (13), como clozapina e olanzapina (101), o grupo ESZ apresentou IMC significativamente elevado (p -valor = 0,036, comparado ao grupo CS, **Tabela 1.3**). Assim, podemos relacionar a correlação negativa do Fe com o tratamento antipsicótico na ESZ.

Por outro lado, na **Figura 1.4** verificou-se que o mesmo comportamento de correlação entre os elementos para os grupos CS, TBN e ESZ, embora menor no último. No entanto, em comparação com os outros grupos, o TBL o Cu e o Fe exibem correlações inversas com as demais variáveis, o que pode ser devido ao efeito do Li no tratamento combinado com outras medicações. Além disso, o Cu e o Fe apresentaram em todos os casos uma correlação negativa e significativa (exceto no grupo TBL).

(a)



(b)

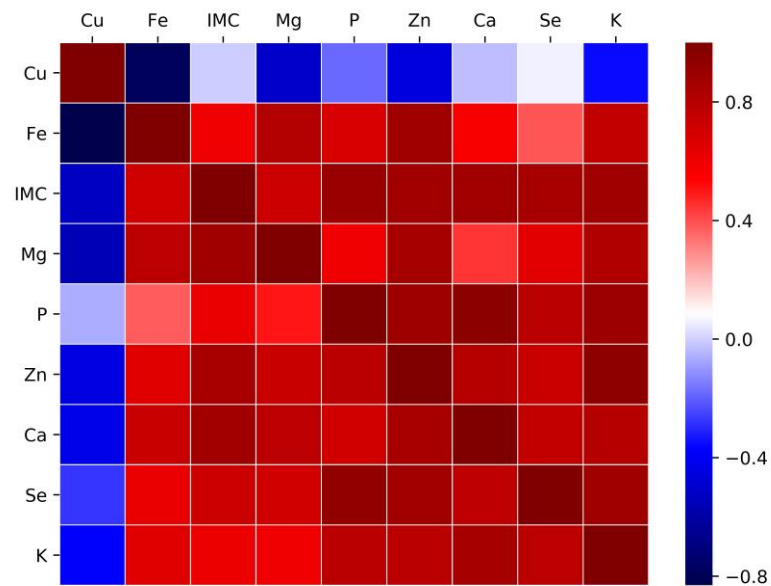


Figura 1.4. Correlações de Pearson entre as concentrações de elementos, considerando o índice de massa corporal (IMC) entre os grupos: (a) ESZ e TBL (a diagonal inferior esquerda representa as correlações de elementos no grupo ESZ e a diagonal superior direita, no grupo TBL) e (b) CS e TBN (a diagonal inferior esquerda representa as correlações dos elementos no grupo CS e a diagonal superior direita, no grupo TBN).

Tabela 1.12. Correlações de Pearson entre os níveis dos macro/microelementos para os grupos TBL e ESZ

	Cu		Fe		Se		Zn		Ca		K		P		IMC		Mg	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
Cu	1,000	--	-0,676	0,095	0,650	0,114	0,564	0,187	0,702	0,078	0,456	0,304	0,447	0,314	0,821*	0,024	0,577	0,175
Fe	-0,745*	8,5E-03	1,000	--	-0,935*	2,0E-03	-0,155	0,740	-0,323	0,480	-0,091	0,846	-0,095	0,839	-0,428	0,338	-0,360	0,427
Se	-0,387	0,239	0,382	0,246	1,000	--	0,350	0,441	0,438	0,325	0,261	0,571	0,343	0,451	0,573	0,179	0,547	0,204
Zn	-0,312	0,351	0,071	0,835	0,700*	0,017	1,000	--	0,865*	0,012	0,852*	0,015	0,868*	0,011	0,908*	4,7E-03	0,384	0,396
Ca	-0,179	0,598	-0,047	0,890	0,725*	0,012	0,850*	9,3E-04	1,000	--	0,912*	0,004	0,834*	0,020	0,938*	1,8E-03	0,266	0,564
K	-0,410	0,210	0,224	0,508	0,876*	4,0E-04	0,751*	7,8E-04	0,863*	62E-04	1,000	--	0,945*	1,3E-03	0,838*	0,019	0,142	0,762
P	-0,464	0,151	0,244	0,470	0,712*	0,014	0,799*	3,2E-03	0,822*	1,9E-03	0,913*	8,8E-05	1,000	--	0,853*	0,015	0,400	0,374
IMC	0,040	0,906	-0,458	0,157	0,392	0,233	0,327	0,327	0,340	0,306	0,394	0,230	0,303	0,366	1,000	--	0,541	0,210
Mg	-0,054	0,874	0,270	0,422	0,732	0,010*	0,145	0,671	0,240	0,477	0,483	0,132	0,277	0,410	0,451	0,164	1,000	--

*Correlações significativas com nível de confiança a 0,05.

r: coeficiente de correlação, *p*: *p*-valor, IMC: índice de massa corporal, TBL: pacientes com transtorno bipolar tratados com lítio, ESZ: pacientes com esquizofrenia. A diagonal inferior representa as correlações entre os macro/microelementos e o IMC no grupo ESZ, enquanto a diagonal superior representa os correspondentes para o grupo TBL.

Tabela 1.13. Correlações de Pearson entre os níveis dos macro/microelementos para os grupos TBN e CS

	Cu		Fe		IMC		Mg		P		Zn		Ca		Se		K	
	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p
Cu	1,000	--	-0,786*	0,021	-0,005	0,991	-0,503	0,204	-0,182	0,667	-0,455	0,258	-0,033	0,938	0,062	0,884	-0,357	0,386
Fe	-0,830*	2,9E-03	1,000	--	0,595	0,120	0,812*	0,014	0,684	0,061	0,880*	4,0E-03	0,565	0,144	0,392	0,337	0,761*	0,028
IMC	-0,525	0,119	0,711*	0,021	1,000	--	0,722*	0,043	0,903*	2,1E-03	0,878*	4,2E-03	0,875*	0,004	0,850*	7,4E-03	0,884*	3,6E-03
Mg	-0,557	0,095	0,785*	7,2E-03	0,879*	8,0E-04	1,000	--	0,599	0,116	0,862*	5,9E-03	0,447	0,266	0,641	0,087	0,823*	0,012
P	-0,063	0,862	0,372	0,290	0,616	0,058	0,506	0,135	1,000	--	0,887*	3,3E-03	0,957*	1,9E-04	0,789*	0,020	0,893*	2,8E-03
Zn	-0,449	0,193	0,652*	0,041	0,852*	1,8E-03	0,739*	0,015	0,791*	6,5E-03	1,000	--	0,800*	0,017	0,733*	0,038	0,947*	3,6E-04
Ca	-0,429	0,216	0,740*	0,014	0,874*	9,4E-04	0,785*	7,1E-03	0,710*	2,2E-02	0,852*	1,8E-03	1,000	--	0,750*	0,032	0,804*	0,016
Se	-0,280	0,434	0,615	0,058	0,727*	0,017	0,708*	0,022	0,924*	1,3E-04	0,872*	1,0E-03	0,773*	8,7E-03	1,000	--	0,884*	3,6E-03
K	-0,373	0,289	0,653*	0,041	0,609	0,062	0,594	0,070	0,790*	6,5E-03	0,786*	7,0E-03	0,859*	1,4E-03	0,784*	7,3E-03	1,000	--

*Correlações significativas com nível de confiança a 0,05.

r: coeficiente de correlação, p: *p*-valor, IMC: índice de massa corporal, TBN: pacientes com transtorno bipolar tratados com outros medicamentos diferentes ao lítio, CS: controle saudável. A diagonal inferior representa as correlações entre os macro/microelementos e o IMC no grupo CS, enquanto a diagonal superior representa os correspondentes para o grupo TBN.

5. Conclusões parciais

Os resultados obtidos neste Capítulo mostram que as concentrações séricas de Fe, Zn e Se são afetadas durante o tratamento de pacientes diagnosticados com transtorno bipolar e esquizofrenia. Além disso, sugerem que o desequilíbrio nas concentrações de Fe é um efeito do tratamento do transtorno bipolar e que pode estar associado ao estresse oxidativo para ambos os transtornos.

Não foi possível concluir se as baixas concentrações de Se são consequência apenas do tratamento ou do estresse oxidativo. Ademais, supõe-se que o lítio tenha um efeito antagonista ao Se, como mostrado no grupo TBL. A baixa concentração de Zn nos grupos TB e ESZ pode denotar estresse oxidativo em processo, apesar do tratamento. Apenas para o grupo TBL foi relatada uma correlação significativa negativa entre o Se e o Fe.

Uma correlação negativa entre Fe e IMC no grupo ESZ pode estar relacionada ao tratamento com antipsicóticos. Já a relação Cu/Zn determinada pode ser considerada como um parâmetro indicativo para relacionar o estresse oxidativo à ESZ. Estudos futuros, incluindo um número amostral maior de pacientes com ESZ e TB, antes e após o tratamento e comparados com grupo controle, são necessários para confirmar os resultados exploratórios aqui apresentados.

CAPÍTULO 2

Estudo proteômico livre de marcadores em amostras de soro de pacientes com transtorno bipolar e esquizofrenia sob tratamento

1. Revisão bibliográfica

1.1 Proteômica

Nas últimas décadas, a descoberta de biomarcadores utilizando matrizes complexas em psiquiatria foi acelerada pela proteômica, dada a capacidade de medir mudanças na abundância de proteínas por meio de técnicas de separação, como a cromatografia líquida (LC), e espectrometria de massas (MS) (102). Esta estratégia vem auxiliando nas investigações para beneficiar o diagnóstico, prognóstico e para monitorar o desenvolvimento de doenças. Além disso, busca identificar e avaliar potenciais alvos moleculares para desenvolvimento de novos fármacos. De maneira geral, a proteômica consiste na caracterização analítica do proteoma, incluindo expressão, estrutura, funções, interações e modificações pós-traducionais (103).

Duas estratégias de identificação e quantificação proteômica por MS são frequentemente exploradas. A primeira, chamada de *shotgun* (104,105), conhecida também como proteômica exploratória, consiste em uma análise global de proteínas, permitindo determinar a identidade e, ao mesmo tempo, a quantidade das proteínas presentes na amostra. Uma segunda estratégia é chamada de *targeted proteomics* ou baseada em alvos (106), cujo objetivo é conhecer a abundância de uma proteína específica por meio de uma série de transições predefinidas (par iônico precursor/produto) que é monitorada ao longo do tempo, obtendo uma quantificação seletiva e precisa.

A proteômica exploratória pode ser abordada, em geral, por duas possibilidades de quantificação: a quantificação relativa, baseada na razão quantitativa ou alteração de abundância relativa de uma proteína entre as amostras; e a quantificação absoluta, baseada em números de cópias (expressão de proteínas numa célula) ou concentração de proteína em uma amostra. Ambas as abordagens podem ser desenvolvidas por dois métodos de quantificação: quantificação por marcação e livre de marcadores (*label-free*).

1.1.1. Quantificação por marcação

O método de quantificação por marcação permite a introdução de isótopos pesados como, por exemplo, ^2H , ^{13}C , ^{15}N , entre outros, em proteínas ou peptídeos. A quantificação das proteínas é atingida por meio da comparação das intensidades relativas dos sinais dos peptídeos de uma amostra combinando diferentes marcadores ou combinando proteínas marcadas e não marcadas. Entre os métodos de marcação isotópica comumente empregados encontram-se o SILAC (análise da razão de isótopos estáveis em aminoácidos em cultura de células), que é uma técnica de marcação metabólica que consiste em um cultivo celular em meios de cultura diferenciais. Assim, um meio contém aminoácidos com seu isótopo de maior abundância, como Lys- $^{12}\text{C}_6$ (leve) e outro contendo aminoácidos marcados com o isótopo mais pesado, como Lys- $^{13}\text{C}_6$ (pesado) (107). Por outro lado, ICAT (do inglês *isotope-coded affinity tag*/ marcador de afinidade codificada por isótopos) (108) ou iTRAQ (do inglês *isobaric tags for relative and absolute quantitation*/ marcador isobárico para quantificação relativa e absoluta) (109), envolvem marcação química.

O método por marcação com isótopos estáveis introduz uma pequena diferença de massa para peptídeos idênticos de duas ou mais amostras, de modo que eles podem ser distinguidos no espectro MS1 (**Figura 2.1a**). Nos marcadores isobáricos, é inserido um isótopo diferente de um marcador de massa isobárica em cada amostra, logo, as amostras são agrupadas e analisadas simultaneamente (**Figura 2.1b**). Como consequência, os peptídeos marcados com as variantes isotópicas aparecem em um único pico no mesmo valor de m/z em uma varredura MS1 com tempo de retenção de LC idêntico podendo ser quantificados no MS2 (110). Para ambos os métodos, a proporção de abundância relativa de peptídeos é experimentalmente medida comparando pares de peptídeos pesados/leves e, em seguida, os níveis de proteína são inferidos a partir da avaliação estatística das razões de peptídeos.

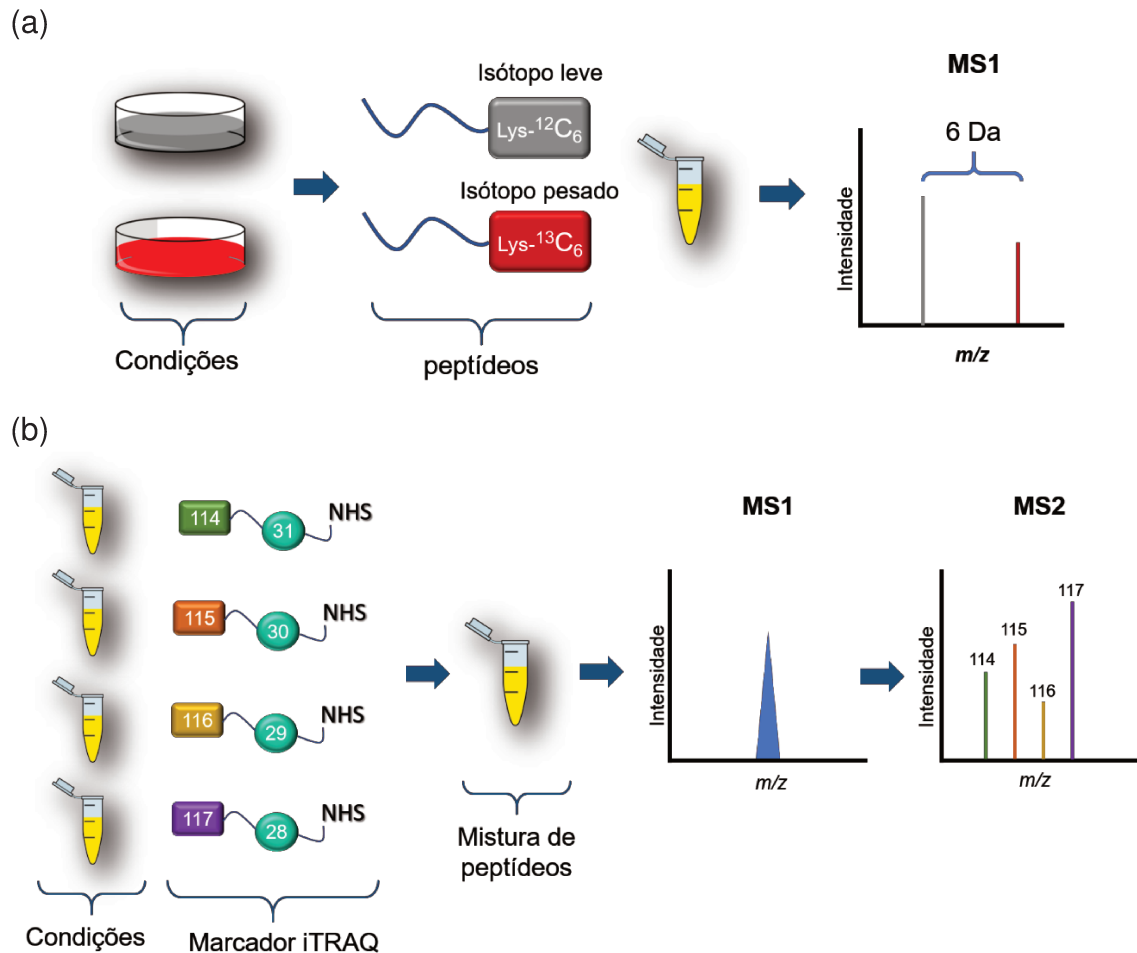


Figura 2.1. Marcação isotópica e isobárica (a) Quantificação isotópica por SILAC, (b) Kit comercial iTRAQ para quantificação isobárica. Esquema mostrando como ocorre a marcação e mistura das amostras após a reação química individual de cada amostra em diferente condição. NHS: grupo amino reativo.

1.1.2. Quantificação livre de marcadores (LFQ)

As medidas de abundância livre de marcadores (*label-free*) para análises quantitativas de dados proteômicos destacam-se devido à sua relativa facilidade de uso (parte experimental mais simples e baixo custo) e aplicabilidade geral a uma ampla gama de estudos proteômicos. Por sua vez, é empregada para complementar os estudos nos quais métodos de marcação são usados. A **Figura 2.2** mostra os dois principais métodos de quantificação desenvolvidos: no primeiro, conhecido como contagem de espectros (CEs), é feita a comparação do número de espectros MS/MS identificados de uma mesma proteína ao longo de múltiplas leituras de LC-MS/MS. A princípio, devido ao fato que as proteínas mais abundantes produzem um maior

número de peptídeos, encontrou-se a relação entre contagem espectral e a abundância das proteínas. Na prática, este método apresenta algumas desvantagens como o baixo desempenho para concentrações extremamente baixas ou altas de proteína e é provavelmente causado pelas configurações de exclusão dinâmica durante a análise de aquisição LC-MS dependente de dados. A otimização das configurações de exclusão dinâmica no modo de análise dependente de dados pode aumentar a reprodutibilidade da contagem espectral e também a quantificação de proteínas com abundância baixa (< 20 kDa) ou muito alta. Outro detalhe é que o número de peptídeos gerados pela clivagem proteolítica é dependente da massa molecular e comprimento da sequência da proteína. Apesar das desvantagens mencionadas, o método de contagem espectral ainda é uma ferramenta valiosa para o rastreamento rápido das diferenças entre as amostras e a estimativa ampla das concentrações de proteínas dentro do proteoma (111,112).

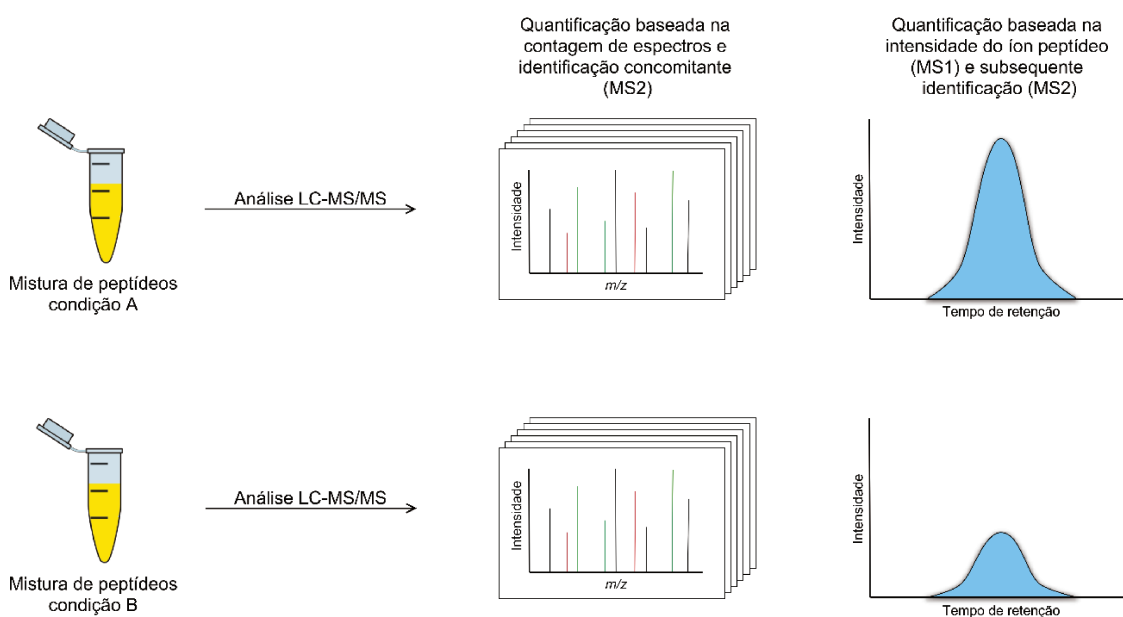


Figura 2.2. Métodos de quantificação livre de marcadores. Baseada tanto pela contagem de espectros como cálculo de intensidade da área sob a curva (117).

A segunda estratégia de quantificação em proteômica *shotgun* é baseada na intensidade do íon precursor conforme determinado pelo cromatograma de íon extraído (XIC) gerado a partir do espectro de varredura total. Da mesma maneira que a contagem de espectros está correlacionada com a abundância de peptídeos, o

mesmo ocorre com o sinal do íon precursor, que pode considerar as medidas das mudanças de intensidade de íons como área sob a curva ou altura dos picos cromatográficos dos peptídeos em um tempo de retenção esperado. Esta abordagem parece direta e conveniente, mas para obter resultados confiáveis, vários aspectos experimentais e técnicos devem ser considerados, como por exemplo: preparação de amostra, purificação, separação e fonte de ionização. Além disso, os dados brutos gerados por LC-MS devem ser pós-processados, como alinhamento de tempos de retenção, normalização de intensidades dos espectros de MS, entre outros (113,114).

Os métodos baseados em XIC são consistentemente mais sensíveis e precisos do que a CE ao usar espectrômetros de massas de alta resolução porque esses equipamentos podem discriminar entre peptídeos coeluentes de massa semelhante, permitindo o mapeamento preciso de XIC (nível MS1) para o peptídeo (nível MS2). Ambas as abordagens LFQ baseadas em XIC e CE são suscetíveis à alta variabilidade entre replicatas da mesma amostra. Os algoritmos quantitativos empregados tentam controlar esta variabilidade, mas ainda não superaram a variabilidade aleatória da seleção de íons, mudanças no tempo de retenção e eficiência de ionização (115,116). Alguns exemplos dos algoritmos empregados são: emPAI e APEX (112), MaxLFQ e iBAQ (117), para CE e XIC respectivamente.

1.2. Estudos proteômicos em transtornos psiquiátricos

Antes de avaliar biomarcadores periféricos em transtornos psiquiátricos no geral, foi importante tentar compreender as principais alterações fisiopatológicas associadas aos principais transtornos psiquiátricos. A identificação das vias neuronais que são afetadas em decorrência destas doenças requer a integração de informações obtidas por diferentes estratégias. Os estudos podem ser principalmente subclassificados dentro das investigações *post-mortem*, incluindo abordagens como genômica, transcriptômica, proteômica, histologia, imageamento e espectroscopia de ressonância magnética nuclear (NMR). Esses estudos permitiram a investigação de alterações moleculares e estruturais associadas às fisiopatologias relevantes (118).

Apesar desses estudos terem proporcionado resultados para o desenvolvimento de novas hipóteses, como por exemplo, sobre as alterações na transmissão sináptica, conectividade neuronal e plasticidade, estas análises são

automaticamente afetadas pelo tempo de coleta da amostra e limitadas a um pequeno número de regiões do cérebro (119–122). Na literatura, existem alguns biomarcadores propostos em estudos independentes para cada doença e poucos estudos comparando-os. Porém, carecem de especificidade porque os biomarcadores são compartilhados entre as condições (118,123,124). Entre os processos biológicos associados às proteínas cerebrais identificadas em pacientes com TB e ESZ encontram-se: resposta ao estresse, metabolismo lipídico e função mitocondrial (119,125,126).

Por outro lado, as proteínas séricas identificadas em TB estão envolvidas na resposta imune, regulando os processos de transporte e comunicação celular. Já para ESZ, além da resposta imune, estão a regulação do metabolismo do ácido nucléico, crescimento e manutenção celular (127). A **Tabela 2.1** foi gerada a partir da seleção de artigos científicos, baseados numa busca na base de dados do site *Web of Science*, e usando termos chave “*schizophrenia*”, “*bipolar disorder*”, “*serum/plasma*”, e “*biomarkers*”. Nela indica alguns estudos realizados em ambas as doenças até o ano de 2017, bem como as técnicas empregadas para analisar amostras de sangue e identificar e/ou quantificar as proteínas pertencentes às vias de sinalização e processos biológicos mencionados nesta seção.

Tabela 2.1. Estudo de biomarcadores em soro e plasma de pacientes com TB e ESZ

Proteína identificada	PB / VS	Doença		Técnica	Referências
		TB	ESZ		
Apo A1, Apo A4	Transporte molecular e fatores de coagulação		x	2-DE, MALDI-TOF-MS, imunoensaio	(128–132)
Componente C3, Transtiretina		x	x	SDS-PAGE, MALDI-FTICR-MS, 2-DE, MALDI-TOF-MS	(128,132,133)
Ferritina, Transferrina, Fator complementar B precursor, Fibrinogênio			x	Imunoensaio, 2-DE, MALDI-TOF-MS	(128,131,132,134)
Antitripsina α 1, Macroglobulina α 2, Haptoglobina, Endotelina-1, Glutathione S-transferase, Haptoglobina cadeia α 2 e β			x	2-DE, MALDI-TOF-MS, Imunoensaio	(128,132,135)
Proteína reativa C (CRP)	Inflamação e estresse oxidativo	x	x	Imunoensaio enzimático, SDS-PAGE, MALDI-FTICR-MS	(133,136)
IL-6		x	x	Imunoensaio	(137–139)
IL-6R, sIL-2R, sIL-6R		x		Imunoensaio	(130,136,140)
IL-10, IL-12, IL-16			x	Imunoensaio	(128,138,139,141)
Fator inibitório de migração de macrófagos, TNF-R2, ICAM-1, IFN- γ , IL-1 β , Polipeptídeo pancreático, Progesterona, Testosterona			x	Imunoensaio	(128,135,142,143)
TIMP1, TGF- β , TNF- α			x	Imunoensaio	(128,138,142)
sP-selectina, sTNF-R1, IgM		x		Imunoensaio	(136,140,144,145)
sCD14, hsCRP		x	x	Imunoensaio	(145,146)

x: Doença psiquiátrica estudada. TB: transtorno bipolar; ESZ: esquizofrenia; PB: processo biológico; VS: via de sinalização.

1.3. Relação do sistema imunológico com TB e ESZ

De forma geral, o sistema imunológico é uma rede complexa de células e proteínas que defende o corpo contra infecções e substâncias externas (antígenos). Este inclui barreiras anatômicas e fisiológicas, como camadas de células epiteliais, lágrimas, saliva e a camada de muco secretado que reveste o epitélio dos tratores gastrointestinal, respiratório e geniturinário. O sistema imunológico possui memória para que possa reconhecer e destruir um antígeno rapidamente se ele entrar no corpo novamente. Ele é dividido em sistema imunológico inato e adaptativo.

Resumidamente, o sistema imunológico inato caracteriza-se, principalmente, pela resposta rápida à padrões moleculares compartilhados por muitos micróbios e toxinas que não estão presentes no hospedeiro. Ele possui células de defesa do sistema imune inato, proteínas solúveis e pequenas moléculas bioativas que estão constitutivamente presentes em fluidos biológicos, como proteínas do complemento. Alternativamente, essas pequenas moléculas, são liberadas das células quando são ativadas, como as citocinas, as quais regulam funções de outras células em resposta à inflamação (147).

A classe de citocinas pró-inflamatórias é composta por interleucinas, como por exemplo: IL-1, IL-6, IL-12 e fator de necrose tumoral α (TNF- α), presentes na **Tabela 2.1**; ao mesmo tempo, elas contribuem para a potencialização da resposta inflamatória uma vez que estas regulam a atividade das células pelas quais foram liberadas.

A inflamação é a resposta do sistema imunológico a estímulos prejudiciais, como patógenos, células danificadas e agentes externos, como compostos tóxicos ou irradiação. Atua removendo estímulos prejudiciais e iniciando o processo de cura. Portanto, é um mecanismo de defesa vital para a saúde. Normalmente, durante as respostas inflamatórias agudas, os eventos celulares e moleculares e suas interações minimizam com eficiência a lesão ou infecção iminente. Este processo de mitigação contribui para a restauração da homeostase do tecido e resolução da inflamação aguda (148).

Em contraste, o sistema imune adaptativo é composto por células altamente especializadas, como linfócitos T e B. Eles manifestam uma alta especificidade por antígenos alvos eliminando os patógenos ou prevenindo a

expansão. As duas vias geralmente agem juntas, sendo o sistema inato a primeira linha de defesa e o adaptativo torna-se proeminente após vários dias (147).

Como mostrado na **Tabela 2.1**, diferentes estudos revelaram que pacientes com TB e ESZ apresentam concentrações séricas alteradas de citocinas e outras moléculas associadas com inflamação ou função e disfunção imunológica (118). Neste contexto, existe a teoria da inflamação em doenças neuropsiquiátricas, como ESZ e TB (fase depressiva), baseada na relação entre as citocinas pró-inflamatórias e seus efeitos sobre as vias de sinalização do metabolismo das monoaminas, funções neuroendócrinas e plasticidade sináptica. Esta teoria foi apoiada, no caso de pacientes com ESZ, por experimentos que identificaram, além do aumento de peso, modulações dos níveis de citocinas após seis meses de tratamento com antipsicótico (149,150). Similarmente para pacientes com TB, diversos estudos demonstraram níveis elevados de citocinas durante as fases de depressão, mania e eutímia, indicando estados de inflamação crônicos e baixos (151).

2. Objetivo

2.1. Objetivo geral

O objetivo deste estudo proteômico exploratório livre de marcadores consistiu em avaliar a associação entre as abundâncias relativas das proteínas em soro de pacientes com TB e ESZ, bem como a possível relação aos efeitos de diferentes tratamentos.

2.2. Objetivos específicos

- Realizar a depleção das amostras de soro usando a coluna de afinidade *HiTrap* Albumina & IgG;
- Identificar as proteínas nas amostras de soro por nLC-MS/MS;
- Realizar a caracterização e reportar os valores de *fold change* para as proteínas diferencialmente significativas;
- Realizar as análises de dados, usando ferramentas de bioinformática para detectar possíveis diferenças com as determinadas no grupo controle (saudável);
- Interpretar os resultados com base na literatura.

3. Parte experimental

3.1. Materiais e reagentes

3.1.1. Equipamentos e materiais

- Balança analítica;
- Tubos de polipropileno de 600 µL, 1,5 mL e 2 mL;
- Sistema de purificação Mili-Q, Milli-Q Advanced A 10 (Millipore, EUA);
- Cromatografia líquida da proteína rápida – FPLC ÄKTA™ (GE Healthcare, Alemanha);
- Centrífuga, modelo MIKRO 220R (Andreas Hettich, Alemanha);
- Coluna de afinidade albumina e imunoglobulina (*HiTrap Albumin & IgG*, GE Healthcare, Alemanha);
- Tubos Vivacon 500 com *cut-off* de 30 kDa (Sartorius, Alemanha);
- Tubos de 1,5 mL Lobind (Eppendorf, Alemanha);
- SpeedVac, modelo Concentrator Plus (Eppendorf, Alemanha);
- Vórtex com velocidade variável de 0 – 2500 rpm (modelo: MX-S, DLAB Scientific, China);
- pH-metro;
- Microcentrífuga analógica de 7000 rpm (modelo: D1008, DLAB Scientific, China);
- Termobloco de microtubos (modelo: AccuTherm; Labnet International, EUA);
- Espectrofotômetro leitor de microplacas, modelo: Asys Expert Plus (Biochrom Ltd, Reino Unido);
- *Stage Tips* C18;
- Espectrômetro de massas do tipo Orbitrap Elite™ (Thermo Scientific, EUA);
- Reagentes de pureza analítica e solventes grau HPLC, provenientes de empresas J.T. Baker (EUA), Merck (EUA) e Sigma-Aldrich (Alemanha).

3.1.2. Tampões e soluções

- Solução *Coomassie*: ácido fosfórico 10 % (v/v), sulfato de amônio 10 % (m/v), *Coomassie Brilliant Blue* G-250 0,12 % (m/v), metanol 20 % (v/v), água deionizada;
- Solução albumina de soro bovino (BSA) 2 g mL⁻¹;
- Tampão de acoplamento – fosfato de sódio / NaCl (20 mmol L⁻¹ / 0,15 mmol L⁻¹, pH 7,4);
- Tampão de eluição – fosfato de potássio / KCl (50 mmol L⁻¹ / 1,5 mol L⁻¹, pH 7,4);
- Solução de ureia (8 mol L⁻¹),
- Solução de brometo de tetraetilamônio (TEAB) (20 mmol L⁻¹);
- Solução de ditioneitol (DTT, 100 mmol L⁻¹) em TEAB;
- Solução de iodoacetamida (IAA, 50 mmol L⁻¹) em TEAB;
- Solução de tripsina (Try, 0,2 µg µL⁻¹) em TEAB;
- Solução de ácido trifluoroacético (TFA, 0,5 % v/v);
- Soluções para dessalinização: Ácido fórmico (AF, 0,1 % v/v); acetonitrila (ACN, 100 %, 90 %, 50 % e 20 %) em AF 0,1 %; metanol (MeOH, 100 %).

3.2. Metodologia

3.2.1. Participantes do estudo

Dez indivíduos com TB e dez com ESZ, ambos os grupos sob tratamento, participaram do estudo, assim como quatorze controles saudáveis (CS). Todos os pacientes se encontravam na fase estável ou eutímica. As amostras de sangue foram coletadas no Hospital das Clínicas (Universidade Estadual de Campinas, Brasil) seguindo os critérios de exclusão e protocolos conforme descrito no item **3.2.1** do **Capítulo 1**.

3.2.2. Coleta de amostras e armazenamento

Tanto o procedimento para a colha do sangue como a descrição dos medicamentos utilizados no tratamento dos pacientes foram descritos no item **3.2.2** do **Capítulo 1**. As informações dos participantes incluídos para o estudo proteômico está mostrado na **Tabela 2.2**.

Tabela 2.2. Características dos participantes incluídos no estudo

Parâmetro	TB	ESZ	CS
Idade (anos); média (DP)	33,2 (8,5)	32 (4,7)	37,9 (8,9)
Gênero F/M; n (%)	6/4 (60/40)	3/7 (30/70)	9/5 (64/36)
IMC; kg/m ² ; média (DP)	26,4 (4,4)	30 (7,7)	24,5 (2,7)
Fumante (%)	10,0	20,0	21,4
Tratamento; n (%)			
Anticonvulsivantes	4 (40)	2 (20)	--
Estabilizadores de humor	5 (50)	--	--
Ansiolítico	1 (10)	3 (30)	--
Antipsicóticos	7 (70)	9 (90)	--
Antidepressivos	--	2 (20)	--

IMC: Índice de massa corporal, TB: pacientes com transtorno bipolar, ESZ: pacientes com esquizofrenia, CS: controle saudável.

3.2.3. Depleção e quantificação de proteínas

Foi realizado o fracionamento das amostras de soro empregando uma coluna de bioafinidade *HiTrap Albumin & IgG* (GE Healthcare, Alemanha) de 0,7 x 2,5 cm (1 mL), com vazão de 1 mL min⁻¹ para separar as proteínas mais abundantes do soro (tais como albumina, IgG, etc.) e evitar possíveis interferências nas análises por MS. Uma alíquota de 70 µL de soro foi diluída no tampão de acoplamento (1:1) e centrifugada a 13 000 *g* a 4 °C por 10 minutos. Em seguida, foram injetados 100 µL da amostra em um equipamento Äkta Start FPLC (GE Healthcare, Alemanha) usando a coluna *HiTrap Albumin & IgG* (152). As frações depletadas foram coletadas e concentradas em SpeedVac a 30 °C por 5 h, até a obtenção de um volume final de aproximadamente 200 µL. Assim, para dar continuidade às demais etapas, foi necessário realizar a quantificação de proteínas empregando o método colorimétrico

de Bradford usando albumina de soro bovino (BSA) como padrão na faixa de concentrações entre 1 e 25 $\mu\text{g L}^{-1}$ (153).

3.2.4. Digestão com tripsina

Após a quantificação das proteínas pelo método de Bradford, uma alíquota contendo 150 μg de proteínas de cada amostra foi utilizada para a digestão usando um filtro concentrador Vivacon 500 com *cut-off* de 30 kDa para as etapas de carregamento, digestão e eluição dos peptídeos para cada amostra (154). Assim, na primeira etapa, as proteínas foram carregadas no filtro e o volume necessário (até 200 μL) completado com uma solução de 8 mol L^{-1} de ureia e centrifugada a 10 000 g por 15 min. A porção não retida foi descartada. A seguir, foram realizadas duas lavagens com solução de ureia cada uma com velocidade de centrifugação de 10 000 g por 15 min, descartando sempre as porções não retidas. O processo de redução foi feito pela adição de 150 μL de ditionitroto (DTT) e ureia, permanecendo sob agitação em termobloco a 21 °C por 1 min e 600 rpm, seguido de repouso a temperatura ambiente por 30 min e centrifugado a 10 000 g por 15 min. A seguir, foram realizadas lavagens para retirar o DTT com 150 μL de solução de ureia. O processo de alquilação foi feito com 150 μL de iodoacetamida (IAA) e a solução foi incubada no termobloco a 21 °C por 1 min e 600 rpm e protegida da luz por mais 20 min seguido de centrifugação 10 000 g por 15 min. Em seguida, foram realizadas lavagens consecutivas com 100 μL de solução de ureia (1x) e solução de TEAB (3x) centrifugadas a 10 000 g por 15 min cada uma.

Na segunda etapa, digestão, foram adicionados 5 μL de Try e 90 μL de TEAB a cada amostra com um novo tubo Eppendorf Lobind como suporte, protegidos com parafilm e incubados no termobloco a 37 °C por 16 h (*overnight*) a 500 rpm. Na terceira etapa, a eluição dos peptídeos foi realizada em um *spin* na microcentrífuga para recuperar amostra retida na tampa. Em seguida, foi centrifugado a temperatura ambiente a 14 000 g por 10 min. Adicionou-se 50 μL TEAB e centrifugou-se novamente a 14 000 g por 10 min. Finalmente, foram adicionados 40 μL de TEAB com agitação no termobloco a 600 rpm por 1 min; e em seguida, uma última centrifugação de 14 000 g por 10 min antes do filtro (Vivacon) ser retirado. Para deter a reação da

enzima, foi adicionado 10 μL TFA para conferir um $\text{pH} < 3$. Em seguida, as amostras foram secas a vácuo por um período aproximado de 4 h.

3.2.5. Dessalinização

Nesta etapa de dessalinização foram empregadas colunas *Stage Tips* C18 (155), previamente condicionadas com 150 μL de MeOH, retirando o solvente sob centrifugação a 1 000 g por 3 min. Seguidas de três lavagens com 150 μL de ACN 100% (em TFA 0,1%) e três lavagens de TFA 0,1% sob as mesmas condições de centrifugação. Depois de prontas, as amostras em 50 μL de AF 0,1% foram ressuspensas e transferidas às colunas. A seguir, foram centrifugadas a 900 g por 4 min e realizadas três lavagens com 200 μL de TFA 0,1% sob as mesmas condições de centrifugação. Finalmente, para recuperar os peptídeos, foram trocados os tubos por Eppendorfs Lobind novos e submetidos a 6 ciclos de lavagens com centrifugação de 600 g por 2 min, guardando a porção eluída. Assim, nos dois primeiros ciclos foram adicionando 80 μL de ACN 20% (em TFA 0,1%), seguidos de outros dois ciclos com adição de 80 μL de ACN 50% (em TFA 0,1%) e dois com de 80 μL de ACN 90% (em TFA 0,1%). As porções foram secas no concentrador e posteriormente armazenadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2.6. Análises por espectrometria de massas

No dia das análises, as amostras foram ressuspensas em 50 μL de AF. Um total de 2 μg de peptídeos digeridos foram carregados em um sistema de nano cromatografia líquida (nLC) Dionex Ultimate 3000 (Thermo Scientific). Os peptídeos foram eluídos utilizando uma coluna C18 trap e Reprosil-Pur Basic (Dr. Maisch GmbH) de 30 mm de comprimento e 0,1 mm de diâmetro, 230 mm de comprimento e 0,075 mm de diâmetro interno, respectivamente. O gradiente empregou uma solução aquosa de 0,1 % (v/v) de AF na fase móvel A e uma de 0,1 % (v/v) de AF em ACN na fase móvel B durante 180 minutos com uma vazão controlada de 400 nL min^{-1} de 2 a 35 % da fase B. O eluído da coluna de nLC foi diretamente submetido à ionização por *electrospray* (ESI) em um espectrômetro de massas Orbitrap Elite™ (Thermo

Scientific), operado no modo de íons positivos e ajustado para aquisição dependente de dados (DDA).

Os peptídeos precursores foram detectados na faixa de razão m/z 300 a 1650 e a uma resolução de 120 K. O modo MS tandem foi realizado com uma janela de isolamento de 1 unidade de massa atômica (u), com fragmentação HCD (dissociação por colisão de alta energia) no quadrupolo com uma energia de colisão normalizada de 35 %. Somente os 15 precursores mais intensos foram submetidos ao MS². A duração da exclusão dinâmica foi definida como 90 s com tolerância a erros de massa em torno de 10 ppm (156).

3.2.7. Identificação de proteínas

Os dados adquiridos por MS foram processados usando o programa MaxQuant versão 1.6.0.1 (157). As listas de pico derivadas foram submetidas ao mecanismo de busca Andromeda (158) (www.maxquant.org) e o banco de dados usado na busca de proteínas foi *Human UniProt* (ano 2017, sequências: 93614, resíduos: 37039836). Para pesquisas no Andromeda, a tolerância em massa do precursor foi definida como 20 ppm. A tolerância da massa de íons do fragmento foi ajustada para 0,5 Da. A tripsina/P foi escolhida como enzima e foram permitidas 2 clivagens perdidas. A oxidação da metionina foi definida como modificações variáveis e a carbamidometilação da cisteína foi definida como uma modificação fixa. O comprimento mínimo do peptídeo foi fixado em seis aminoácidos. A taxa de falsa descoberta (FDR) máxima - calculada empregando uma estratégia de banco de dados reverso - foi fixada em 1 % para peptídeos e proteínas. O algoritmo LFQ do MaxQuant foi aplicado para normalizar e calcular as abundâncias das proteínas (159). Nesse fluxo de trabalho específico, a partir do arquivo proteingroups.txt gerado, o filtro de dados e análise estatística para cada grupo de proteínas foi calculada no Perseus v. 1.6.14.0 (160).

3.2.8. Análises estatísticas e de classificação

Os dados foram analisados usando ferramentas estatísticas univariadas no Perseus, como o teste t de Welch aplicado aos grupos em pares usando FDR de

Benjamini-Hochberg. O teste multi-amostral (*one-way* ANOVA) foi feito com permutações baseadas no FDR e 250 randomizações. Os respectivos *fold changes* (FC) foram determinados e exibidos como $\log_2(\text{FC})$. Adicionalmente, os *Volcano plot* são mostrados para todos os grupos em pares usando teste de duas-caudas com 250 randomizações. Todos os resultados foram avaliados com nível de confiança de 95 %, significância estatística com valor de $p < 0,05$ e FDR = 0,05.

3.2.9. Anotação funcional e análise de enriquecimento de vias de sinalização

Foi realizada uma análise bioinformática de proteínas expressas diferencialmente entre os grupos estudados. A análise de Gene Ontology (GO) foi empregada para classificar as proteínas significativas nas seguintes três classes: componente celular (CC), processos biológicos (PB) e função molecular (FM). A análise de enriquecimento GO foi usada no FunRich ver. 3.1.3 (161), enquanto o REACTOME (Disponível online: <https://reactome.org/>) (162) foi usado para classificação de vias. Para determinar as relações funcionais entre essas proteínas, conduzimos uma análise de enriquecimento de via de sinalização/processo usando agrupamento de anotação funcional DAVID (Database Annotation Visualization, and Integrated Discovery, Bioinformatic resources, <https://david.ncifcrf.gov/>) (163) nos bancos de dados de vias de sinalização: GO e Enciclopédia de Genes e Genomas Kyoto (KEGG). Finalmente, as interações proteína-proteína (IPP) foram previstas usando o Cytoscape através do aplicativo String (164).

4. Resultados e discussões

4.1. Análises estatísticas e de classificação

A comparação dos dados demográficos na Tabela 2.2 (considerando os fatores de idade e sexo) não revelou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. No entanto, uma diferença significativa no IMC ($p = 0,02$) foi observada entre os grupos ESZ e CS. A análise de nLC-MS permitiu a quantificação de 108 proteínas (**Tabela Anexo**) nas 34 amostras estudadas. Nenhuma proteína foi identificada como exclusiva em indivíduos com qualquer uma das duas condições psiquiátricas, sugerindo que quaisquer diferenças proteômicas nos pacientes são quantitativas. Após análise estatística, foi obtida uma lista de 25 proteínas diferenciais ($p < 0,05$) entre os três grupos e essas proteínas foram selecionadas para posterior análise (**Tabela 2.3**). O respectivo $\log_2$ (FC) para cada par de condição está listado na **Tabela 2.4**, onde o sinal negativo indica menor abundância, enquanto o positivo, maior abundância para cada proteína. Além disso, a tabela mostra as proteínas significativas pelo gráfico de Volcano com um asterisco (*). Na **Figura 2.3** é possível a visualização das diferenças entre as abundâncias da proteína entre as duas condições usando o grupo CS como linha de base. Assim, AFM, CPB2, RBP4, IGLC6, APOA1 e GPX3 encontram-se em níveis menores, enquanto as 19 proteínas restantes apresentam níveis opostos entre si. Este último detalhe é relevante para levar em consideração na interpretação das análises de enriquecimento.

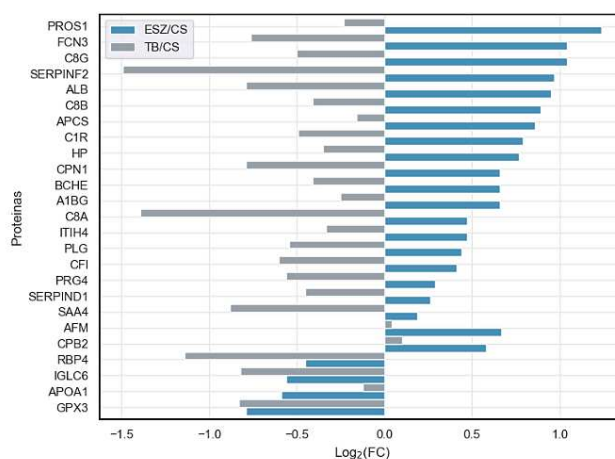


Figura 2.3. Relação de abundâncias das proteínas entre os grupos.

Tabela 2.3. Análise estatística por teste *t* e ANOVA

IDs	Nome de proteína	p-valor ESZ-TB	p-valor ESZ-CS	p-valor TB-CS	ANOVA p-valor
O75636	Ficolina-3	1,1E-04*	0,017*	0,034*	2,9E-04*
P05156	Fator do complemento I	9,3E-04*	0,042*	8,6E-03*	4,5E-04*
P07357	Complemento C8 cadeia α	5,1E-03*	0,275	2,7E-03*	1,8E-03*
P08697	Alfa-2-antiplasmin	3,8E-03*	0,098	0,015*	2,5E-03*
P07225	Proteína vitamina K- dependente S	6,5E-03*	3,8E-03*	0,623	6,4E-03*
P02768	Albumina sérica	6,2E-03*	0,014*	0,151	7,1E-03*
Q14624	Inibidor Inter-α-trypsin 4	6,1E-03*	0,051	0,135	9,3E-03*
P00747	Plasminogênio	3,9E-04*	0,161	0,103	0,012*
P02647	Apolipoproteína A-I	0,042*	7,2E-03*	0,524	0,013*
Q92954	Proteoglicano 4	5,0E-03*	0,256	0,053	0,014*
P22352	Glutathione peroxidase 3	0,903	0,022*	0,010*	0,015*
P05546	Cofator heparina 2	1,4E-03*	0,277	0,063	0,016*
P06276	Colinesterase	8,9E-03*	0,055	0,220	0,017*
P35542	Proteína A-4 amilóide sérica	0,028*	0,650	0,024*	0,037*
P02743	Componente P de amilóide sérico	0,041*	0,025*	0,703	0,047*
Q961Y4	Carboxipeptidase B2	0,104	0,030*	0,659	0,064
P07360	Complemento C8 cadeia γ	0,041*	0,048*	0,494	0,081
P07358	Complemento C8 cadeia β	0,040*	0,078	0,492	0,087
P0CF74	Região C da Ig cadeia λ- 6	0,505	0,182	0,034*	0,092
P00738	Haptoglobina	0,088	0,031*	0,488	0,095
P15169	Cadeia catalítica da carboxipeptidase N	0,028*	0,327	0,171	0,095
P04217	Alfa-1B-glicoproteína	0,040*	0,088	0,566	0,103
P43652	Afamina	0,161	0,041*	0,883	0,113
P00736	Complemento C1r	0,048*	0,110	0,443	0,115
P02753	Proteína 4 de ligação ao retinol	0,332	0,342	0,045*	0,130

*p-valor < 0,05. TB: pacientes com transtorno bipolar, ESZ: pacientes com esquizofrenia, CS: controle saudável.

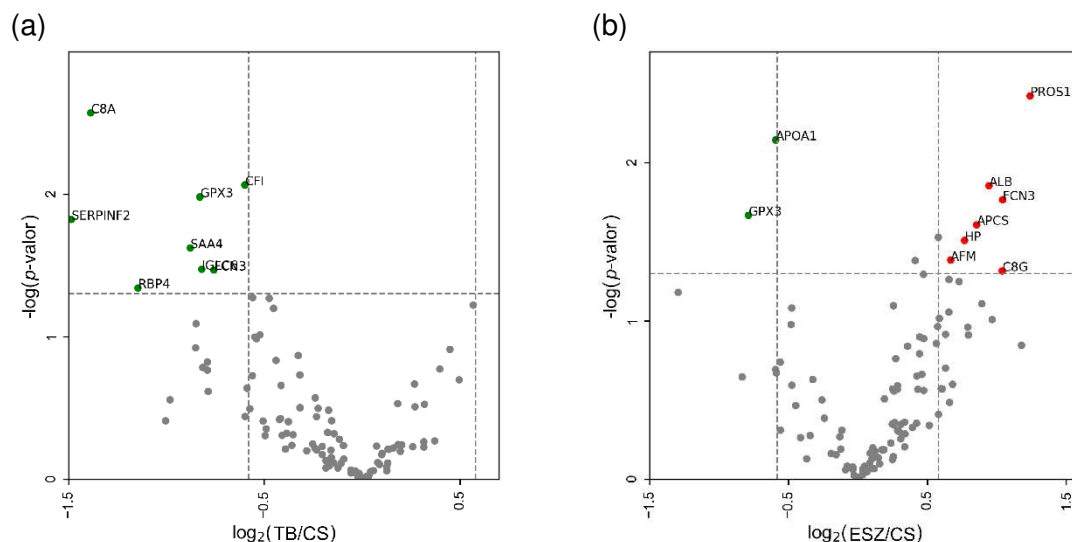
Tabela 2.4. Valores de *fold change* ($\log_2FC$) para as 25 proteínas diferenciais estatisticamente significativas

Gene	IDs	Nome	$\log_2(FC)$		
			ESZ/TB	ESZ/CS	TB/CS
FCN3	O75636	Ficolina-3	1,80*	1,04*	-0,76*
CFI	P05156	Fator do complemento I	1,01*	0,41	-0,60*
C8A	P07357	Complemento C8 cadeia α	1,86*	0,47	-1,39*
SERPINF2	P08697	Alfa-2-antiplasmin	2,45*	0,97	-1,49*
PROS1	P07225	Proteína vitamina K-dependente S	1,47*	1,24*	-0,23
ALB	P02768	Albumina sérica	1,74*	0,95*	-0,79
ITIH4	Q14624	Inibidor Inter- α -trypsin 4	0,80*	0,47	-0,33
PLG	P00747	Plasminogênio	0,98*	0,44	-0,54
APOA1	P02647	Apolipoproteína A-I	-0,48	-0,59*	-0,12
PRG4	Q92954	Proteoglicano 4	0,84*	0,29	-0,56
GPX3	P22352	Glutathione peroxidase 3	0,04	-0,79*	-0,83*
SERPIND1	P05546	Cofator heparina 2	0,71*	0,26	-0,45
BCHE	P06276	Colinesterase	1,07*	0,66	-0,41
SAA4	P35542	Proteína A-4 amilóide sérica	1,07*	0,19	-0,88*
APCS	P02743	Componente P de amiloide sérico	1,01*	0,86*	-0,16
CPB2	Q961Y4	Carboxipeptidase B2	0,48	0,58	0,10
C8G	P07360	Complemento C8 cadeia γ	1,54*	1,04*	-0,50
C8B	P07358	Complemento C8 cadeia β	1,30*	0,89	-0,41
IGLC6	P0CF74	Região C da Ig cadeia λ -6	0,26	-0,56	-0,82*
HP	P00738	Haptoglobina	1,12	0,77*	-0,35
CPN1	P15169	Cadeia catalítica da carboxipeptidase N	1,45*	0,66	-0,79
A1BG	P04217	Alfa-1B-glicoproteína	0,91*	0,66	-0,25
AFM	P43652	Afamina	0,63	0,67*	0,04
C1R	P00736	Complemento C1r	1,28*	0,79	-0,49
RBP4	P02753	Proteína 4 de ligação ao retinol	0,70	-0,45	-1,14*

*Significativos pelo Volcano plot.

TB: pacientes com transtorno bipolar, ESZ: pacientes com esquizofrenia, CS: controle saudável.

A **Figura 2.4** exibe o perfil de abundância de proteínas diferenciais e significativas pelo Volcano *plot*. Como descrição: nos gráficos de Volcano, o eixo Y é o logaritmo de base 10 negativa do p -valor do teste t para as 25 proteínas diferenciais. O eixo X é o logaritmo de base 2 da alteração do *fold change* (FC) (razão entre pares de grupos). Os pontos de corte usados são: p -valor $< 0,05$ e *fold change* $\geq 1,5$, as proteínas diferenciais em maior abundância apontadas pelo Volcano *plot* são denotadas em cor vermelha, enquanto as menos abundantes, em cor verde. Assim, as **Figuras 2.4a** e **2.4b** exibem as proteínas significativamente diferenciais para os pares TB-CS e ESZ-CS, respectivamente. Especificamente o gráfico de Volcano na **Figura 2.4a** aponta oito proteínas menos abundantes no grupo TB em comparação com os indivíduos saudáveis (C8A, SERPINF2, GPX3, CFI, SAA4, RBP4, IGLC6 e FCN3) e nenhuma proteína com níveis maiores. Enquanto para o grupo ESZ (**Figura 2.4b**), sete proteínas mais abundantes (PROS1, ALB, FCN3, APCS, HP, AFM e C8G) e duas menos (GPX3 e APOA1) foram observadas em comparação com o grupo CS. Por outro lado, quando ambos os grupos de transtornos são comparados entre si usando o grupo controle como base, ele retornou 18 proteínas com níveis maiores e significativos no grupo ESZ (**Figura 2.4c**), o que significa que essas proteínas se encontram em maior abundância no grupo ESZ que no TB.



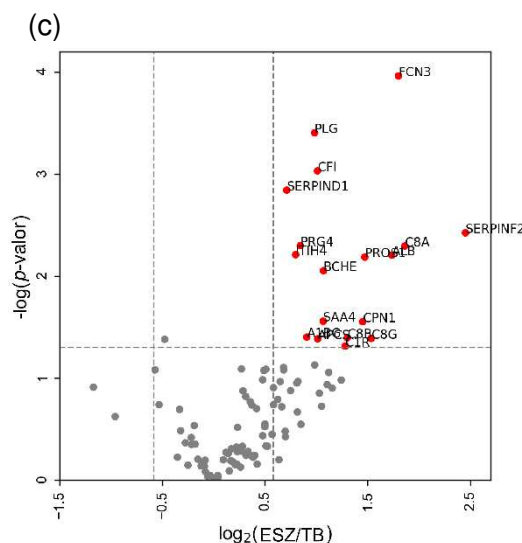


Figura 2.4. Perfil de abundância de proteínas diferenciais por Volcano *plots*: *p*-valor vs. $\log_2(\text{FC})$. Volcano *plot* comparando os grupos: (a) TB e CS, (b) ESZ e CS, (c) TB e ESZ. Pontos vermelhos representam proteínas em maior abundância, enquanto os pontos verdes representam proteínas em menor abundância.

Embora os níveis séricos da proteína APOA1 foram determinados em níveis baixos para ambos os transtornos psiquiátricos, a alteração desta proteína foi encontrada significativa por Volcano *plot* apenas para ESZ em comparação com o grupo CS. As informações na literatura estão de acordo com os resultados de baixa abundância apresentados aqui em relação a esta apolipoproteína em pacientes com TB (165–167) e ESZ (132,168,169) tratados em comparação com CS. Em um estudo prévio de nosso grupo, foi sugerido que os baixos níveis séricos de APOA1 em pacientes com TB versus indivíduos saudáveis são restaurados de forma mais eficaz no tratamento com lítio (Li) do que com outros medicamentos diferentes ao Li (170). No entanto, no presente estudo não foram observadas diferenças significativas entre ambos os tratamentos dentro do grupo TB ($p = 0,16$). Além da medicação (os participantes não estavam sendo tratados exclusivamente com Li), esta diferença também pode depender da técnica de depleção de proteínas (2D-DIGE vs. FPLC) e do analisador de massas (TOF vs. Orbitrap) empregados nos estudos.

As informações sobre os níveis de proteína moduladas em pacientes com TB antes de qualquer tratamento são limitadas, em parte porque o diagnóstico é feito principalmente após o paciente apresentar um episódio (mania ou hipomania). Como consequência, a probabilidade de que os pacientes podem se encontrar sob tratamento é alta, alternando entre as fases de eutímia, depressão ou mania (171). No

entanto, um estudo relatado por Ren *et al.* (172) em pacientes com TB sem tratamento em comparação com participantes saudáveis, foram observadas proteínas reguladas positivamente, como HP e APOA1; então, é possível sugerir para este estudo que a medicação restaura e até diminui seus níveis. Por outro lado, apesar do número de estudos sobre os níveis de proteínas séricas de pacientes com ESZ no primeiro surto ou sem tratamento serem mais elevados do que para TB, especificamente, os níveis de APOA1 não estão bem estabelecidos (130,131,173,174), impedindo a comparação com os resultados aqui relatados. Em um outro estudo, as proteínas C8B e ITIH4 foram encontradas em níveis maiores, enquanto a PROS1, em níveis menores aos controles (175). Baseado nestes resultados, podemos inferir que o tratamento pode não interferir nos níveis de C8B e ITIH4, sendo ambas as proteínas características da doença, enquanto a PROS1 é modulada após o tratamento.

Em relação às apolipoproteínas, embora altamente abundantes no soro, são caracterizadas em múltiplas classes e subclasses dependendo das propriedades superficiais e estruturais (176,177). A APOA1 é um componente predominante das partículas das proteínas de alta densidade (HDL), as quais possuem propriedades ateroprotetoras, bem como atividades antioxidantes e anti-inflamatórias nos estados livre e ligado a lipídios juntamente com a atividade de efluxo de colesterol. Este último consiste na transferência de colesterol intracelular de macrófagos ou outras células até receptores extracelulares (178,179). Assim, a APOA1 como molécula isolada apresenta diversas funções moleculares, portanto, participa em mais de um processo biológico para atingir uma função biológica mais ampla. Como esperado, devido ao envolvimento em uma diversidade de funções biológicas e independentemente dos níveis serem estatisticamente significativos para ESZ no presente estudo, a APOA1 não pode ser empregada como biomarcador para diferenciar TB de ESZ.

Algumas das proteínas identificadas neste trabalho foram relatadas em estudos anteriores de TB e ESZ. Como exemplo pontual: Song *et al.* (180) identificaram proteínas diferenciais comparando as fases bipolares (eutímia, mania e depressão) vs. indivíduos saudáveis. Entre as proteínas identificadas em pacientes eutímicos com TB (principalmente tratados com estabilizadores de humor), duas proteínas em níveis inferiores ao controle, além da APOA1, APCS e ITIH4, foram confirmadas no presente estudo. Enquanto que, para proteínas como HP, C1R e CFI, resultados opostos foram obtidos. Essas diferenças podem ser devido ao efeito do

tratamento combinado que os pacientes com TB incluídos neste estudo foram submetidos. Portanto, é possível que antipsicóticos misturados com estabilizadores de humor influenciem a abundância de HP, C1R e CFI. Quanto a níveis de proteínas em pacientes com ESZ tratados com antipsicóticos Wan *et.al* (181) encontrou níveis significativamente altos de HP e APCS quando comparado com grupo saudável, os que se encontram em concordância com o presente estudo.

4.2. Anotação funcional e análise de enriquecimento de vias de sinalização

A fim de compreender as implicações funcionais das abundâncias alteradas em ambas as condições psiquiátricas, foi realizada uma análise de predição GO (**Tabela 2.5**). Obteve-se que as proteínas diferenciais enriquecidas resultaram principalmente em categorias relacionadas ao sistema imunológico, a resposta ao estresse e a processos celulares. Na categoria CC, todas as proteínas, exceto PRG4, se encontram distribuídas extracelularmente. Na categoria PB, os termos 'regulação da ativação do complemento' (GO: 0030449), 'degranulação de plaquetas' (GO: 0002576), 'ativação do complemento, via clássica' (GO: 0006958), 'resposta de fase aguda' (GO: 0006953), entre outros, se revelaram significativamente representados ($p < 0,05$, **Figura 2.5a**).

Na categoria FM, o único grupo representado foi 'atividade inibidora da endopeptidase' ($p < 0,01$) e as proteínas identificadas foram alfa-2-antiplasmin (SERPINF2), proteína vitamina K-dependente S (PROS1), inibidor Inter- α -trypsin 4 (ITIH4) e cofator heparina 2 (SERPIND1).

A classificação das vias de sinalização por REACTOME (**Tabela 2.6** e **Figura 2.5b**) demonstrou que as mais representadas foram sistema imunológico, hemóstase, metabolismo de proteínas, transporte mediado por vesículas e vias de transporte de pequenas moléculas. A análise de agrupamento de anotação funcional com DAVID foi realizada para avaliar a significância funcional de proteínas mais e menos abundantes entre os grupos TB e ESZ. Quatro grupos de anotações apresentando os GO *terms* PB: cascatas de complemento e coagulação, fibrinólise, atividade da endopeptidase do tipo serina e atividade do inibidor da endopeptidase; assim como as principais vias: sistema imunológico e hemóstase com pontuação enriquecida > 2 foram determinadas (**Tabela 2.7**).

Tabela 2.5. Análise de enriquecimento de *Gene Ontology* para as 25 proteínas diferenciadas

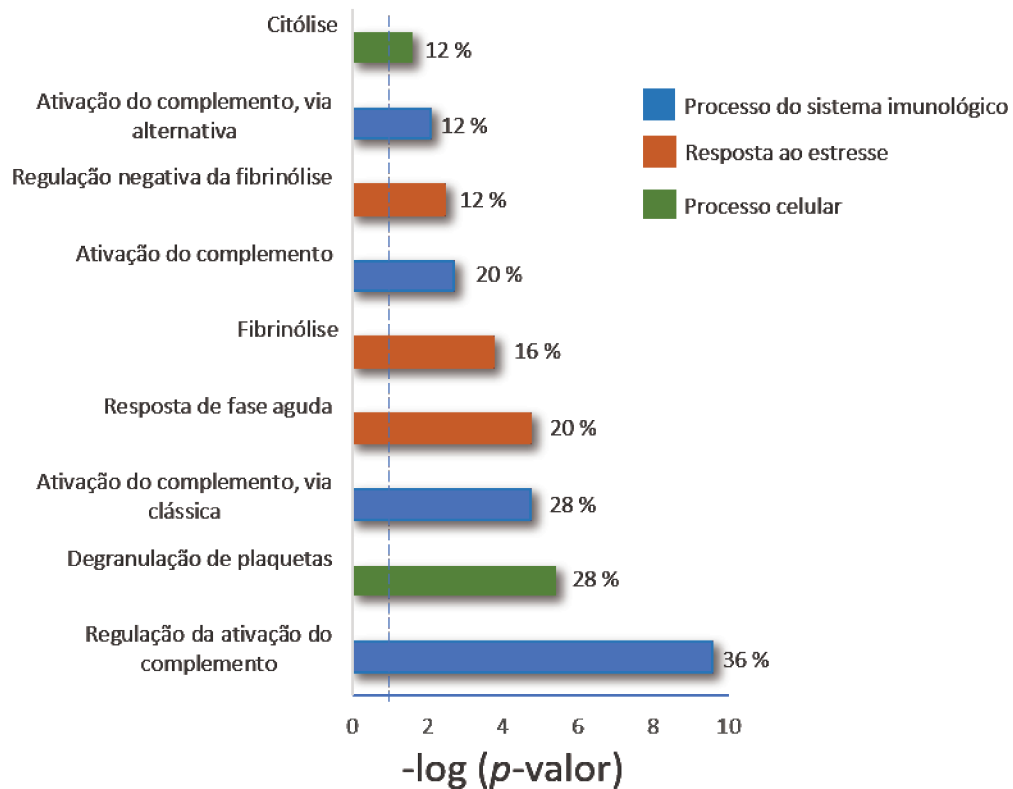
	Gene %	Enriquecimento	Bonferroni <i>p</i> -valor	Proteínas
Componente celular (CC)				
Região extracelular	96	9,7	2,5E-20	Todas exceto PRG4
Processo biológico (PB)				
Regulação da ativação do complemento	36	56,9	2,8E-10	CFI; C8A; PROS1; CPB2; C8G; C8B; IGLC6; CPN1; C1R
Degranulação de plaquetas	28	40,0	3,7E-06	SERPINF2; PROS1; ALB; ITIH4; PLG; APOA1; A1BG
Ativação do complemento, via clássica	28	32,1	1,8E-05	CFI; C8A; APCS; C8G; C8B; IGLC6; C1R
Resposta de fase aguda	20	96,6	1,8E-05	SERPINF2; ITIH4; SAA4; APCS; HP
Fibrinólise	16	142,9	1,8E-04	SERPINF2; PROS1; PLG; CPB2
Ativação do complemento	20	38,8	2,0E-03	FCN3; C8A; C8B; IGLC6; C1R
Regulação negativa da fibrinólise	12	214,5	3,6E-03	SERPINF2; PLG; CPB2
Ativação do complemento, via alternativa	12	165,0	8,5E-03	C8A; C8G; C8B
Citólise	12	119,2	2,4E-02	C8A; C8G; C8B
Função molecular (FM)				
Atividade do inibidor de endopeptidase	16	72,7	1,1E-03	SERPINF2; PROS1; ITIH4; SERPIND1

Tabela 2.6. Análise de vias de sinalização por REACTOME

ID	Via sinalização principal	Nome da via	Proteínas
R-HSA-166658	Sistema imunológico	Cascata do complemento	FCN3; CPB2; C8G; C1R; PROS1 IGLC6; CFI; C8B; C8A; CPN1
R-HSA-977606		Regulação da cascata do complemento	CPB2; C8G; C1R; PROS1; IGLC6; CFI; C8B; C8A; CPN1
R-HSA-166665		Via terminal do complemento	C8G; C8B; C8A
R-HSA-168249		Sistema imunológico inato	FCN3; CPB2; C8G; C1R; PROS1; IGLC6; CFI; HP; A1BG; C8B; C8A; CPN1
R-HSA-166786		Expressão de ativadores C4 e C2	FCN3; C1R; IGLC6
R-HSA-166663	Hemóstase	Disparo inicial do complemento	FCN3; C1R; IGLC6
R-HSA-114608		Degranulação de plaquetas	ITIH4; PROS1; ALB
R-HSA-76005		Resposta ao aumento Ca^{2+} citosólico plaquetário	SERPINF2; APOA1; PLG; A1BG
R-HSA-76002		Ativação, sinalização e agregação de plaquetas	
R-HSA-75205		Dissolução do coágulo de fibrina	SERPINF2; PLG
R-HSA-140837	Metabolismo de proteínas	Via intrínseca de formação de coágulo de fibrina	SERPIND1; PROS1
R-HSA-8957275		Fosforilação pós-traducional de proteína	SERPIND1; ALB; APOA1
R-HSA-381426		Regulação do transporte da <i>Insulin-like Growth Factor</i> (IGF) e transportada por <i>Insulin-like Growth Factor Binding Proteins</i> (IGFBPs)	SERPIND1; ALB; APOA1; PLG
R-HSA-8964058	TM	Remodelação HDL	ALB; APOA1; SAA4; AFM
R-HSA-2168880	Transporte mediado por vesículas	Remoção (<i>scavenging</i>) de heme do plasma	ALB; IGLC6; HP; APOA1
R-HSA-2173782		Ligação e captação de ligantes pelos receptores <i>Scavenger</i>	ALB; IGLC6; HP; APOA1

p-valor < 0,005; FDR < 0,05. TM: transporte de pequenas moléculas

(a)



(b)

Principais vias de sinalização

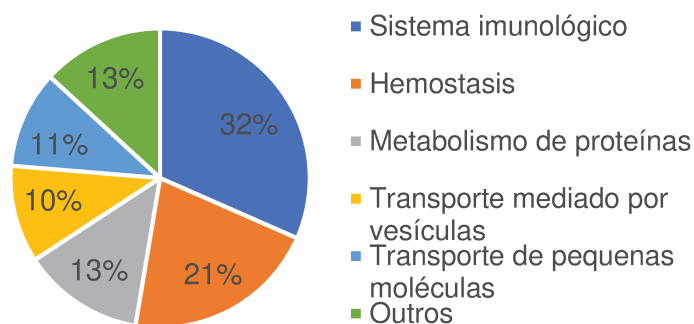


Figura 2.5. Classificação das proteínas diferencialmente abundantes identificadas em processos biológicos (BP) e vias nas quais participam, e sua quantidade relativa (%). (a) GO *terms* representados para a categoria BP e principais processos coloridos. A linha vertical indica um p -valor de 0,05. (b) Principais vias de sinalização alteradas determinadas pelo REACTOME.

Tabela 2.7. Análise de agrupamentos (*cluster*) significativamente enriquecidos de proteínas com abundâncias alteradas entre os grupos TB e ESZ calculados por DAVID *Bioinformatics Resources* 6.8

Termo	Score*	Proteínas
<i>Cluster 1</i>	4,29	
hsa04610: Cascata do complemento e coagulação		C8A, C8B, SERPINF2, C1R, CFI, SERPIND1, CPB2, PROS1, PLG, C8G
GO:0030449~regulação da ativação do complemento		C8A, C8B, CFI, PROS1, C8G
GO:0006958~ativação do complemento, via clássica		C8A, C8B, IGLC6, C1R, CFI, C8G
GO:0006956~ ativação do complemento		C8A, C8B, FCN3, IGLC6, C1R
Imunidade		C8A, C8B, FCN3, HP, C1R, CFI, C8G
GO:0005579~ <i>membrane attack complex</i>		C8A, C8B, C8G
<i>Cluster 2</i>	3,95	
GO:0042730~ fibrinólise		SERPINF2, CPB2, PROS1, PLG
Coagulação / hemóstase		SERPIND1, CPB2, PROS1, PLG
<i>Cluster 3</i>	2,95	
GO:0004252~atividade de endopeptidase do tipo serina		FCN3, IGLC6, HP, C1R, CFI, PLG
<i>Cluster 4</i>	2,87	
GO:0004866~atividade do inibidor de endopeptidase		SERPINF2, ITIH4, SERPIND1, PROS1

* Enriquecimento: p -valor < 0,001 e FDR < 0,05.

A fim de investigar melhor como as proteínas listadas estão relacionadas entre si, a topologia da rede IPP global foi avaliada com base nas informações disponíveis (182,183). Assim, a relação entre as proteínas listadas na **Tabela 2.3**, (exceto IGLC6 - proteína não encontrada no banco de dados String) estão representadas na rede (**Figura 2.6**). Adicionalmente, mostra os valores $\log_2(FC)$ referentes a ambas as condições (ESZ/TB) desde a tonalidade verde (menor abundância relativa) até a vermelha (maior abundância).

Na rede, uma proteína é mostrada como um nodo circular e uma interação proteína-proteína entre duas proteínas (ou genes) são mostrados como uma linha (também chamada de 'borda') entre as proteínas. O enriquecimento com IPP apresentou $p = 1,0E-16$, o que significa que os nodos têm mais interações entre si do que seria esperado para um conjunto aleatório de proteínas de tamanho semelhante contrastadas no genoma. Então, indica que essas proteínas estão parcialmente conectadas biologicamente como um grupo. Foram considerados o corte de confiança (*scores*) $> 0,6$ e FDR $< 0,05$ para a lista de proteínas no software Cytoscape.

Estas análises de anotação funcional e enriquecimento das vias de sinalização sugeriram que TB e ESZ compartilham padrões funcionais comuns. As proteínas diferenciais identificadas estavam envolvidas nos mesmos processos e vias biológicas, indicando um mecanismo alterado semelhante entre as doenças, o que pode refletir uma característica da doença ou uma resposta ao progresso do tratamento. A rede IPP mostra dois nodos centrais, CPB2 e ALB sutilmente conectados pelos agrupamentos de fibrinólise/hemóstase e de atividade do inibidor da endopeptidase tendo como intermediária a PLG. Em contrapartida, a CPB2 participa, além do *cluster* fibrinólise/hemóstase, nas cascatas de complemento e coagulação, especificamente.

O primeiro nodo, CPB2, está envolvido no mecanismo de regulação cruzada para o equilíbrio do sistema de fibrinólise/coagulação e ao mesmo tempo é capaz de regular as respostas inflamatórias através da inibição do complemento (184,185). Portanto, devido ao seu papel intermediário entre esses dois processos torna esta proteína de interesse. O *cross-talk* entre os sistemas complemento e de coagulação já foi discutido, destacando atividades comuns como a manutenção da hemostasia e estando implicadas na patogênese de doenças (186,187). Isso pode explicar o agrupamento apresentado na **Tabela 2.7**, em que as cascatas de complemento e coagulação apresentam o maior *score* e também pode explicar o elevado número de interações da CPB2 com as outras proteínas. Além disso, não há evidência na literatura relacionada à disfunção do sistema de coagulação para TB, enquanto há para ESZ (188).

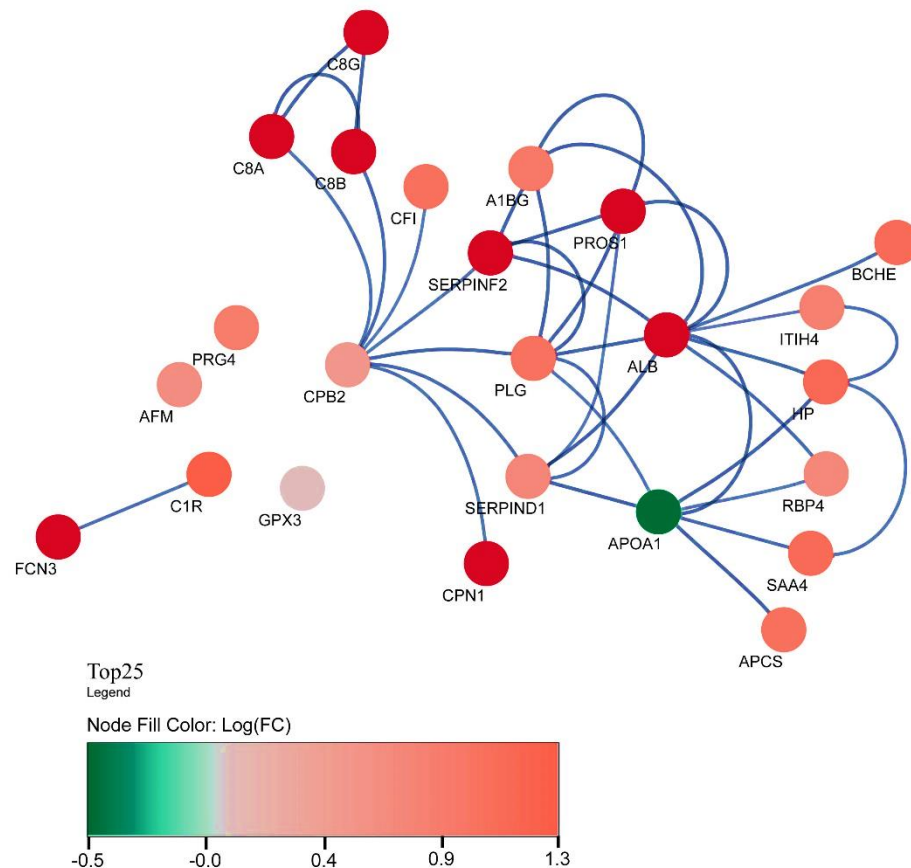


Figura 2.6. Interactoma de ESZ e TB: interactoma de ambos os transtornos psiquiátricos é mostrada como um gráfico, onde as proteínas* são mostradas como nós e as IPPs como bordas conectando os nós. Nós coloridos de acordo com $\log_2(FC)$ determinados para ESZ/TB: nós verdes proteínas com menor abundância, enquanto vermelhos para proteínas com maior abundância. IPP: interação proteína-proteína. *Proteínas listadas na **Tabela 2.3**, exceto IGLC6. Gráfico obtido pelo *app* Sting do Cytoscape.

Por outro lado, um segundo nó, ALB, envolve uma das proteínas mais abundantes e uma de suas principais propriedades é atuar como uma proteína transportadora, uma vez que possui a capacidade de interagir com uma infinidade de ligantes (189). Como pode ser visto na **Tabela 2.6**, a ALB participa de mais de uma via, o que explica o porquê possui um maior número de interações.

A **Figura 2.5b** destaca a relação de mais de 50 % das proteínas identificadas na lista como elementos da via de resposta imune e hemóstase para ambos os transtornos psiquiátricos, estando de acordo com a análise bioinformática realizada e com a literatura. Dentre as proteínas com propriedades antioxidantes,

encontrou-se que os níveis séricos de RBP4 foram menores do que os controles para ambos os transtornos. Estudos divergentes tentam entender a relação desta proteína e seu envolvimento na síndrome metabólica (MetS) e em disfunções vasculares devido à sua correlação com alguns marcadores de risco de doença cardiovascular (DCV) (190). Juntamente com a proteína GPX3, a RBP4 está associada ao estresse oxidativo e na resposta inflamatória como um antioxidante (191,192). Além disso, na literatura está descrito que uma diminuição do nível de GPX3 é proporcional ao aumento do risco de trombose arterial em resposta à superprodução de espécies reativas de oxigênio (ROS) (193).

Comes *et al.* realizaram uma abordagem sistemática para resumir as proteínas plasmáticas e/ou séricas identificadas como biomarcadores para três transtornos psiquiátricos, TB, ESZ e MDD (transtorno depressivo maior), e relataram aterosclerose juntamente com sinalização de resposta de fase aguda entre as vias significativas compartilhadas entre TB e ESZ (194). Quanto às vias do complemento, elas foram apenas descritas anteriormente em estudos de ESZ (175,195).

Com relação aos efeitos antipsicóticos, os níveis de proteínas (como APOA1, C8B e RBP4) e as vias mencionadas anteriormente (resposta da fase aguda e sistema de complemento) foram relatadas como moduladas após o tratamento com risperidona e olanzapina, respectivamente (129,196). Curiosamente, existem estudos que empregam análises estatísticas multivariadas comparando o grupo saudável com pacientes com ESZ no primeiro surto e após diferentes tratamentos com antipsicóticos, não mostrando nenhuma diferenciação de agrupamento significativo na análise de componentes principais (PCA) entre os grupos tratados com ESZ e antes do tratamento, mesmo que um deles tenha empregado um $n < 10$ em um dos grupos comparados, enquanto o outro tenha empregado um $n > 20$ (197,198). Segundo Todorov *et al.* (199), para estimar os efeitos de algum tratamento em estudos clínicos é vantajoso utilizar um tamanho amostral adequado (acima de 20 por grupo) para que o poder de diferenciação de grupos por análises multivariadas não seja significativo em relação àqueles determinados por análises univariadas. Este é um detalhe de importância a ser aprofundado, uma vez que no tratamento estatístico univariado deste trabalho mostraram resultados opostos, apesar de ter uma referência com n pequeno, e precisa ser confirmado em outros estudos e definir se há ou não diferenças significativas referentes ao tratamento para este transtorno.

Li *et al.* (175) realizaram experimentos de validação para a via de ativação do complemento para ESZ e demonstraram que os níveis da via alternativa, originalmente regulados negativamente, são restaurados aos reportados nos indivíduos controle após o tratamento com antipsicótico (clozapina). Já a via clássica não mostrou diferença antes e depois da clozapina ou qualquer outro tratamento com antipsicótico, mantendo os níveis superiores aos dos controles saudáveis. Em contraste com os achados deste trabalho (**Figura 2.5a**), as proteínas envolvidas na via alternativa e na via clássica apresentaram-se em níveis maiores em comparação com controles saudáveis. Embora o grupo estudado não estivesse sob tratamento exclusivo com um único antipsicótico (clozapina), o tratamento combinado pode ter um melhor desempenho, aumentando os níveis da via alternativa e não afetando a via clássica.

Embora não tenhamos informações sobre essas vias em pacientes com TB, destacam-se os fármacos quetiapina e a olanzapina. Apesar de serem antipsicóticos, eles não têm efeito na restauração dos níveis das proteínas que constituem a via alternativa (em níveis menores ao CS), ou isso pode ser devido ao uso combinado com estabilizadores de humor. Além disso, vale ressaltar que embora a IGLC6 tenha sido relacionada ao processo de ativação do complemento neste estudo, não há informações disponíveis desta proteína relacionada aos transtornos, o que é interessante porque a mesma apresentou níveis inferiores em ambas as condições. Portanto, não é possível inferir se é uma alteração decorrente da doença ou da resposta ao tratamento.

Nesse ponto, é perceptível a presença das proteínas moduladas do processo inflamatório, o que já se correlaciona no diagnóstico de ambas as doenças (200,201). Apesar do tratamento, esse desbalanceamento do processo é mantido, indicando que essas mudanças estão relacionadas à doença, não a uma resposta ao tratamento. Além disso, sabe-se que a atividade do complemento contribui para o sistema imunológico inato (202); entretanto, mais estudos são necessários para entender a participação deste processo no desenvolvimento de ambas as doenças.

Finalmente, uma representação de potenciais comorbidades relacionadas a TB e ESZ é relatada como uma rede (**Figura 2.7**) usando a ferramenta ToppCluster (<https://toppcluster.cchmc.org/>) (203). Dentre todas as doenças associadas à lista de proteínas submetida, selecionamos DCVs como uma comorbidade de interesse, uma

vez que MetS é relatada na literatura como efeito colateral de antipsicóticos, em ambos os tratamentos dos transtornos, que aumentam a obesidade e o risco cardiovascular (13,204–206).

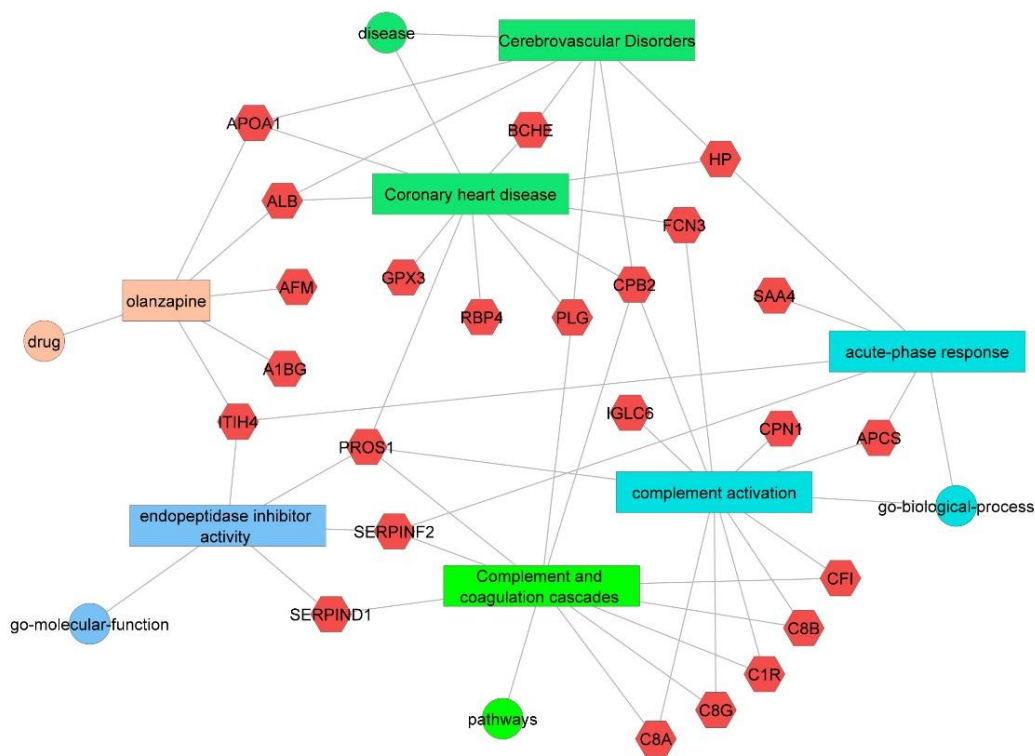


Figura 2.7. Relação entre enriquecimento das proteínas diferenciadas, vias, termos GO, doenças e fármacos. A análise de associação funcional foi realizada por ToppCluster. Hexágono vermelho: proteína diferenciada.

Portanto, as DCVs correspondentes são doenças coronárias e neurovasculares. Para as interações fármaco-proteína, o único fármaco encontrado no banco de dados DisGeNET foi a olanzapina (OLZ), um fármaco antipsicótico eficaz para tratamento de ESZ e TB, em concordância com o mencionado previamente. Além disso, a rede mostra associações entre os termos e as vias de sinalização do GO com as DCVs, o que aponta que os processos funcionais discutidos participam de alguma forma nessas doenças, podendo ser indicativo de risco durante o transcurso do tratamento. As proteínas relacionadas a essas doenças são PLG, CPB2, FCN3 e HP e, de acordo com a **Tabela 2.7**, participam da fibrinólise e da resposta imunológica.

Dentre as proteínas com interações relacionadas a OLZ-DCVs apresentadas na **Figura 2.7** destacam-se duas: albumina sérica humana e

apolipoproteína A1. A afinidade de ligação da albumina sérica humana com fármacos é um dos principais fatores para a biodisponibilidade e a meia-vida dos fármacos no tecido alvo (207,208). Em particular, para a farmacodinâmica da OLZ, a dinâmica de interação nos sítios de ligação de ALB sugeriu uma alta afinidade para esta proteína, diminuindo a biodisponibilidade do fármaco e o efeito do medicamento em altas expressões (209). Em contraste com este estudo, uma vez que OLZ estava entre os antipsicóticos usados apenas no grupo TB, uma diminuição na abundância relativa de ALB em comparação com CS pode levar a uma maior biodisponibilidade relativa de OLZ, podendo explicar o aumento de risco de DCVs nos pacientes tratados com esse fármaco. Esta última é uma hipótese interessante, porque níveis opostos de ALB significativos foram determinados no grupo ESZ (**Tabela 2.4**). Com base neste fato e em uma interação existente entre clozapina e ALB (210), chega-se à ideia de que a ALB não interfere com a biodisponibilidade relativa da clozapina, apesar de ambos os fármacos possuírem o mesmo esqueleto molecular estrutural (**Figura 2.8**); então, o baixo nível atual da ALB poderia ser atribuído ao tratamento com OLZ .

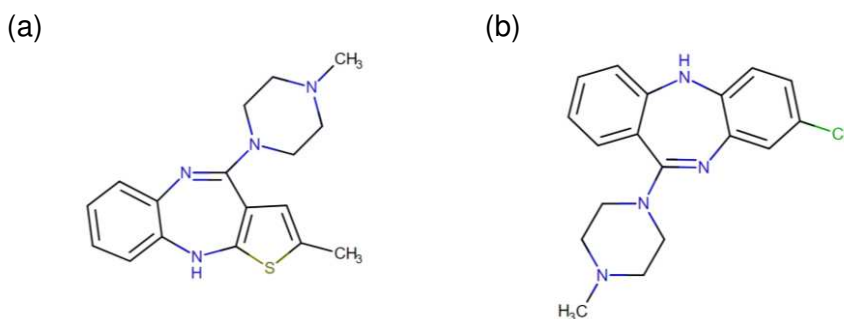


Figura 2.8. Estrutura molecular de (a) olanzapina e (b) clozapina.

Por outro lado, as apolipoproteínas têm funções importantes no transporte de lipídeos, proteção cardiovascular, mas também potencial relação com a função neuronal, por causa de sua participação nas células gliais, especificamente a capacidade de APOA1 de cruzar a barreira hematoencefálica (211,212). Além disso, os níveis de apolipoproteína foram correlacionados com MetS em ESZ (213) onde APOA1, entre outras, é considerada como um biomarcador de diagnóstico de DCVs e indicador de sobrepeso pela determinação da razão APOB/APOA1 (214,215). Corroborando com os resultados aqui apresentados, verificou-se que os níveis de APOA1 estão diminuídos em ambos os distúrbios. No entanto, a relação

APOB/APOA1 foi significativamente maior apenas para o grupo ESZ em comparação com CS ($p = 0,006$) e TB ($p = 0,026$), o que pode ser justificado devido ao presente excesso de peso entre os participantes ESZ, sendo este estado altamente provável de ser resultado do tratamento com antipsicóticos, como mencionado anteriormente. Portanto, os últimos resultados sugerem os pacientes com ESZ como um possível grupo de risco a desenvolver doença cardiovascular.

Contudo, as interações mostradas na **Figura 2.7** parecem fazer sentido apenas para ESZ conforme foi descrito. Os pacientes com ESZ neste estudo estavam sob tratamento com clozapina e não receberam tratamento com OLZ, enquanto que os pacientes com TB receberam OLZ combinado com quetiapina e risperidona. Além disso, embora esses dois últimos não tenham aparecido na rede, espera-se que apareçam em futuras análises de interações de proteína-fármaco, uma vez que compartilham alguns alvos (<https://go.drugbank.com/>), incluindo efeitos colaterais associados à MetS e levando a possíveis riscos cardiovasculares (216). Portanto, há valor científico em avaliar melhor a relação entre APOA1, ALB e DCVs causadas por outros antipsicóticos.

5. Conclusões parciais

Em relação à discussão sobre a existência de vias fisiopatológicas compartilhadas ou diferentes entre TB e ESZ, o presente Capítulo indica que ambos os transtornos psiquiátricos apresentam variações predominantes nas vias de sinalização do sistema imunológico e de hemóstase, mais especificamente, no processo de cascata de complemento e coagulação.

Os resultados obtidos confirmam que o tratamento com antipsicóticos têm um efeito positivo na via do complemento para pacientes com ESZ, ao passo que, para TB, essa via é preservada independentemente do tratamento combinado com antipsicóticos.

Níveis maiores ou superexpressão da via clássica do complemento é uma característica da ESZ e, nos resultados apresentados, os níveis ainda são elevados apesar do uso de um tratamento combinado. Algumas proteínas diferenciais foram confirmadas com a literatura e conformam um novo conjunto de proteínas que

apresenta um nível diferenciado após o tratamento participando de processos biológicos já descritos na literatura.

Dentre as limitações no desenvolvimento desse Capítulo, inclui-se o número relativamente pequeno de amostras de indivíduos locais e informações sobre o perfil lipídico clínico do paciente. Portanto, não é possível generalizar os resultados do estudo para toda a população e este precisa ser replicado com número de amostras maiores. Ademais, os presentes resultados precisam ser validados para garantir as identidades das proteínas discutidas. Porém, conforme sugerido por outros autores, concordamos com a necessidade de intervenção e monitoramento adequados para ambas as doenças consideradas como grupo de alto risco para DCVs, especificamente neste grupo de pacientes estudado.

CAPÍTULO 3

Estudos de proteômica redox – marcação por dimetilação seletiva de cisteína oxidada (OxCysDML)

1. Revisão bibliográfica

1.1. Estresse oxidativo

As reações de oxidação e redução (reações redox) em sistemas biológicos representam a base para numerosos mecanismos bioquímicos e alterações metabólicas. No contexto de sistemas biológicos, ao invés de empregar os termos agente redutor e agente oxidante, os mesmos são denominados como antioxidante e pró-oxidante, respectivamente. Sendo o antioxidante a substância que doa elétrons, o pró-oxidante é a substância que aceita elétrons (217,218).

As espécies pró-oxidantes foram definidas como substâncias químicas que induzem o estresse oxidativo, geralmente através da formação de espécies reativas ou inibição de sistemas antioxidantes. Elas podem derivar a partir do oxigênio, nitrogênio e enxofre, criando assim, espécies reativas de oxigênio (ROS), de nitrogênio (RNS) e de enxofre (RSS). Quanto ao termo antioxidante, a definição é de qualquer substância que impeça a oxidação das biomoléculas, eliminando diretamente as ROS ou indiretamente, através da regulação positiva das defesas antioxidantes ou inibição da produção de ROS. As reações podem ser enzimáticas ou não enzimáticas, de natureza endógena ou exógena (219,220).

Helmut Sies forneceu em 1985 o conceito inicial de estresse oxidativo, focado no dano a biomoléculas como DNA, lipídios e proteínas. Este conceito foi estendido para incluir o papel emergente dos oxidantes biologicamente gerados na sinalização redox (221). Após duas décadas, o termo foi redefinido, assim, o estresse oxidativo consiste no desequilíbrio entre espécies oxidantes e antioxidantes, com prevalência da primeira, levando a uma perturbação na sinalização e controle redox e/ou dano molecular (222,223).

A maioria das proteínas depende de cofatores orgânicos e inorgânicos para a atividade redox, entre eles: NAD⁺ (dinucleotídeo de nicotinamida e adenina), FAD (dinucleotídeo de flavina e adenina), grupo heme, Cu, Fe, dentre outros metais de transição. Por outro lado, para outras proteínas, os resíduos de aminoácidos são responsáveis por essa propriedade, sendo que os quatro aminoácidos principais são triptofano, treonina, cisteína e glicina (224). A modificação oxidativa de grupos críticos nas proteínas constitui um mecanismo de tradução de sinal, acoplando o estado redox

da proteína à sua função e atividade. No geral, a sinalização redox é um componente intrínseco e altamente regulado do metabolismo celular, controlando o crescimento, diferenciação, adaptação e morte celular, sendo importante em processos fisiológicos e patológicos (225,226).

1.2. Proteômica redox

A proteômica redox é uma subárea da proteômica com o objetivo de identificar proteínas oxidadas e determinar a extensão e a posição das modificações oxidativas nos proteomas de interesse (227). A oxidação de proteínas não é necessariamente prejudicial. O mecanismo de sinalização e controle redox envolve, em grande parte, a modificação oxidativa das cadeias laterais de aminoácidos nas proteínas pelo peróxido de hidrogênio, seguindo a ordem decrescente em reatividade e reversibilidade biológica: cisteína > metionina > prolina > histidina > triptofano (221,228).

Sabe-se que a cisteína, dentre os 20 aminoácidos naturais, é um dos aminoácidos presentes em quase todas as proteínas. É altamente reativa e envolvida em processos biológicos como reconhecimento celular e sinalização apoptótica e imune, homeostase celular e química redox (229,230). Esse notável nível de reatividade é devido ao grupo tiol livre (-SH) da cadeia lateral. Neste grupo, a diferença de eletronegatividade entre o átomo de enxofre e o de hidrogênio é pequena, fazendo a ligação S-H menos polarizada quando comparada com a ligação O-H, criando, assim, uma menor tendência a formar ligações de hidrogênio (230,231). O resíduo ativo da cisteína, o tiolato (-RS⁻), é um nucleófilo forte e reage com espécies oxidantes e eletrofílicas, embora interações com resíduos específicos ou metais possam também estabilizar o tiolato. Além disso, o tiolato possui uma química redox muito versátil, já que o átomo de enxofre pode sofrer transições para qualquer estado de oxidação entre +6 e -2. O grupo tiol da cisteína pode desempenhar uma variedade de reações sob condições fisiológicas como, por exemplo, transferência de hidreto, sulfenilação, sulfonilação, entre outras (232).

Tanto em células como em tecidos, cerca de 5 a 12 % do total das cisteínas nas proteínas está oxidada, e pode incrementar a valores maiores que 40 % pela atividade de oxidantes. A oxidação ocorre através de reações de um ou dois elétrons,

produzindo radical *thiyl* ($-RS\cdot$) ou ácidos sulfênicos e dissulfênicos, respectivamente (233). Além disso, eles são propensos à oxidação reversível e irreversível por ROS e efetuam *S*-nitrosilação com óxido nítrico (NO) (ver **Figura 3.1**) (234).

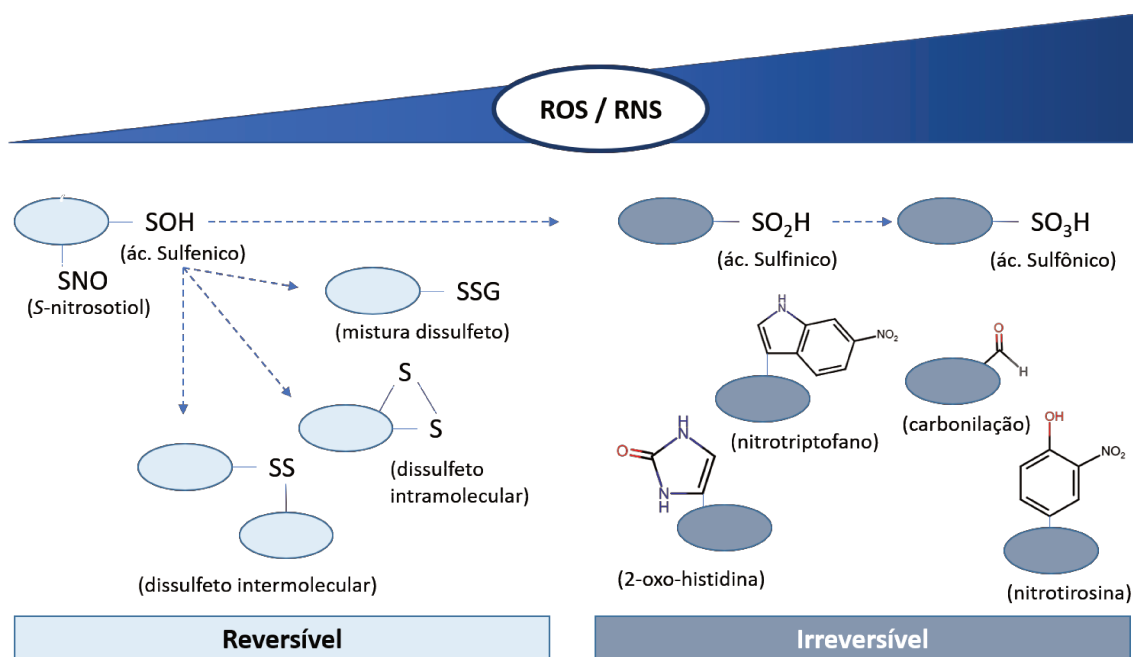


Figura 3.1. Modificações pós-traducionais (PTMs) oxidativas das proteínas que possuem grupo tiol da cisteína frente aos níveis das espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS). Adaptação de (235).

Dentre as oxidações reversíveis, a transformação de tiol a ácido sulfênico (R-SOH) a partir do peróxido de hidrogênio, reação também conhecida como sulfenilação, promove uma mudança de +16 Da. O produto gerado na reação catalítica das peroxiredoxinas (Prxs), por exemplo, pode ser estabilizado dentro de certos microambientes proteicos. Uma vez que as Prxs são oxidadas, reagem com o resíduo tiol de outra Prx, formando uma ligação dissulfeto intermolecular catalisada por tioredoxina (Trx) (236,237).

O tripeptídeo glutationa (Glu-Cys-Gly, GSH) é vital intra e extracelularmente em mamíferos e apresenta diversas funções biológicas, entre elas, a manutenção do equilíbrio redox intracelular (238). Similarmente às Prxs, esta enzima possui propriedades antioxidantes e protege o tiol de oxidações irreversíveis durante o estresse oxidativo, através de um mecanismo chamado *S*-glutathionilação,

gerando proteínas glutationadas (R-SSGs), acontecendo sob condições fisiológicas normais. Deste modo, é possível indicar a participação de GSH na modulação da atividade de proteínas como mediadores de sinalização envolvidos nos processos celulares e sinalização redox (239).

As ligações dissulfeto proporcionam uma característica estrutural que ocorre durante o enovelamento de proteínas no ambiente oxidante. Atualmente, tem-se proposto que as ligações são intercambiáveis dinamicamente no ambiente redox, o que altera a conformação, associação e função das proteínas (240).

Por outro lado, quando se encontra sob estresse oxidativo, o ambiente é altamente oxidante e o ácido sulfênico é geralmente vulnerável à oxidação irreversível ao ácido sulfínico ($R - SO_2H$) e ácido sulfônico ($R - SO_3H$) com alterações de massa de +32 e +48 Da, respectivamente. Diferentemente do R-SH e do R-SOH, os derivados de ácido sulfínico e sulfônico não sofrem redução por GSH ou Trx em condições fisiológicas. Além disso, processos como nitrosilação do triptofano e tirosina, ou hidroxilação da histidina e carbonilação de proteínas podem ocorrer sob efeito de níveis altos de ROS ou RNS, resultando na perda da função da proteína, desenovelamento, acumulação, ou degradação que em consequência gera dano celular (241,242).

Na literatura, diversos estudos indicam o estresse oxidativo envolvido no processo de envelhecimento (243) e dos principais processos de doenças, incluindo as cardiovasculares (244,245), diabetes (246), as neurodegenerativas (247,248) e câncer (249).

1.3. Estresse oxidativo em transtorno bipolar e esquizofrenia

Existem evidências que o estresse oxidativo está envolvido em patologias no sistema nervoso central (SNC) e que pode estar envolvido em diversos transtornos neuropsiquiátricos (250). Embora esta não seja a causa principal, o dano oxidativo tem sido interpretado como um processo patogênico comum que contribui com o declínio do curso ou com o mau resultado do tratamento desta doença (251,252).

Apesar de o cérebro possuir a maior atividade oxidativa, correlações de biomarcadores periféricos que refletem o estado do SNC em pacientes com ESZ vêm sendo descobertos. Considerando o tamanho do SNC em comparação com os outros

compartimentos do corpo humano, parece razoável supor que alterações nos níveis de enzimas no interior do cérebro possam refletir em seus níveis plasmáticos (253).

Estudos com amostras de plasma e soro sanguíneo de pacientes com transtorno bipolar reportaram alterações significativas em enzimas antioxidantes, mostrando uma relação diretamente proporcional entre o aumento do estresse oxidativo e a ativação das defesas antioxidantes em referência às fases psiquiátricas da doença: maníaca e eutímica (254,255). Além disso, a ocorrência de peroxidação de lipídios vêm sendo relatada em pacientes com transtorno bipolar nas fases de mania, hipomania, depressão e na progressão da doença (256,257).

Uma diminuição da defesa antioxidante em pacientes com ESZ sob tratamento crônico com antipsicóticos foi verificada por Altuntas *et al.* (258).

Quando diferentes biomarcadores para as duas doenças foram avaliados, encontrou-se que apenas a peroxidação lipídica é relevante na patogênese de pacientes bipolares, enquanto que, a oxidação de proteínas é notória em ESZ e que, espécies totais de guanina oxidada podem ser cruciais em ambos os transtornos psiquiátricos (259).

1.4. Técnicas analíticas aplicadas para a quantificação de proteínas redox

A proteômica quantitativa por espectrometria de massas é uma ferramenta essencial para mensurar a abundância relativa e absoluta de proteínas com a finalidade da descoberta de biomarcadores de doenças e proporcionar informações sobre os processos biológicos (105). Como mencionado nos itens anteriores, a cisteína pode estar sujeita a diversas PTMs oxidativas e são importantes na compreensão de algumas doenças.

Dentre os métodos químicos de marcação de proteínas e peptídeos, qualquer grupo reativo pode ser modificado usando rótulos de isótopos estáveis. Contudo, a maioria das técnicas têm como alvo o N-terminal e a lisina nas cadeias laterais. Os dois métodos mais populares baseados na marcação de aminas primárias, *tandem mass tags* (TMTs) (260) e marcação isobárica para quantificação relativa e absoluta (iTRAQ) (261), empregam reagentes construídos de modo que peptídeos de amostras marcadas diferencialmente tenham massa idêntica (isobárica), mas possam ser distinguidos após fragmentação no espectrômetro de massas pelos

íons repórteres numa faixa de baixa massa dos espectros tandem de MS (MS2) e quantificados com base em suas intensidades relativas (mencionado no Capítulo 2) (262).

Como alternativa dentro dos métodos de quantificação relativa, a marcação de cisteínas tem sido empregada com a finalidade de diminuir a complexidade das amostras e acrescentar a detecção de proteínas de baixa abundância. Assim, os resíduos de cisteína podem ser retidos indiretamente por diferentes métodos, por exemplo, cromatografia de afinidade biotina/avidina, onde a fase estacionária tem como ligante a avidina, que se liga ao reagente biotilado (263), ou, ainda, por marcação química ou enriquecimento por meio de anticorpos (264).

O primeiro método desenvolvido com seletividade à cisteína é a marcação de afinidade codificada por isótopos (ICAT) (265), constituída por um reagente que possui três partes (**Fig. 3.2**): um marcador de afinidade (biotina), usado para isolar os peptídeos marcados, uma região ligante que pode incorporar até 8 isótopos estáveis, e um grupo reativo com especificidade para grupos tiol (cisteína). O reagente existe em duas formas, pesado (contém deutério) e leve (não contém deutério) (266).

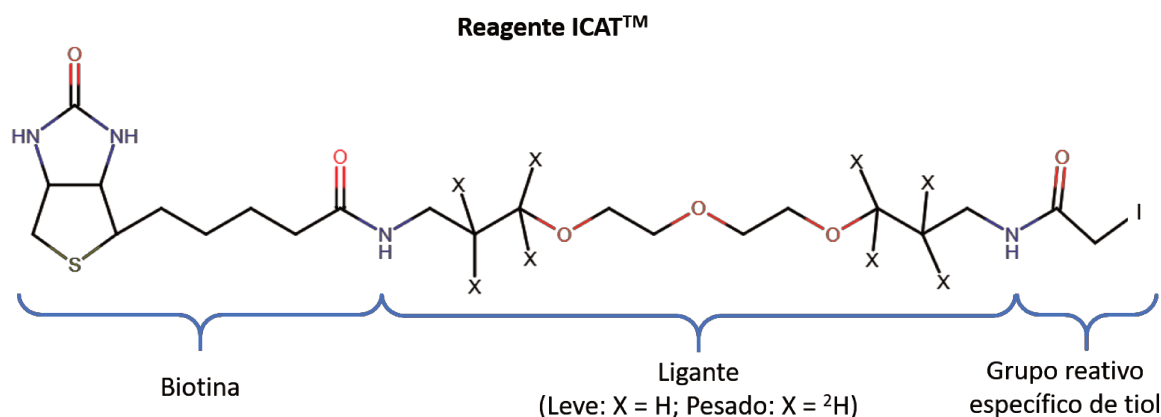


Figura 3.2. Estrutura do reagente ICAT. Adaptação de (267).

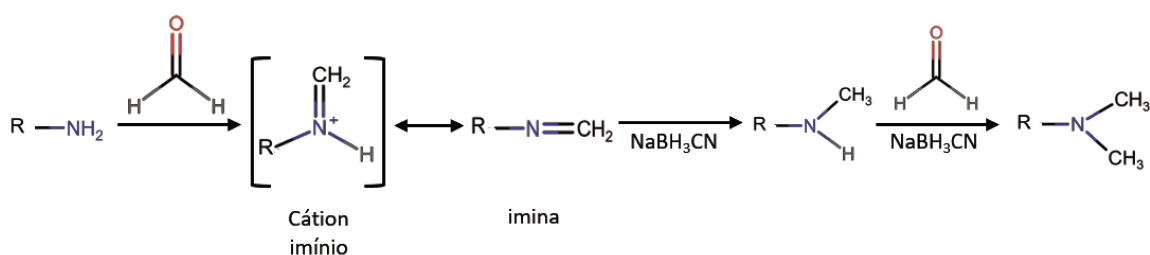
O método ICAT inclui as seguintes etapas: (I) Os resíduos cisteína das cadeias laterais de proteínas reduzidas na amostra representam o estado com marcação isotópica leve. Os grupos equivalentes em uma amostra representam um segundo estado com marcação pesada. (II) As duas amostras são combinadas e clivadas enzimaticamente para gerar fragmentos peptídicos, alguns dos quais são

marcados. (III) Os peptídeos marcados (aqueles que contêm cisteína) são isolados por cromatografia de afinidade com avidina. (IV) Finalmente, os peptídeos isolados são separados e analisados por nanoLC-MS/MS (267). Uma aplicação interessante da tecnologia ICAT é a caracterização de cisteínas ligadas à proteínas sensíveis à oxidação (268).

Em contraste com iTRAQ e ICAT, os quais consistem em *kits* comerciais, a marcação isotópica por dimetilação (DML) por aminação redutora empregando reagentes comerciais foi proposta, oferecendo melhor custo-benefício mediante procedimentos menos complexos (269). O uso da marcação DML supera outros, como iTRAQ e TMT, já que demonstra alto rendimento de reação e especificidade, reprodutibilidade na digestão e robustez (270,271).

A marcação DML (**Figura 3.3a**) é baseada na reação de amins primárias de peptídeos ou proteínas, onde tanto os grupos N-terminal e ϵ -amino dos resíduos lisina reagem com formaldeído para gerar uma base de Schiff. O cátion imínio intermediário é logo reduzido por cianoborohidreto de sódio (NaBH_3CN), formando uma amina secundária que é mais nucleofílica que a amina primária e imediatamente reage com outra molécula de formaldeído, resultando em uma amina terciária contendo dois grupos metila. Estas reações podem ocorrer entre pH 5 e 8,5 produzindo picos que diferem em 4 unidades de massa para cada par isotópico derivado (272,273).

(a)



(b)

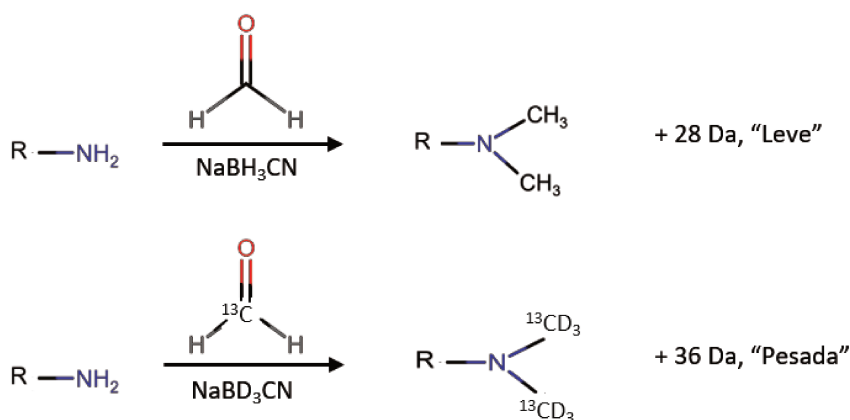


Figura 3.3. (a) Mecanismo de reação da marcação por dimetilação, (b) esquema de marcação “leve” e “pesada”, com o deslocamento de massa.

Como pode ser observado na **Figura 3.3b**, a combinação de formaldeído e cianoborohidreto comum (sem marcação isotópica) gera um aumento de massa de 28 Da por amina primária no peptídeo (marcação leve). De forma semelhante, é obtida a marcação pesada, onde a massa é aumentada em 36 Da quando empregado formaldeído deuterado com ^{13}C e cianoborohidreto deuterado de sódio.

1.4.1. Dimetilação de cisteína oxidada (OxCysDML)

Recentemente, Gu *et al.* propuseram os métodos de dimetilação seletiva de cisteína (CysDML) (274), onde a principal diferença reside em que os peptídeos de cisteinil estão ligados em uma resina de *Thiopropyl Sepharose* 6B disponível comercialmente e os peptídeos ligados são marcados na resina com marcadores dimetil isotopólogos. Novos métodos na abordagem proteômica redox envolvem uma extensão para a cisteína oxidada (OxCysDML) (275), sendo este último o método empregado neste trabalho.

No *workflow* para o ensaio OxCysDML (**Figura 3.4**), é necessário realizar a proteção ou bloqueio dos grupos tiol livres das proteínas com uma alta quantidade de N-etilmaldeimida (NEM) para minimizar reações paralelas. Após a remoção do excedente de NEM, é adicionado ditioneitol (DTT) para reduzir qualquer modificação reversível na cisteína. Assim, após a digestão com tripsina, os peptídeos recém-

formados contendo grupos sulfidrila serão enriquecidos na resina *Thiopropyl Sepharose* 6B por afinidade. Em seguida, é realizada uma série de lavagens para a retirada de peptídeos que não possuam afinidade com a resina.

Durante a marcação na resina, ambas as condições são tratadas separadamente com um dos isotopólogos de dimetila, leve ($-C_2H_6$) ou pesado ($-^{13}C_2^2H_6$). Depois, os peptídeos são eluídos da resina com DTT e alquilados com iodoacetamida. As amostras marcadas podem então ser misturadas, pois os diferentes isótopos não afetam o comportamento dos peptídeos marcados na análise por LC-MS. Em espectrometria de massas, os diferentes peptídeos marcados isotopicamente podem ser reconhecidos pela diferença de massa conhecida entre eles. Por fim, a quantificação pode ser realizada comparando a intensidade ou áreas de pico do sinal dos peptídeos marcados diferencialmente, fornecendo uma leitura direta da abundância relativa de proteínas nas amostras (269).

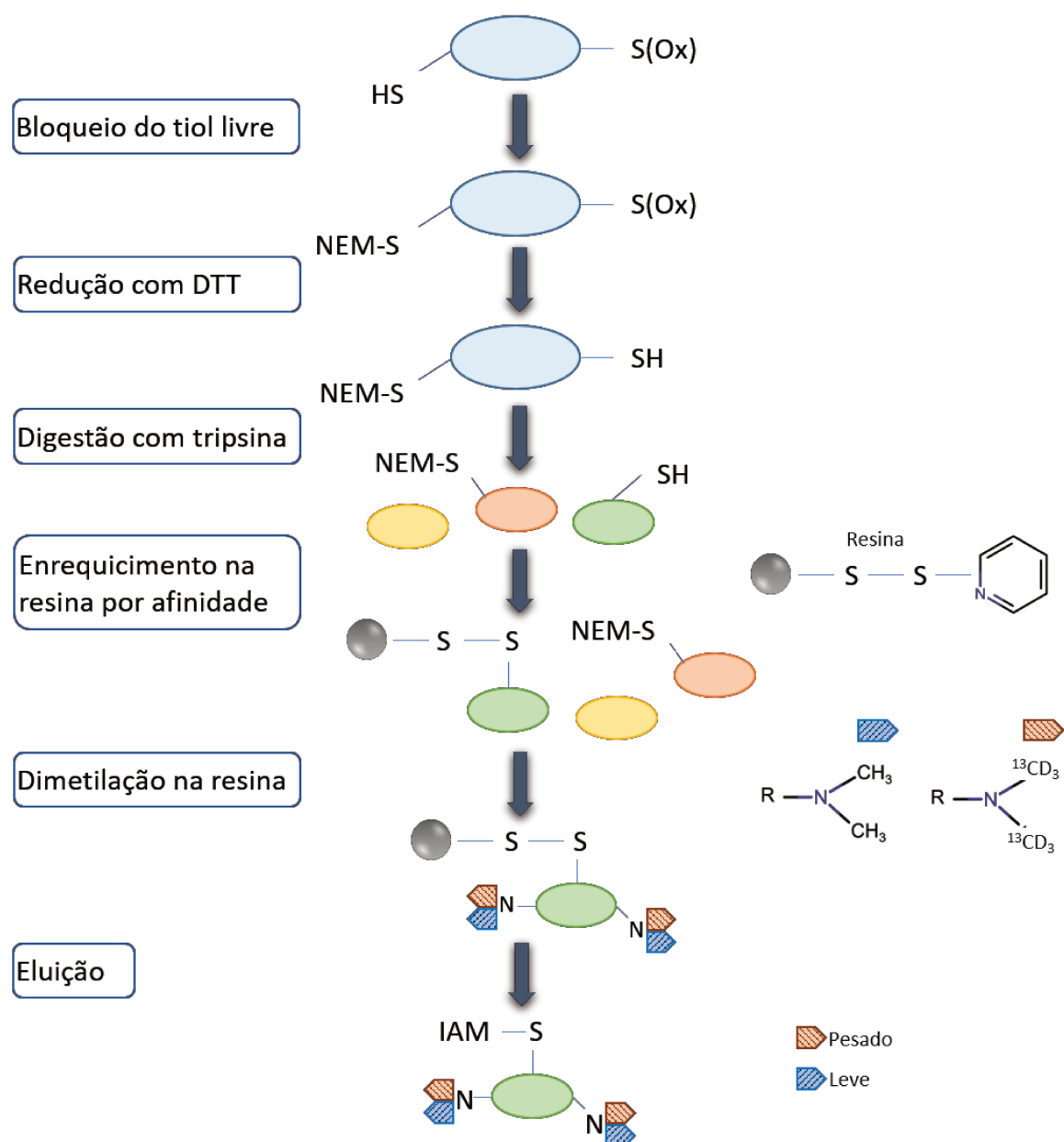


Figura 3.4. Representação do workflow para o método de dimetilação da cisteína oxidada (OxCysDML). Adaptação da referência (275).

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

O objetivo deste estudo piloto foi a identificação de proteínas que contêm cisteína oxidada, relevantes para o estudo de biomarcadores de estresse oxidativo, pelo método de dimetilação de cisteína oxidada (OxCysDML).

2.2. Objetivos específicos

- Depletar as proteínas de *pools* de soro sanguíneo dos participantes presentes nos grupos estudados por cromatografia líquida de proteínas (FPLC) usando a coluna de afinidade à albumina e imunoglobulina (Albumin & IgG).
- Aplicar o método proposto por Gu *et al.* para determinação de proteínas contendo cisteína oxidada (OxCysDML).
- Realizar um *flowthrough* para acompanhar o procedimento e avaliar as possíveis perdas de proteínas nele.
- Caracterizar as proteínas oxidadas identificadas por espectrometria de massas, usando equipamento do tipo nanoLC-ESI-QTOF-MS.
- Estabelecer as relações entre as proteínas identificadas e quantificadas diferencialmente e os transtornos psiquiátricos.

3. Parte Experimental

3.1. Materiais e reagentes

3.1.1. Equipamentos e materiais

- Balança analítica;
- Sistema de purificação de água Mili-Q, Milli-Q Advanced A 10 (Millipore, EUA);
- Cromatografia líquida de proteína rápida (FPLC) ÄKTA™ (GE Healthcare, Alemanha);
- Coluna de afinidade albumina e imunoglobulina (HiTrap Albumin & IgG, GE Healthcare, Alemanha);
- Centrífuga, modelo MIKRO 220R (Andreas Hettich, Alemanha);
- Microcentrífuga analógica de 7000 rpm (modelo: D1008, DLAB Scientific, China);
- Espectrofotômetro leitor de microplacas (Molecular Devices LLC, EUA);
- SpeedVac, modelo Concentrator Plus (Eppendorf, Alemanha);
- Termobloco de microtubos (Modelo: AccuTherm; Labnet International, EUA)
- Vórtex com velocidade variável de 0 – 2500 rpm (modelo: MX-S, DLAB Scientific, China);
- pH-metro;
- *Spin column* para reagentes Seppro (Merck, EUA);
- Cartuchos SepPak C18 Oasis (Waters, EUA);
- Resina *Thiopropyl Sepharose* 6B (Sigma-Aldrich, EUA);
- Reagentes de pureza analítica e solventes grau HPLC, provenientes de empresas J.T. Baker (EUA), Merck (EUA) e Sigma-Aldrich (Alemanha).

3.1.2. Tampões e soluções

- Solução tampão fosfato-salino (PBS);
- Tampão de homogeneização: 8 mol L⁻¹ ureia em PBS, pH = 7,2;
- Tampão de ressuspensão: 50 mmol L⁻¹ Tris, 8 mol L⁻¹ ureia, pH = 8,2;

- Tampão de redução: 1 mol L⁻¹ DTT em tampão de ressuspensão, pH = 8,2;
- Tampão de digestão: 20 mmol L⁻¹ Tris, pH = 8,2;
- Tampão de acoplamento: 50 mmol L⁻¹ Tris, 21 mmol L⁻¹ EDTA, pH = 7,5;
- Tampão de lavagem: 50 mmol L⁻¹ Tris, 1 mmol L⁻¹ EDTA, pH = 8,0;
- Tampões e soluções empregados para as lavagens na etapa de enriquecimento: tampão de lavagem, 2 mol L⁻¹ NaCl, e 80 % (v/v) ACN contendo 0,1 % (v/v) TFA.

3.2. Metodologia

3.2.1. Otimização e aplicação do método OxCysDML

Para a otimização do método, foi realizada uma análise piloto empregando *pools* de soro de pacientes dos grupos TB e CS. Assim, foram usadas três alíquotas do *pool* TB submetidas à marcação e quatro para CS, gerando 3 replicatas TB/ CS e um *flowthrough* para uma das amostras CS com a finalidade de avaliar as possíveis perdas de peptídeos ao longo do processo.

3.2.2. Depleção e quantificação de proteínas

Foi realizado o fracionamento das amostras de soro empregando uma coluna de bioafinidade *HiTrap Albumin & IgG* (GE Healthcare, Alemanha) de 0,7 x 2,5 cm (1 mL), com vazão de 1 mL min⁻¹ para separar as proteínas mais abundantes do soro (tais como albumina, IgG, etc.) e evitar possíveis interferências nas análises por MS. Uma alíquota de 70 µL de soro foi diluída no tampão de acoplamento (1:1) e centrifugada a 13 000 rpm a 4 °C por 10 minutos. Em seguida, foram injetados 100 µL da amostra em um equipamento Äkta Start FPLC (GE Healthcare, Alemanha) usando a coluna *HiTrap Albumin & IgG* (152). As frações depletadas foram coletadas e concentradas em SpeedVac a 30 °C por 5 h, até a obtenção de um volume final de aproximadamente 200 µL. Assim, para dar continuidade às demais etapas, foi necessário realizar a quantificação de proteínas empregando o método colorimétrico de Bradford usando albumina de soro bovino (BSA) como padrão na faixa de concentrações entre 1 e 25 µg L⁻¹ (153).

3.2.3. NEM – bloqueio e precipitação de proteínas com acetona

Após a quantificação das proteínas, alíquotas de 60 µg foram secas em SpeedVac até formar o *pellet* correspondente. Depois, as seguintes soluções foram preparadas com tampão de homogeneização: dodecil sulfato de sódio (SDS) 10 % (m/v) e 250 mmol L⁻¹ de N-etilmaldeimida (NEM). Em tubos Eppendorf de 1,5 mL foram adicionados separadamente 30 µg de proteínas de cada amostra, 25 µL de 10 % (m/v) SDS e 50 µL de 250 mmol L⁻¹ NEM, completando com tampão de homogeneização até um volume final de 250 µL. Imediatamente, as amostras foram cobertas com papel alumínio e agitadas durante 2 h à temperatura ambiente. Para retirar o excesso de NEM, foi realizada a precipitação das proteínas com acetona a -20 °C. A solução foi agitada e incubada em geladeira *overnight*. Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 13 000 *g* por 10 min a 4 °C para formação dos *pellets* e descarte da acetona. Para a redução das cisteínas oxidadas, os *pellets* foram dissolvidos em 100 µL de tampão de ressuspensão e 1 µL de tampão de redução. As amostras foram incubadas no termobloco a 37 °C por 1 h.

3.2.4. Digestão com tripsina

Considerando uma perda de 30 % de proteínas durante a precipitação com acetona (276), foram adicionados 21 µL de 20 ng µL⁻¹ tripsina (1:50 enzima/proteína). As amostras foram agitadas e deixadas em banho a 37 °C *overnight*. A reação foi interrompida adicionando-se 1-2 µL de ácido fórmico até obtenção de um pH menor do que 3. Por fim, as amostras foram dessalinizadas e secas usando colunas SepPak C18.

3.2.5. Redução de peptídeos e enriquecimento na resina

No dia de uso, preparou-se uma solução de 100 mmol L⁻¹ DTT em tampão de acoplamento. Adicionou-se 1 µL dessa solução às amostras com mais 20 µL de tampão de acoplamento, incubando-as em banho a 37 °C por 1 h. Para o condicionamento da resina, 35 mg de Sepharose 6B foram pesados aproximadamente em um tubo de 1,5 mL para cada amostra, sendo um total de seis tubos. A seguir, 1

mL de água desgaseificada foi adicionado a cada tubo e a solução foi mantida em repouso à temperatura ambiente por 15 min. Em seguida, a resina foi homogeneizada com uma pipeta de 1 mL e deixada em repouso à temperatura ambiente por mais 10 minutos. Em seguida, foram transferidas para diferentes *spin columns* e encaixadas em um suporte para tubos de 2 mL para centrifugação por 30 s a 1 000 *g* e remoção da água. Foram realizadas, em paralelo, lavagens com alíquotas de 450 μ L de água desgaseificada seis vezes, seguidas de lavagem com tampão de acoplamento repetida dez vezes. Todas as lavagens foram realizadas sob as mesmas condições de centrifugação.

Para o enriquecimento dos peptídeos nas *spin columns*, foram adicionados 79 μ L de tampão de acoplamento em cada amostra e estas foram transferidas à coluna. A base da coluna foi fechada e, esta, agitada por um período de 1 h à temperatura ambiente. As *spin columns* foram, então, transferidas a novos tubos de 2 mL sem a base da coluna e centrifugadas a 1500 *g* por 1 minuto para remoção de peptídeos não ligados. Para finalizar esta etapa, foram realizadas seis lavagens sequenciais com tampão de lavagem a alíquotas de 450 μ L, seis vezes com 2 mol L⁻¹ de NaCl, seis vezes com 80 % (v/v) ACN (contendo 0,1 % (v/v) TFA), e seis vezes com 1 % (v/v) ácido acético. Nesta parte, apenas as eluições das lavagens de um dos tubos com amostra controle foram coletadas e combinadas, para acompanhamento do *flowthrough*.

3.2.6. Dimetilação na resina

No dia de uso, soluções de 1 % (v/v) ácido acético, 4 % (v/v) formaldeído (CH₂O), 0,6 mol L⁻¹ cianoboroidreto de sódio (NaBH₃CN), 1 % (v/v) hidróxido de amônio e 100 mmol L⁻¹ brometo de tetraetilamônio (TEAB) em água foram preparadas. Para a dimetilação leve, as soluções usadas foram formaldeído e cianoborohidreto de sódio, CH₂O e NaBH₃CN, empregadas apenas nas amostras controle. Para a dimetilação pesada, as soluções usadas foram formaldeído deuterado e cianoborohidreto de sódio deuterado, ¹³CD₂O e NaBD₃CN, respectivamente, apenas para as amostras TB. Foram adicionados às amostras nas colunas, 100 μ L de 1 % (v/v) ácido acético, tampando a base da coluna e estas foram homogeneizadas sob agitação circular tipo vórtex. Em seguida, foram adicionados 8 μ L de 4 % (v/v) de formaldeído com agitação suave. Imediatamente, foram adicionados 8 μ L de 0,6 mol

L⁻¹ de cianoboroidreto de sódio, e as soluções foram homogeneizadas sob agitação circular tipo vórtex por 10 min à temperatura ambiente. A reação foi interrompida com adição de 16 µL de 1 % (v/v) de hidróxido de amônio e os tubos foram agitados por 3 min. A seguir, foram adicionados 8 µL de ácido fórmico às amostras e estas foram deixadas em repouso à temperatura ambiente por 1 minuto. As *spin columns* foram transferidas para novos tubos de 2 mL e centrifugadas a 1500 *g* por 1 minuto. Por fim, as amostras foram lavadas seis vezes com alíquotas de 450 µL de 100 mmol L⁻¹ TEAB. Para finalizar, a base da coluna foi fechada. Nesta etapa final, foram coletadas as frações após a centrifugação e as lavagens para acompanhamento do *flowthrough*.

3.2.7. Eluição e bloqueio dos tióis livres

No dia de uso, uma solução de 20 mmol L⁻¹ de DTT em água foi preparada, e 100 µL desta solução foram adicionados às amostras que mantidas sob agitação por 30 min à temperatura ambiente. As tampas foram retiradas das bases e as *spin columns* foram transferidas para um novo tubo de 2 mL e centrifugadas a 1500 *g* por 1 minuto, coletando-se as frações eluídas. A etapa anterior foi repetida mais duas vezes com DTT e com 10 minutos de agitação, coletando-se as eluições no mesmo tubo. Repetiu-se mais uma vez com 80 % (v/v) ACN ao invés de DTT. Para o bloqueio, foi preparada uma solução de 1 mol L⁻¹ de IAA do qual 32 µL foram adicionados às amostras, incubando-as no escuro à temperatura ambiente por uma hora. As amostras leves (CS) foram misturadas com as pesadas (TB) em tubos diferentes, resultando em triplicatas das misturas CS e TB. Finalmente, as novas misturas foram dessalinizadas em cartuchos C18 separadamente, secas e estocadas a -80 °C para as posteriores análises por LC-MS/MS.

3.2.8. Análises por espectrometria de massas

Para as análises das proteínas, uma alíquota de 4,5 µL de peptídeos, obtidos pela digestão de proteínas com tripsina foram separados pela coluna C18 (100 mm x 6100 mm) RP-nanoUPLC (nanoAcquity, Waters) acoplada ao espectrômetro QTOF Premier MS (Waters) com uma fonte de *nanoelectrospray* numa vazão de 0,6 mL min⁻¹. O gradiente foi de 2 – 90 % ACN em 0,1 % (v/v) ácido fórmico durante 120 minutos. A voltagem do *nanoelectrospray* foi 3,5 kV, a voltagem do cone de 30 V e a

temperatura da fonte -80 °C. O instrumento foi operado no modo 'top três', onde cada espectro de massas é adquirido seguido do espectro MS/MS dos três picos mais intensos identificados.

3.2.9. Análise de dados

Os espectros foram adquiridos usando o *software* MassLynx v.4.1 e os arquivos .raw foram convertidos no formato de *peak list* (.mgf) sem realizar a soma dos *scans* pelo *software* Mascot Distiller v.2.3.02, 2009 (Matrix Science Ltd.) e o banco de dados usado na busca de proteínas foi *Human UniProt* (ano 2016, sequências: 93614, resíduos: 37039836) usando Mascot Distiller Engine v.2.3.01 (Matrix Science Ltd.), com carbamidometilação como modificação fixa, oxidação da metionina como modificação variável, uma clivagem perdida pela tripsina e com tolerância de 0,1 Da de erro de massa para os íons precursor e fragmentos.

4. Resultados e discussão

4.1. Otimização do método OxCysDML

Por ser a primeira vez que o método foi aplicado em nosso laboratório e levando em consideração que a depleção de proteínas majoritárias utilizada não é a mais eficiente, decidiu-se realizar um *flowthrough* ao longo do tratamento das amostras, com a finalidade de localizar e identificar as possíveis perdas de cisteinoproteínas durante o processo todo. Assim, o procedimento para apenas uma das replicatas do grupo CS foi acompanhado. Coletaram-se sete eluições, sendo a primeira eluição correspondente à fração de proteínas não ligadas à resina (**Tabela 3.1**). Em seguida, quatro eluições correspondentes às lavagens na etapa de redução e enriquecimento foram coletadas e, por fim, duas eluições correspondentes à etapa de dimetilação na resina.

Ressalta-se que as identificações das proteínas listadas na **Tabela 3.1** foram adquiridas a partir dos fragmentos dos peptídeos identificados por espectrometria de massas. Consequentemente, olhando para a coluna referente às

sequências de peptídeos, pode-se demonstrar que não há perda de peptídeos com cisteína, uma vez que não há presença da letra “**C**” (correspondente ao aminoácido cisteína) dentro da sequência.

Assim, após a lavagem com tampão de lavagem (Tris/EDTA), obteve-se a lista de proteínas (**Tabela 3.2**). Visto que nenhum dos peptídeos identificados apresenta o aminoácido cisteína, esta tabela confirma que os peptídeos que foram liberados não possuem afinidade com a resina e que tinham ficado retidos de maneira não-específica.

Ao final do procedimento de enriquecimento na resina, foram realizadas lavagens contínuas com NaCl, ACN/TFA e HAc, como relatado na seção 3.2.5. Assim, na **Tabela 3.3**, observa-se que o número de identificações de proteínas diminuiu consideravelmente, o que demonstra que não há perdas de peptídeos com afinidade durante as lavagens com NaCl. Já na lavagem com solução de ACN/TFA, obtiveram-se perdas de peptídeos, como mostra a **Tabela 3.4**. Por fim, na última lavagem com ácido acético, identificou-se apenas uma proteína cujo peptídeo encontrava-se retido de maneira não-específica (**Tabela 3.5**).

Tabela 3.1. Lista de proteínas identificadas na fração de proteínas não ligadas à resina

Ordem	ID do Uniprot	ID da Proteína	Sequência de peptídeos
1	A0A0G2JMB2*	Ig constante pesada alfa 2 †	YLTWASRQEPSQGTTF AVTSILR
2	A0A0G2JPR0*	Complemento C4–A	VGLSGMAIADVTLTSGFH ALR
3	P04217	Alfa–1B–glicoproteína	TPGAAANLELIFVGPQHAG NYR
4	P01024	Complemento C3	SNLDEDIIEENIVSR
5	A0A0B4J2B5	Ig variable pesada 3/OR16– 9 (não-funcional) †	EVQLVESGGGLVQPGGSLR
6	V9GYE3*	Apolipoproteína A–II	AGTELVNFLSYFVELGTQP ATQ
7	E9PIT3*	Protrombina	IVEGSDAEIGMSPWQVMLFR
8	H0Y7Z1*	Fibronectina †	VTWAPPPSIDLTNFLVR
9	A0A087WT59*	Transthietina	VLDVAVRGSPAINVAVHVFR
10	Q8TCE1*	Antitrombina–III	EVPLNTIIFMGR
11	P04004	Vitronectina	RVDTVDPYPYPR
12	P01023	Alfa-2-macroglobulina	AIGYLNTGYQR
13	F8W696*	Apolipoproteína A–I	THLAPYSDELRRQR
14	P02787	Serotransferrina	DSGFQMNQLR
15	B7ZKJ8*	Proteína ITIH4	FAHTVVTSR
16	P02743	Componente P de amiloide sérico	VGEYSLYIGR
17	A0A1B0GUU9*	Ig constante pesada <i>mu</i> †	QIQVSWLR
18	P08603	Fator do complemento H	EIMENYNIALR
19	P06727	Apolipoproteína A–IV	ISASAEELRRQR
20	A0A087WU08*	Haptoglobina	VGIVSGWGR
21	A0A087X232*	Complemento C1s	TMQENSTPRED

*Isoformas, †Fragmento

Tabela 3.2. Proteínas identificadas na fração das lavagens com tampão Tris/EDTA

Ordem	ID do Uniprot	ID da Proteína	Sequência de peptídeos
1	A0A0G2JMB2*	Ig constante pesada alfa 2 †	YLTWASRQEPSQGT TFAVTSILR
2	A0A0G2JL54*	Complemento C4-B	TTNIQGINLLFSSR
3	P01024	Complemento C3	AGDFLEANMYMNLQR
4	E9PIT3*	Protrombina	IVEGSDAEIGMSPWQV MLFR
5	B0YIW2*	Apolipoproteína C-III	DALSSVQESQVAQQAR
6	V9GYE3*	Apolipoproteína A-II	AGTELVNFLSYFVELG TQPATQ
7	A0A0B4J2B5	Ig variable pesada 3/OR16-9 (não-funcional) †	EVQLVESGGGLVQP GGSLR
8	F8WAS2*	Proteína ITIH1	AAISGENAGLVR
9	H0Y7Z1*	Fibronectina †	VTWAPPPSIDLTNFLVR
10	P01023	Alfa-2-macroglobulina	AIGYLNTGYQR
11	P04004	<i>Vitronectina</i>	RVDTVDPPYPR
12	Q5T985*	Proteína ITIH2	FYNQVSTPLL
13	H7BXT0*	Vitamina K-dependente S †	SFQTGLFTAAR
14	Q8TCE1*	Antitrombina-III	EVPLNTIIFMGR
15	H0Y7L5*	Apolipoproteína E †	AATVGSLAGQPLQER
16	P02743	Componente P de amiloide sérico	VGEYSLYIGR
17	A0A087WU08*	Haptoglobina	VGIVSGWGR
18	P04217	Alfa-1B-glicoproteína	LHDNQNGWSGDSAPVELIL SDETLPAPEFSPEPESGR
19	P02787	Serotransferrina	DSGFQMNQLR
20	F8W696*	Apolipoproteína A-I	THLAPYSDELQR
21	P05108	Enzima de clivagem de cadeia lateral de colesterol, mitocondrial	GLPPRSVLVK
22	A0A1B0GUU9*	Ig constante pesada mu †	QIQVSWLR
23	P06727	Apolipoproteína A-IV	ISASAEELRQR
24	A0A087X232*	Complemento C1s	TMQENSTPRED

*Isoforma, †Fragmento

Tabela 3.3. Lista de proteínas identificadas na fração das lavagens com NaCl

Ordem	ID do Uniprot	ID da Proteína	Sequência de peptídeos
1	A0A0G2JMB2*	Ig constante pesada alfa 2 †	QEPSQGTITFAV TSILR
2	A0A0B4J2B5	Ig variable pesada 3/OR16–9 (não–funcional) †	EVQLVESGGGLVQ PGGSLR
3	P01023	Alfa-2-macroglobulina	AIGYLNTGYQR
4	P04264	Keratina, tipo II citosquelal 1	TLLEGEESR

*Isoforma, †Fragmento

Tabela 3.4. Lista de proteínas identificadas na fração das lavagens com ACN/TFA

Ordem	ID do Uniprot	ID da Proteína	Sequência de peptídeos
1	A0A087WT59*	Transtiretina	VLDVVRGSPAINVAVHVFR
2	A0A286YFY1*	Ig constante pesada alfa 1 †	DL <u>C</u> GCYSSVSLPG <u>C</u> AEP WNHGK
3	C9JV77*	Alfa-2-HS-glicoproteína	HTFMGVVSLGSPSGEVSHPR
4	P02787	Serotransferrina	QQQHLFGSNVTD <u>C</u> SGNFC <u>L</u> FR
5	A0A0G2JL54*	Complemento C4-B	TTNIQGINLLFSSR
6	P01619	Ig variable kappa 3–20	LLIYGASSR

*Isoforma, †Fragmento

Tabela 3.5. Proteína identificada na fração das lavagens com HAc.

Ordem	ID do Uniprot	ID da Proteína	Sequência de peptídeos
1	P01023	Alfa-2-macroglobulina	AIGYLNTGYQR

Como parte do procedimento descrito no item 3.2.6, coletaram-se mais duas frações, uma após centrifugação da marcação na resina e uma correspondente às lavagens realizadas com TEAB ao final dessa etapa. A **Tabela 3.6** mostra apenas uma proteína, sendo a mesma identificada em ambas as frações.

Tabela 3.6. Proteína identificada na fração de eluição após marcação e lavagens com TEAB

Ordem	ID do Uniprot	ID da Proteína	Sequência de peptídeos
1	H7C0A1*	N-glicosilase / DNA-liase †	VASIP <u>C</u> PR

*Isoforma, †Fragmento

Por fim, as replicatas das misturas de ambos os grupos foram analisadas, sendo o grupo controle marcado como “leve” e o grupo bipolar como “pesado”. Um total de 24 proteínas foram identificadas, listadas na **Tabela 3.7**. Os peptídeos identificados dentre todas essas proteínas possuem o aminoácido cisteína (não mostrados). Pode-se observar que em alguns casos há ausência de proteínas entre as replicatas. Quanto à razão P/L (grupo bipolar/controle) foi possível realizar apenas as quantificações de duas proteínas: alfa-1B-glicoproteína e serotransferrina. Pode-se observar que o valor da primeira replicata não é congruente com as outras, devendo ser, portanto, desconsiderada para o cálculo da média das quantificações para cada proteína.

O valor da razão entre TB/CS para a proteína alfa-1B-glicoproteína é de 5,04; ou seja, o grupo TB possui 5 vezes a abundância apresentada no grupo CS. No caso da serotransferrina, o valor é de 1,84; entendendo-se que o grupo TB possui esta proteína em aproximadamente o dobro da abundância apresentada no grupo CS. Cabe destacar que essas duas proteínas já foram relatadas num estudo comparativo entre as doenças de Parkinson e síndrome de Down, relacionando-as com estresse oxidativo (277).

Para as outras proteínas listadas na **Tabela 3.7**, as quantificações não puderam ser realizadas por dois possíveis motivos. O primeiro é devido à marcação dos peptídeos nas amostras do grupo bipolar não ter sido efetiva. A segunda possibilidade seria que mesmo existindo marcação, as intensidades não foram altas o suficiente para que o software pudesse identificá-las.

Este ensaio foi realizado apenas para verificar a viabilidade do método de marcação e, como foi mostrado nas **Tabelas 3.2 a 3.6**, não houveram perdas de peptídeos que pudessem influenciar no resultado da marcação. Apesar de proteínas que contêm cisteína alfa-1B-glicoproteína e serotransferrina (**Tabela 3.2**) terem sido identificadas, mesmo sem sítio de afinidade à resina, os resultados ao final do

protocolo de marcação não foram comprometidos. A serotransferrina mostrada na **Tabela 3.4** é o único peptídeo com afinidade à resina que foi perdido durante as lavagens.

O baixo número de identificações apresentadas pode estar relacionado, além de uma depleção não ótima, à sensibilidade e resolução do equipamento. Considerando que um analisador do tipo QTOF foi empregado nas análises, íons precursores de baixa abundância podem não ser detectados como em um analisador do tipo Orbitrap (278). Portanto, caso seja possível dar continuidade com esta abordagem no futuro, seria interessante empregar um espectrômetro de massas com analisador do tipo Orbitrap. Assim, acredita-se que o número de identificações de proteínas seja maior do que atual.

Tabela 3.7. Identificação e quantificação das replicatas da amostra Bipolar/Controle pelo método OxCysDML

ID do Uniprot	Nome	Identificação			P/L (Quantificação)			DP		
		B1	B2	B3	B1	B2	B3	B1	B2	B3
P02763	Alfa-1-glicoproteína ácida 1	X	X	X	21,97	6,45	3,63	5,39	10,75	6,40
P04217	Alfa-1B-glicoproteína	X	X	X						
P02765	Alfa-2-HS-glicoproteína	X	X	X						
P02749	Beta-2-glicoproteína 1	X	X	X						
P04003	C4b-binding proteína cadeia alfa	X	X	X						
P27658	Cadeia de colágeno alfa-1 (VIII)	X	X	X						
H7C5N5	Ceruloplasmin			X						
Q8NCX0	<i>Coiled-coil domain-containing protein 150</i>		X							
P0C0L5	Complemento C4-B	X		X						
P00751	Fator do complemento B	X	X	X						
D6RGG7	Dihidropteridina redutase	X			15,48			1,49		
Q7Z5Q5	DNA polimerase nu	X		X						
P59022	Proteína 10 da região crítica da síndrome de Down	X	X	X						
P02790	Hemopexina	X								
P01877	Ig constante pesada alfa 2	X	X	X						
P01871-2	Ig constante pesada um	X	X	X						
P01834	Ig constante kappa	X	X	X						
P00747	Plasminogen	X		X						
Q9Y2G9	Homólogo de proteína de morango 2	X	X	X						
P02787	Serotransferrina	X	X	X	0,093	1,99	1,68	5,09	13,29	17,24
Q9UDY6	Proteína contendo motivo tripartido 10			X						
P02774	Vitamina D-binding	X								
P04004	Vitronectina	X	X	X						
C9JPP4	Não determinada		X							

X: Presença da proteína na replicata; P/L: razão grupo TB/CS (pesado/leve); B: replicatas da mistura entre os grupos TB e CS; DP: desvio padrão.

5. Conclusões parciais

De acordo com o estudo bibliográfico apresentado neste Capítulo, dentro das modificações pós-traducionais, destaca-se a relevância da oxidação da cisteína e a participação dela nas doenças mentais estudadas. Assim, dentro da proposta, o método de marcação isotópica por dimetilação foi implementado com sucesso. Embora o número de identificações de proteínas marcadas tenha sido baixo, o número de proteínas que foram perdidas, avaliadas nas amostras controle ao longo do procedimento, foi mínima. Espera-se que este método seja empregado para futuras análises de potenciais biomarcadores de TB e ESZ pelo grupo de pesquisa.

Considerações finais

De forma geral, os biomarcadores clínicos precisam ser identificados e avaliados desde a etapa de diagnóstico até as intervenções terapêuticas para cada tipo de doença. Assim, especificamente na Psiquiatria, o ideal seria renovar o sistema de classificação dos diagnósticos, atualmente baseados em sinais e sintomas, além da estratificação dos pacientes. Consequentemente, a eficácia em determinar o tipo, tempo e curso dos transtornos poderia ser aumentada, permitindo que as doenças fossem subclassificadas com base em critérios fisiológicos, levando assim a uma abordagem precisa e mais fundamentada biologicamente para os tratamentos psiquiátricos.

Diante disso, este trabalho foi idealizado com objetivo de determinar perfis metalômicos e proteômicos em amostras de soro de pacientes diagnosticados com transtorno bipolar e esquizofrenia sob tratamento. Ao mesmo tempo, teve-se o intuito de encontrar conexões entre ambos estudos ômicos.

Desta maneira, dos 11 microelementos quantificados no Capítulo 1, o Se, Zn e Fe foram diferenciados estatisticamente entre os grupos de pacientes com doenças mentais e indivíduos saudáveis. Mostrou-se que as concentrações do Fe são afetadas durante o tratamento e foi possível inferir uma atividade antagônica do lítio ao tratamento combinado com referência aos níveis de Se. Finalmente, nesse estudo metalômico foi demonstrado que ambas as doenças encontram-se sob estresse oxidativo apesar do tratamento, de acordo com os níveis de Fe e Zn.

No Capítulo 2, 25 proteínas foram identificadas como diferenciais entre as doenças e o controle. Apesar de não ter sido possível definir se as modulações dos níveis de proteínas encontradas em ambas as doenças é consequência do tratamento, destacou-se a desregulação das vias metabólicas do sistema imunológico e hemóstase, mostrando uma regulação oposta nas cascatas de complemento e coagulação entre o transtorno bipolar e esquizofrenia. Estas cascatas são de interesse desde que não foram relacionadas anteriormente às doenças na literatura. Além disso, proteínas alteradas envolvidas no processo de ativação do complemento podem ser consideradas como um conjunto de biomarcadores para acompanhar a progressão do tratamento em pacientes com ESZ.

Finalmente, no Capítulo 3, foi abordada uma estratégia seletiva, visando quantificar apenas a classe de proteínas sujeitas à oxidação, produtos do estresse oxidativo. Deste modo, foi escolhido o método por dimetilação de cisteína oxidada, sendo viável economicamente dentre os métodos disponíveis. Assim, apesar do baixo número de proteínas identificadas, a otimização do método foi realizada e conseguiu-se quantificar duas proteínas no ensaio piloto, as quais foram relatadas anteriormente neste contexto num estudo de doença neurodegenerativa.

Assim, foi possível chegar a um ponto de convergência entre os três capítulos desenvolvidos: sendo que as baixas concentrações de Se detectadas tanto em pacientes com ESZ como em TB foram relacionadas ao estresse oxidativo e a proteína GPX3, relatada como regulada negativamente, está envolvida, além do estresse oxidativo, com processos de resposta inflamatória. A mesma proteína foi identificada, embora não quantificada, no estudo de dimetilação de cisteína oxidada. Deste modo, determinou-se que tanto o estresse oxidativo quanto os processos de inflamação encontram-se presentes em ambas as doenças apesar do tratamento, sendo necessário estudos comparativos entre o momento do diagnóstico e o transcurso do tratamento para poder definir se ambos estados são característicos da doença e/ou consequências aos tratamentos ministrados. Adicionalmente, o estudo poderia ser complementado com análises específicas para avaliar as atividades de proteínas envolvidas em processos redox como SOD e GPX3, entre outras, com a finalidade de verificar eventuais diferenças entre os grupos.

Dentro das limitações deste estudo, encontram-se o número de participantes envolvidos nesta pesquisa ser pequeno, já que não foi possível atingir uma quantidade maior a 10 amostras por grupo podendo ter influências devido ao gênero ou idade, por exemplo. Ao mesmo tempo, esse número amostral era limitado pela dependência de disponibilidade de equipamentos para as análises envolvidas nas três abordagens desenvolvidas.

Esta Tese colaborou oferecendo novas perspectivas para o entendimento de parte da fisiopatologia com referência aos tratamentos empregados em ambos os transtornos estudados, bem como na proposta de suplementação para tentar estabilizar os níveis dos metais essenciais, corrigindo os possíveis efeitos secundários, como também diminuir possíveis comorbidades durante o tratamento. Porém, testes de validação de identidades e quantidades para as proteínas devem

ser conduzidas no futuro. Espera-se que estas sugestões possam ser aplicadas localmente, uma vez que o grupo amostral estudado é correspondente a pessoas que vêm sendo tratadas no Hospital das Clínicas da Universidade Estadual de Campinas, e com o tempo ser possivelmente expandidas a níveis regionais e/ou nacionais.

Referências

1. Vos T. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 328 diseases and injuries for 195 countries, 1990-2016: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet*. 2017;390(10100):1211–59.
2. Ferrari AJ, Stockings E, Khoo JP, Erskine HE, Degenhardt L, Vos T, et al. The prevalence and burden of bipolar disorder: Findings from the Global Burden of Disease Study 2013. *Bipolar Disord*. 2016;18(5):440–50.
3. Pan American Health Organization. The Burden of Mental Disorders in the Region of the Americas, 2018. 2018. 1–48 p.
4. Saia-Cereda VM, Cassoli JS, Martins-de-Souza D, Nascimento JM. Psychiatric disorders biochemical pathways unraveled by human brain proteomics. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 2017;267(1):3–17.
5. Martinez-Aran A, Vieta E, Torrent C, Sanchez-Moreno J, Goikolea JM, Ayuso-Mateos JL. Functional outcome in bipolar disorder: the role of clinical and cognitive factors. *Bipolar Disord*. 2007;(9):103–13.
6. Matos G, Guarniero FB, Hallak JE, Bressan RA. Schizophrenia, the forgotten disorder: The scenario in Brazil. *Rev Bras Psiquiatr*. 2015;(37):269–70.
7. van Os J, Kapur S. Schizophrenia. *Lancet*. 2009;374(9690):635–45.
8. Tandon R, Nasrallah HA, Keshavan MS. Schizophrenia, “just the facts” 4. Clinical features and conceptualization. *Schizophr Res*. 2009;110:1–23.
9. Carpenter WT, Fischer BA. Will the Kraepelinian dichotomy survive the DSM-V? *Neuropsychopharmacology*. 2009;34(9):2081–7.
10. Perlis RH. Misdiagnosis of bipolar disorder. *Am J Manag Care*. 2005;11(SUPPL. 9):S271–4.
11. Weickert CS, Weickert TW, Pillai A, Buckley PF. Biomarkers in schizophrenia: A brief conceptual consideration. *Dis Markers*. 2013;35(1):3–9.
12. Barrettini W. Bipolar disorder and schizophrenia: Convergent molecular data.

- NeuroMolecular Med. 2004;5(1):109–17.
13. Nasrallah H. Atypical antipsychotic-induced metabolic side effects: Insights from receptor-binding profiles. *Mol Psychiatry*. 2008;13:27–35.
 14. Zuccoli GS, Saia-Cereda VM, Nascimento JM, Martins-de-Souza D. The energy metabolism dysfunction in psychiatric disorders postmortem brains: Focus on proteomic evidence. *Front Neurosci*. 2017;11:1–14.
 15. Lee JH, Lee MS. Brain iron accumulation in atypical parkinsonian syndromes: In vivo MRI evidences for distinctive patterns. *Front Neurol*. 2019;10:1–9.
 16. Lachno DR, Romeo MJ, Siemers ER, Vanderstichele H, Coart E, Konrad RJ, et al. Validation of ELISA methods for quantification of total tau and phosphorylated-tau 181 in human cerebrospinal fluid with measurement in specimens from two Alzheimer's disease studies. *J Alzheimer's Dis*. 2014;26(3):531–41.
 17. Forte G, Bocca B, Senofonte O, Petrucci F, Brusa L, Stanzione P, et al. Trace and major elements in whole blood, serum, cerebrospinal fluid and urine of patients with Parkinson's disease. *J Neural Transm*. 2004;111(8):1031–40.
 18. de Jesus JR, Pessôa G de S, Sussulini A, Martínez JLC, Arruda MAZ. Proteomics strategies for bipolar disorder evaluation: From sample preparation to validation. *J Proteomics*. 2016;145:187–96.
 19. Bomboi G, Marchione F, Sepe-Monti M, De Carolis A, Bianchi V, Medda E, et al. Correlation between metal ions and clinical findings in subjects affected by Alzheimer's disease. *Ann Ist Super Sanita*. 2005;41(2):205–12.
 20. Salim S. Oxidative stress and psychological disorders. *Curr Neuropharmacol*. 2014;12(2):140–7.
 21. Boskovic M, Vovk T, Kores Plesnicar B, Grabnar I. Oxidative Stress in Schizophrenia. *Curr Neuropharmacol*. 2011;9(2):301–12.
 22. Kozlowski H, Luczkowski M, Remelli M, Valensin D. Copper, zinc and iron in neurodegenerative diseases: Alzheimer's, Parkinson's and prion diseases. *Coord Chem Rev*. 2012;256:2129–41.

23. Skalnaya MG, Skalny A V. Essential trace elements in human health: A physician's view. Publishing House of Tomsk State University; 2018.
24. Maret W. The metals in the biological periodic system of the elements: Concepts and conjectures. *Int J Mol Sci.* 2016;17(1):1–8.
25. WHO. Trace elements in human nutrition and health. World Health Organization, editor. Geneva, Switzerland; 1996. 360 p.
26. Młyniec K, Davies CL, De Agüero Sánchez IG, Pytka K, Budziszewska B, Nowak G. Essential elements in depression and anxiety. Part I. *Pharmacol Reports.* 2014;66(4):534–44.
27. Maret W. Metallomics: The Science of Biometals and Biometalloids. In: *Metallomics Advances in Experimental Medicine and Biology.* Springer, Cham; 2018. p. 1–20.
28. Haraguchi H. Metallomics: The history over the last decade and a future outlook. *Metallomics.* 2017;9(8):1001–13.
29. Williams RJP. Chemical selection of elements by cells. *Coord Chem Rev.* 2001;216–217:583–95.
30. Mounicou S, Szpunar J, Lobinski R. Metallomics: The concept and methodology. *Chem Soc Rev.* 2009;38(4):1119–38.
31. Waldron KJ, Rutherford JC, Ford D, Robinson NJ. Metalloproteins and metal sensing. *Nature.* 2009;460(7257):823–30.
32. Holm RH, Kennepohl P, Solomon EI. Structural and functional aspects of metal sites in biology. *Chem Rev.* 1996;96(7):2239–314.
33. Künnemeyer J, Terborg L, Meermann B, Brauckmann C, Möller I, Scheffer A, et al. Speciation analysis of gadolinium chelates in hospital effluents and wastewater treatment plant sewage by a novel HILIC/ICP-MS method. *Environ Sci Technol.* 2009;43(8):2884–90.
34. Koellensperger G, Hann S. Ultra-fast HPLC-ICP-MS analysis of oxaliplatin in patient urine. *Anal Bioanal Chem.* 2010;397(1):401–6.
35. Silva JRRF da, R.J.P. Williams. *The Biological Chemistry of the Elements.* 2nd

- ed. Oxford: Oxford University Press; 2001. 600 p.
36. Haraguchi H. Metallomics as integrated biometal science. *J Anal At Spectrom.* 2004;19(1):5–14.
 37. Ammann AA. Inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP MS): a versatile tool. *J Mass Spectrom.* 2007;42:419–27.
 38. Wilschefske SC, Baxter MR. Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry: Introduction to Analytical Aspects. *Clin Biochem Rev.* 2019;40(3):115–33.
 39. Douglas DJ, Kerr LA. Study of solids deposition on inductively coupled plasma mass spectrometry samplers and skimmers. *J Anal At Spectrom.* 1988;3(6):749–52.
 40. De Blas Bravo I, Sanz Castro R, López Riquelme N, Tormo Díaz C, Apraiz Goyenaga D. Optimization of the trace element determination by ICP-MS in human blood serum. *J Trace Elem Med Biol.* 2007;21(SUPPL. 1):14–7.
 41. Johnson-Davis KL, Farnsworth C, Law C, Parker R. Method validation for a multi-element panel in serum by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). *Clin Biochem.* 2020;82:90–8.
 42. Kailasa SK, Wu HF. Inorganic contaminants: sample preparation approaches. In: Pawliszyn J, editor. *Comprehensive Sampling and Sample Preparation*. Elsevier; 2012. p. 743–82.
 43. Müller EI, Mesko MF, Moraes DP, Korn M das GA, Flores ÉMM. Wet Digestion Using Microwave Heating. In: Flores ÉM de M, editor. *Microwave-Assisted Sample Preparation for Trace Element Determination*. Brazil: Elsevier; 2014. p. 99–142.
 44. Barin JS, Flores ÉMM, Mesko MF, Mello PA, Pereira JSF. Microwave-Induced Combustion. In: Flores ÉM de M, editor. *Microwave-Assisted Sample Preparation for Trace Element Determination*. Brazil: Elsevier; 2014. p. 143–77.
 45. Yahaya MI, Shehu A, Dabai FG. Efficiency of extraction of trace metals from blood samples using wet digestion and microwave digestion techniques. *J Appl Sci Environ Manag.* 2013;17(3):365–9.

46. Bonny S, Hitti E, Boustie J, Bernard A, Tomasi S. Optimization of a microwave-assisted extraction of secondary metabolites from crustose lichens with quantitative spectrophotodensitometry analysis. *J Chromatogr A*. 2009;1216(45):7651–6.
47. Bocca B, Alimonti A, Forte G, Petrucci F, Pirola C, Senofonte O, et al. High-throughput microwave-digestion procedures to monitor neurotoxic elements in body fluids by means of inductively coupled plasma mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*. 2003;377(1):65–70.
48. Omirou M, Papastylianou I, Iori R, Papastephanou C, Papadopoulou KK, Ehaliotis C, et al. Microwave-assisted extraction of glucosinolates from *Eruca sativa* seeds and soil: Comparison with existing methods. *Phytochem Anal*. 2009;20(3):214–20.
49. Kata R, Zieba A, Nowak G, Schlegel-zawadzka M, Dudek D. Serum trace elements in animal models and human depression: Part III. Magnesium. Relationship with copper. *Hum Psychopharmacol Clin Exp*. 2002;15(8):631–5.
50. Guo C, Wang C. Effects of zinc supplementation on plasma copper/ zinc ratios, oxidative stress, and immunological status in hemodialysis patients. *Int J Med Sci*. 2013;10(1):79–89.
51. Guo C, Chen P, Yeh M, Hsiung D, Wang C. Cu/ Zn ratios are associated with nutritional status, oxidative stress, inflammation, and immune abnormalities in patients on peritoneal dialysis. *Clin Biochem*. 2011;44(4):275–80.
52. Emokpae MA, Fatimehin EB. Copper-to-Zinc Ratio Correlates with an Inflammatory Marker in Patients with Sick Cell Disease. *Sci*. 2019;34(1):1–6.
53. Akarsu S, Bolu A, Aydemir E, Zincir SB. The Relationship between the Number of Manic Episodes and Oxidative Stress Indicators in Bipolar Disorder. *Psychiatry Investig*. 2018;15(5):514–9.
54. Momčilović B, Prejac J, Brundić S, Morović S, Skalný A V., Mimica N, et al. An essay on human and elements, multielement profiles, and depression. *Transl Neurosci*. 2010;1(4):322–34.
55. Liu Y, Nguyen M, Robert A, Meunier B. Metal Ions in Alzheimer's Disease: A Key

- Role or Not? *Acc Chem Res.* 2019;52(7):2026–35.
56. Cicero CE, Mostile G, Vasta R, Rapisarda V, Signorelli SS, Ferrante M, et al. Metals and neurodegenerative diseases. A systematic review. *Environ Res.* 2017;159:82–94.
 57. Sussulini A, Banzato CEM, Arruda MAZ. Exploratory analysis of the serum ionic profile for bipolar disorder and lithium treatment. *Int J Mass Spectrom.* 2011;307(1–3):182–4.
 58. Cao B, Yan L, Ma J, Jin M, Park C, Nozari Y, et al. Comparison of serum essential trace metals between patients with schizophrenia and healthy controls. *J Trace Elem Med Biol.* 2019;51:79–85.
 59. Kim MJ, Oh SB, Kim J, Kim K, Ryu HS, Kim MS, et al. Association of metals with the risk and clinical characteristics of Parkinson's disease. *Park Relat Disord.* 2018;55:117–21.
 60. Sussulini A, Erbolato HM, Pessôa G de S, Arruda MAZ, Steiner J, Martins-de-Souza D. Elemental fingerprinting of schizophrenia patient blood plasma before and after treatment with antipsychotics. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.* 2018;268(6):565–70.
 61. Sussulini A, Hauser-Davis RA. Metallomics applied to the study of neurodegenerative and mental diseases. *Adv Exp Med Biol.* 2018;1055:21–37.
 62. Liu T, Lu Q Bin, Yan L, Guo J, Feng F, Qiu J, et al. Comparative study on serum levels of 10 trace elements in schizophrenia. *PLoS One.* 2015;10(7):1–8.
 63. Lin T, Liu T, Lin Y, Yan L, Chen Z, Wang J. Comparative study on serum levels of macro and trace elements in schizophrenia based on supervised learning methods. *J Trace Elem Med Biol.* 2017;43:202–8.
 64. Sastre M, Ritchie CW, Hajji N. Metal Ions in Alzheimer's Disease Brain. *JSM Alzheimer's Dis Relat Dement.* 2015;2(1):1014.
 65. Siwek M, Sowa-Kućma M, Styczeń K, Szewczyk B, Reczyński W, Misztak P, et al. Decreased serum zinc concentration during depressive episode in patients with bipolar disorder. *J Affect Disord.* 2016;190:272–7.

66. Styczeń K, Sowa-Kućma M, Dudek D, Siwek M, Reczyński W, Szewczyk B, et al. Zinc and copper concentration do not differentiate the bipolar disorder from major depressive disorder. *Psychiatr Pol.* 2017;52(3):449–57.
67. Giacoppo S, Galuppo M, Calabrò RS, D'Aleo G, Marra A, Sessa E, et al. Heavy metals and neurodegenerative diseases: an observational study. *Biol Trace Elem Res.* 2014;161(2):151–60.
68. Cao B, Yan L, Ma J, Jin M, Park C, Nozari Y, et al. Comparison of serum essential trace metals between patients with schizophrenia and healthy controls. *J Trace Elem Med Biol.* 2019;51(October 2018):79–85.
69. Chen X, Li Y, Zhang T, Yao Y, Shen C, Xue Y. Association of serum trace elements with schizophrenia and effects of antipsychotic treatment. *Biol Trace Elem Res.* 2018;181(1):22–30.
70. Boll MC, Alcaraz-Zubeldia M, Montes S, Rios C. Free copper, ferroxidase and SOD1 activities, lipid peroxidation and NOx content in the CSF. A different marker profile in four neurodegenerative diseases. *Neurochem Res.* 2008;33(9):1717–23.
71. Brancalion ML, Zezzi Arruda MA. Evaluation of medicinal plant decomposition efficiency using microwave ovens and mini-vials for Cd determination by TS-FF-AAS. *Microchim Acta.* 2005;150(3–4):283–90.
72. Bizzi CA, Flores ELM, Nóbrega JA, Pliveira JSS, Schmidt L, Mortari SR. Evaluation of a digestion procedure based on the use of diluted nitric acid solutions and H₂O₂ for the multielement determination of whole milk powder and bovine liver by ICP-based techniques. *J Anal At Spectrom.* 2014;29:332–8.
73. Cai L, Chen T, Yang J, Zhou K, Yan X, Chen W, et al. Serum trace element differences between Schizophrenia patients and controls in the Han Chinese population. *Sci Rep.* 2015;5:1–8.
74. Lin T, Liu T, Lin Y, Yan L, Chen Z, Wang J. Comparative study on serum levels of macro and trace elements in schizophrenia based on supervised learning methods. *J Trace Elem Med Biol.* 2017;43:202–8.
75. Kaya B, Akdağ N, Fadillioğlu E, Taycan SE, Emre MH, Unal S, et al. Elements

- levels and glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in blood of patients with schizophrenia. *Dusunen Adam*. 2012;25(3):198–205.
76. Vidovic B, Dordevic B, Milovanovic S, Skrinaj S, Pavlovic Z, Stefanovic A, et al. Selenium, zinc, and copper plasma levels in patients with schizophrenia: relationship with metabolic risk factors. *Biol Trace Elem Res*. 2013;156:22–8.
 77. Mustak MS, Rao TSS, Shanmugavelu P, Sundar NMS, Menon RB, Rao R V., et al. Assessment of serum macro and trace element homeostasis and the complexity of inter-element relations in bipolar mood disorders. *Clin Chim Acta*. 2008;394(1–2):47–53.
 78. Styczeń K, Sowa-Kućma M, Siwek M, Dudek D, Reczyński W, Szewczyk B, et al. The serum zinc concentration as a potential biological marker in patients with major depressive disorder. *Metab Brain Dis*. 2016;32(1):97–103.
 79. de Sousa RT, Zarate CA, Zanetti M V., Costa AC, Talib LL, Gattaz WF, et al. Oxidative stress in early stage bipolar disorder and the association with response to lithium. *J Psychiatr Res*. 2014;50(1):36–41.
 80. Liu JL, Fan YG, Yang ZS, Wang ZY, Guo C. Iron and Alzheimer's disease: From pathogenesis to therapeutic implications. *Front Neurosci*. 2018;12:1–14.
 81. Yoshida H, Sasaki K, Hirowatari Y, Kurosawa H, Sato N, Furutani N, et al. Increased serum iron may contribute to enhanced oxidation of low-density lipoprotein in smokers in part through changes in lipoxygenase and catalase. *Clin Chim Acta*. 2004;345:161–70.
 82. Northrop-Clewes CA, Thurnham DI. Monitoring micronutrients in cigarette smokers. *Clin Chim Acta*. 2007;377:14–38.
 83. Kim H, Shin C, Baik I. Associations between Lifestyle Factors and Iron Overload in Korean Adults. *Clin Nutr Res*. 2016;5(4):270.
 84. Rayman MP. Selenium and human health. *Lancet*. 2012;379(9822):1256–68.
 85. Kieliszek M, Blazejak S. Selenium: Significance, and outlook for supplementation. *Nutrition*. 2013;29:713–8.
 86. Wang J, Um P, Dickerman BA, Liu J. Zinc, magnesium, selenium and

- depression: A review of the evidence, potential mechanisms and implications. *Nutrients*. 2018;10(5):1–19.
87. Li Z, Liu Y, Li X, Ju W, Wu G, Yang X. Association of Elements with Schizophrenia and Intervention of Selenium Supplements. *Biol Trace Elem Res*. 2017;183(1):16–21.
 88. Prasad AS. Discovery of human zinc deficiency: Its impact on human health and disease. *Am Soc Nutr*. 2013;4:176–90.
 89. Grønli O, Kvamme JM, Friberg O, Wynn R. Zinc Deficiency Is Common in Several Psychiatric Disorders. *PLoS One*. 2013;8(12):6–12.
 90. Marreiro N, Jayanne K, Beatriz J, Morais S, Beserra B, Severo JS, et al. Zinc and oxidative stress: Current mechanisms. *Antioxidants (Basel)*. 2017;6(2):1–9.
 91. Lima VB de S, Sampaio F de A, Bezerra DLC, Moita Neto JM, Marreiro D do N. Parameters of glycemic control and their relationship with zinc concentrations in blood and with superoxide dismutase enzyme activity in type 2 diabetes patients. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2011;55(9):701–7.
 92. Magalhaes RCN, Borges CG, de Sousa Lima V, Neto JMMN, Nogueira NN, Marreiro DN. Nutritional status of zinc and activity superoxide dismutase in chronic renal patients undergoing hemodialysis. *Nutr Hosp*. 2011;26(6):1456–61.
 93. Schlegel-zawadzka M, Nowak G. Alterations in Serum and Brain Trace Element Levels After Antidepressant. Part II. Copper. *Biol Trace Elem Res*. 1999;73:37–45.
 94. Siwek M, Styczeń K, Sowa-Kućma M, Dudek D, Nowak G, Misztak P, et al. The serum concentration of copper in bipolar disorder. *Psychiatr Pol*. 2017;51(3):469–81.
 95. Wolf TL, Kotun J, Meador-Woodruff JH. Plasma copper, iron, ceruloplasmin and ferroxidase activity in schizophrenia. *Schizophr Res*. 2006;86:167–71.
 96. Osredkar J. Copper and zinc, biological role and significance of copper/zinc imbalance. *J Clin Toxicol*. 2014;s3:1–18.

97. Kunz M, Gama CS, Andreazza AC, Salvador M, Ceresér KM, Gomes FA, et al. Elevated serum superoxide dismutase and thiobarbituric acid reactive substances in different phases of bipolar disorder and in schizophrenia. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry*. 2008;32(7):1677–81.
98. Hendouei N, Farnia S, Mohseni F, Salehi A, Bagheri M. Alterations in oxidative stress markers and its correlation with clinical findings in schizophrenic patients consuming perphenazine, clozapine and risperidone. *Biomed Pharmacother*. 2018;103:965–72.
99. Ozturk P, Kurutas E, Ataseven A, Dokur N, Gumusalan Y, Gorur A, et al. BMI and levels of zinc, copper in hair, serum and urine of Turkish male patients with androgenetic alopecia. *J Trace Elem Med Biol*. 2014;28(3):266–70.
100. Zohal M, Jam-Ashkezari S, Namiranian N, Moosavi A, Ghadiri-Anari A. Association between selected trace elements and body mass index and waist circumference: A cross sectional study. *Diabetes Metab Syndr Clin Res Rev*. 2019;13(2):1293–7.
101. Dayabandara M, Hanwella R, Ratnatunga S, Seneviratne S, Suraweera C, de Silva VA. Antipsychotic-associated weight gain: management strategies and impact on treatment adherence. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2017;13:2231–41.
102. Gstaiger M, Aebersold R. Applying mass spectrometry-based proteomics to genetics, genomics and network biology. *Nat Rev Genet*. 2009;10(9):617–27.
103. Domon B, Aebersold R. Mass spectrometry and protein analysis. *Science* (80-). 2006;312(5771):212–7.
104. Wolters DA, Washburn MP, Yates JR. An automated multidimensional protein identification technology for shotgun proteomics. *Anal Chem*. 2001;73(23):5683–90.
105. Meissner F, Mann M. Quantitative shotgun proteomics: Considerations for a high-quality workflow in immunology. *Nat Immunol*. 2014;15(2):112–7.
106. Borràs E, Sabidó E. What is targeted proteomics? A concise revision of targeted acquisition and targeted data analysis in mass spectrometry. *Proteomics*. 2017;17(17–18):1–8.

107. Ong S-E, Blagoev B, Kratchmarova I, Kristensen DB, Steen H, Pandey A, et al. Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture, SILAC, as a Simple and Accurate Approach to Expression Proteomics. *Mol Cell Proteomics*. 2002;1(5):376–86.
108. Gygi SP, Rist B, Gerber S a, Turecek F, Gelb MH, Aebersold R. Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nat Biotechnol*. 1999;17(10):994–9.
109. Ross PL, Huang YN, Marchese JN, Williamson B, Parker K, Hattan S, et al. Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Mol Cell Proteomics*. 2004;3(12):1154–69.
110. Rauniyar N, Yates JR. Isobaric labeling-based relative quantification in shotgun proteomics. *J Proteome Res*. 2014;13:5293–309.
111. Lundgren DH, Hwang S Il, Wu L, Han DK. Role of spectral counting in quantitative proteomics. *Expert Rev Proteomics*. 2010;7(1):39–53.
112. Arike L, Peil L. Spectral Counting Label-Free Proteomics. In: *Methods in Molecular Biology*. Springer US; 2014. p. 213–22.
113. Zhu W, Smith JW, Huang CM. Mass spectrometry-based label-free quantitative proteomics. *J Biomed Biotechnol*. 2010;2010:6.
114. Megger DA, Bracht T, Meyer HE, Sitek B. Label-free quantification in clinical proteomics. *Biochim Biophys Acta - Proteins Proteomics*. 2013;1834(8):1581–90.
115. Bantscheff M, Lemeer S. Quantitative mass spectrometry in proteomics: critical review update from 2007 to the present. *Anal Bioanal Chem*. 2012;404:939–65.
116. Ankney JA, Muneer A, Chen X. Relative and absolute quantitation in mass spectrometry-based proteomics. *Annu Rev of Analytical Chem*. 2018;11:49–77.
117. Tyanova S, Temu T, Cox J. The MaxQuant computational platform for mass spectrometry-based shotgun proteomics. *Nat Protoc*. 2016;11(12):2301–19.
118. Chan MK, Gottschalk MG, Haenisch F, Tomasik J, Ruland T, Rahmoune H, et al. Applications of blood-based protein biomarker strategies in the study of

- psychiatric disorders. *Prog Neurobiol*. 2014;122:45–72.
119. Stelzhammer V, Alsaif M, Chan MK, Rahmoune H, Steeb H, Guest PC, et al. Distinct proteomic profiles in post-mortem pituitary glands from bipolar disorder and major depressive disorder patients. *J Psychiatr Res*. 2015;60:40–8.
 120. Hirayama-Kurogi M, Takizawa Y, Kunii Y, Matsumoto J, Wada A, Hino M, et al. Downregulation of GNA13-ERK network in prefrontal cortex of schizophrenia brain identified by combined focused and targeted quantitative proteomics. *J Proteomics*. 2017;158:31–42.
 121. English JA, Pennington K, Dunn MJ, Cotter DR. The neuroproteomics of schizophrenia. *Biol Psychiatry*. 2011;69(2):163–72.
 122. Johnston-Wilson NL, Sims CD, Hofmann JP, Anderson L, Shore AD, Torrey EF, et al. Disease-specific alterations in frontal cortex brain proteins in schizophrenia, bipolar disorder, and major depressive disorder. *Mol Psychiatry*. 2000;5(2):142–9.
 123. Knorr U, Simonsen AH, Zetterberg H, Blennow K, Hasselbalch SG, Kessing LV. Biomarkers in cerebrospinal fluid of patients with bipolar disorder versus healthy individuals: A systematic review. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2018;28(7):783–94.
 124. Rodrigues-Amorim D, Rivera-Baltanás T, López M, Spuch C, Olivares JM, Agís-Balboa RC. Schizophrenia: A review of potential biomarkers. *J Psychiatr Res*. 2017;93:37–49.
 125. Kim S, Webster MJ. Correlation analysis between genome-wide expression profiles and cytoarchitectural abnormalities in the prefrontal cortex of psychiatric disorders. *Mol Psychiatry*. 2010;15(3):326–36.
 126. Davalieva K, Kostovska IM, Dwork AJ. Proteomics research in schizophrenia. *Front Cell Neurosci*. 2016;10:1–22.
 127. Smirnova L, Seregin A, Boksha I, Dmitrieva E, Simutkin G, Kornetova E, et al. The difference in serum proteomes in schizophrenia and bipolar disorder. *BMC Genomics*. 2019;20(Suppl 7):1–14.
 128. Guest PC, Chan MK, Gottschalk MG, Bahn S. The use of proteomic biomarkers

- for improved diagnosis and stratification of schizophrenia patients. *Biomarkers Med.* 2014;8(1):15–27.
129. Song X, Li X, Gao J, Zhao J, Li Y, Fan X, et al. APOA-I: A possible novel biomarker for metabolic side effects in first episode schizophrenia. *PLoS One.* 2014;9(4):1–7.
 130. Schwarz E, Guest PC, Rahmoune H, Martins-De-Souza D, Niebuhr DW, Weber NS, et al. Identification of a blood-based biological signature in subjects with psychiatric disorders prior to clinical manifestation. *World J Biol Psychiatry.* 2012;13(8):627–32.
 131. Levin Y, Wang L, Schwarz E, Koethe D, Leweke FM, Bahn S. Global proteomic profiling reveals altered proteomic signature in schizophrenia serum. *Mol Psychiatry.* 2010;15:1088–100.
 132. Yang Y, Wan C, Li H, Zhu H, La Y, Xi Z, et al. Altered levels of acute phase proteins in the plasma of patients with schizophrenia. *Anal Chem.* 2006;78(11):3571–6.
 133. Liu Y, Zhang D, Cheng Y, Li Z. Elevated serum immunoinflammation-related protein complexes are associated with psychosis. *Psychiatry Res.* 2015;230(1):96–101.
 134. Ding Y huan, Guo J hong, Hu Q ying, Jiang W, Wang K zheng. Protein Biomarkers in Serum of Patients with Schizophrenia. *Cell Biochem Biophys.* 2015;72(3):799–805.
 135. Chan MK, Krebs MO, Cox D, Guest PC, Yolken RH, Rahmoune H, et al. Development of a blood-based molecular biomarker test for identification of schizophrenia before disease onset. *Transl Psychiatry.* 2015;5(7):e601-10.
 136. Bai YM, Su TP, Li CT, Tsai SJ, Chen MH, Tu PC, et al. Comparison of pro-inflammatory cytokines among patients with bipolar disorder and unipolar depression and normal controls. *Bipolar Disord.* 2015;17(3):269–77.
 137. Grande I, Magalhães P V., Chendo I, Stertz L, Panizutti B, Colpo GD, et al. Staging bipolar disorder: Clinical, biochemical, and functional correlates. *Acta Psychiatr Scand.* 2014;129(6):437–44.

138. Kubistova A, Horacek J, Novak T. Increased interleukin-6 and tumor necrosis factor alpha in first episode schizophrenia patients versus healthy controls. *Psychiatr Danub*. 2012;24(SUPPL. 1):153–6.
139. Pedrini M, Massuda R, Fries GR, de Bittencourt Pasquali MA, Schnorr CE, Moreira JCF, et al. Similarities in serum oxidative stress markers and inflammatory cytokines in patients with overt schizophrenia at early and late stages of chronicity. *J Psychiatr Res*. 2012;46(6):819–24.
140. Cetin T, Guloksuz S, Cetin EA, Gazioglu SB, Deniz G, Oral ET, et al. Plasma concentrations of soluble cytokine receptors in euthymic bipolar patients with and without subsyndromal symptoms. *BMC Psychiatry*. 2012;12(158).
141. Zhang Q, Hong W, Li H, Peng F, Wang F, Li N, et al. Increased ratio of high sensitivity C-reactive protein to interleukin-10 as a potential peripheral biomarker of schizophrenia and aggression. *Int J Psychophysiol*. 2017;114:9–15.
142. Miller BJ, Buckley P, Seabolt W, Mellor A, Kirkpatrick B. Meta-analysis of cytokine alterations in schizophrenia: Clinical status and antipsychotic effects. *Biol Psychiatry*. 2011;70(7):663–71.
143. Cheng TMK, Lu Y, Guest PC, Rahmoune H, Harris LW, Wang L, et al. Identification of targeted analyte clusters for studies of schizophrenia. *Mol Cell Proteomics*. 2010;9(3):510–22.
144. Boll KM, Noto C, Bonifácio KL, Bortolasci CC, Gadelha A, Bressan RA, et al. Oxidative and nitrosative stress biomarkers in chronic schizophrenia. *Psychiatry Res*. 2017;253(August 2016):43–8.
145. Tanaka T, Matsuda T, Hayes LN, Yang S, Rodriguez K, Severance EG, et al. Infection and inflammation in schizophrenia and bipolar disorder. *Neurosci Res*. 2017;115:59–63.
146. Joseph J, Depp C, Martin AS, Daly RE, Glorioso DK, Palmer BW, et al. Associations of high sensitivity C-reactive protein levels in schizophrenia and comparison groups. *Schizophr Res*. 2015;168:456–60.
147. Chaplin DD. Overview of the immune response. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125(2 Suppl 2):S3-23.

148. Ferrero-Miliani L, Nielsen OH, Andersen PS, Girardin SE. Chronic inflammation: Importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1 β generation. *Clin Exp Immunol*. 2007;147(2):227–35.
149. Haroon E, Raison CL, Miller AH. Psychoneuroimmunology meets neuropsychopharmacology: Translational implications of the impact of inflammation on behavior. *Neuropsychopharmacology*. 2012;37(1):137–62.
150. Song X, Fan X, Li X, Zhang W, Gao J, Zhao J, et al. Changes in pro-inflammatory cytokines and body weight during 6-month risperidone treatment in drug naïve, first-episode schizophrenia. *Psychopharmacology (Berl)*. 2014;231(2):319–25.
151. Rosenblat JD, McIntyre RS. Bipolar Disorder and Inflammation. *Psychiatr Clin NA*. 2016;39(1):125–37.
152. de Moraes-Zani K, Grego KF, Tanaka AS, Tanaka-Azevedo AM. Depletion of plasma albumin for proteomic analysis of Bothrops jararaca snake plasma. *J Biomol Tech*. 2012;22(2):67–73.
153. Sigma. Technical Bulletin Bradford Reagent. 2014. p. 1–6.
154. Wiśniewski JR, Zougman A, Nagaraj N, Mann M. Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nat Methods*. 2009;6(5):359–62.
155. Rappsilber J, Mann M, Ishihama Y. Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips. *Nat Protoc*. 2007;2(8):1896–906.
156. Firmino M, Weis SN, Souza JMF, Gomes BRB, Mól AR, Mortari MR, et al. Label-free quantitative proteomics of rat hypothalamus under fever induced by LPS and PGE2. *J Proteomics*. 2018;187(July):182–99.
157. Cox J, Mann M. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat Biotechnol*. 2008;26(12):1367–72.
158. Cox J, Neuhauser N, Michalski A, Scheltema RA, Olsen J V., Mann M. Andromeda: A peptide search engine integrated into the MaxQuant environment. *J Proteome Res*. 2011;10(4):1794–805.

159. Cox J, Hein MY, Luber CA, Paron I, Nagaraj N, Mann M. Accurate proteome-wide label-free quantification by delayed normalization and maximal peptide ratio extraction, termed MaxLFQ. *Mol Cell Proteomics*. 2014;13(9):2513–26.
160. Tyanova S, Temu T, Sinitcyn P, Carlson A, Hein MY, Geiger T, et al. The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. *Nat Methods*. 2016;13(9):731–40.
161. Pathan M, Keerthikumar S, Ang C, Gangoda L, Ryan MT, Agbinya JI, et al. FunRich : An open access standalone functional enrichment and interaction network analysis tool. *Proteomics*. 2015;15:2597–601.
162. Fabregat A, Jupe S, Matthews L, Sidiropoulos K, Gillespie M, Garapati P, et al. The Reactome pathway knowledgebase. *Nucleic Acids Res*. 2018;46(D1):D649–55.
163. Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc*. 2009;4(1):44–57.
164. Otasek D, Morris JH, Bouças J, Pico AR, Demchak B. Cytoscape automation: Empowering workflow-based network analysis. *Genome Biol*. 2019;20(1):1–15.
165. de Jesus JR, Galazzi RM, de Lima TB, Banzato CEM, de Almeida Lima e Silva LF, de Rosalmeida Dantas C, et al. Simplifying the human serum proteome for discriminating patients with bipolar disorder of other psychiatry conditions. *Clin Biochem*. 2017;50(18):1118–25.
166. Alsaif M, Guest PC, Schwarz E, Reif A, Kittel-Schneider S, Spain M, et al. Analysis of serum and plasma identifies differences in molecular coverage, measurement variability, and candidate biomarker selection. *Proteomics - Clin Appl*. 2012;6(5–6):297–303.
167. Herberth M, Koethe D, Levin Y, Schwarz E, Krzyszton ND, Schoeffmann S, et al. Peripheral profiling analysis for bipolar disorder reveals markers associated with reduced cell survival. *Proteomics*. 2011;11:94–105.
168. La YJ, Wan CL, Zhu H, Yang YF, Chen YS, Pan YX, et al. Decreased levels of apolipoprotein A-I in plasma of schizophrenic patients. *J Neural Transm*.

- 2007;114(5):657–63.
169. Knöchel C, Kniep J, Cooper JD, Stäblein M, Wenzler S, Sarlon J, et al. Altered apolipoprotein C expression in association with cognition impairments and hippocampus volume in schizophrenia and bipolar disorder. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.* 2017;267(3):199–212.
 170. Sussulini A, Dihazi H, Banzato CEM, Arruda MAZ, Stuhmer W, Ehrenreich H, et al. Apolipoprotein A-I as a candidate serum marker for the response to lithium treatment in bipolar disorder. *Proteomics.* 2011;11(2):261–9.
 171. Haenisch F, Alsaif M, Guest PC, Rahmoune H, Dickerson F, Yolken R, et al. Multiplex immunoassay analysis of plasma shows prominent upregulation of growth factor activity pathways linked to GSK3 β signaling in bipolar patients. *J Affect Disord.* 2014;156:139–43.
 172. Ren J, Zhao G, Sun X, Liu H, Jiang P, Chen J, et al. Identification of plasma biomarkers for distinguishing bipolar depression from major depressive disorder by iTRAQ-coupled LC–MS/MS and bioinformatics analysis. *Psychoneuroendocrinology.* 2017;86:17–24.
 173. Giusti L, Ciregia F, Mazzoni MR, Lucacchini A. Proteomics insight into psychiatric disorders: an update on biological fluid biomarkers. *Expert Rev Proteomics.* 2016;13(10):941–50.
 174. Huang J, Wang L, Prabakaran S, Wengenroth M, Lockstone HE, Koethe D, et al. Independent protein-profiling studies show a decrease in apolipoprotein A1 levels in schizophrenia CSF, brain and peripheral tissues. *Mol Psychiatry.* 2008;13:1118–28.
 175. Li Y, Zhou K, Zhang Z, Sun L, Yang J, Zhang M, et al. Label-free quantitative proteomic analysis reveals dysfunction of complement pathway in peripheral blood of schizophrenia patients: evidence for the immune hypothesis of schizophrenia. *Mol Biosyst.* 2012;(8):2664–71.
 176. Massey JB, Pownall HJ. Surface properties of native human plasma lipoproteins and lipoprotein models. *Biophys J.* 1998;74:869–78.
 177. Das M, Gursky O. Amyloid-forming properties of human apolipoproteins:

- sequence analyses and structural insights. In: *Lipids in Protein Misfolding*. Springer, Cham; 2015. p. 175–211.
178. Lund-Katz S, Phillips MC. High density lipoprotein structure-function and role in reverse cholesterol transport. In: Harris JR, editor. *Cholesterol Binding and Cholesterol Transport Proteins*. Dordrecht: Springer; 2010. p. 183–227.
 179. Rye KA, Bursill CA, Lambert G, Tabet F, Barter PJ. The metabolism and anti-atherogenic properties of HDL. *J Lipid Res*. 2009;50(SUPPL.):195–200.
 180. Song YR, Wu B, Yang YT, Chen J, Zhang LJ, Zhang ZW, et al. Specific alterations in plasma proteins during depressed, manic, and euthymic states of bipolar disorder. *Brazilian J Med Biol Res*. 2015;48(11):973–82.
 181. Wan C, La Y, Zhu H, Yang Y, Jiang L, Chen Y, et al. Abnormal changes of plasma acute phase proteins in schizophrenia and the relation between schizophrenia and haptoglobin (Hp) gene. *Amino Acids*. 2007;32:101–8.
 182. Safari-Alighiarloo N, Taghizadeh M, Rezaei-Tavirani M, Goliaei B, Peyvandi AA. Protein-protein interaction networks (PPI) and complex diseases. *Gastroenterol Hepatol from Bed to Bench*. 2014;7(1):17–31.
 183. Vella D, Marini S, Vitali F, Di Silvestre D, Mauri G, Bellazzi R. MTGO: PPI Network analysis via topological and functional module identification. *Sci Rep*. 2018;8(1):1–13.
 184. Mosnier LO, Bouma BN. Regulation of fibrinolysis by Thrombin Activatable Fibrinolysis Inhibitor, an unstable carboxypeptidase B that unites the pathways of coagulation and fibrinolysis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26(11):2445–53.
 185. Naito M, Taguchi O, Kobayashi T, Takagi T, D'Alessandro-Gabazza CN, Matsushima Y, et al. Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor protects against acute lung injury by inhibiting the complement system. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2013;49(4):646–53.
 186. Amara U, Flierl MA, Rittirsch D, Klos A, Chen H, Acker B, et al. Molecular intercommunication between the complement and coagulation systems. *J Immunol*. 2010;185(9):5628–36.

187. Kenawy HI, Boral I, Bevington A. Complement-coagulation cross-talk: a potential mediator of the physiological activation of complement by low pH. *Front Immunol.* 2015;6(215).
188. Hoirisch-Clapauch S, Amaral OB, Mezzasalma MAU, Panizzutti R, Nardi AE. Dysfunction in the coagulation system and schizophrenia. *Transl Psychiatry.* 2016;6(e704):1–8.
189. Theodore Peters J. All about albumin: biochemistry, genetics, and medical applications. San Diego, Ca: Academic Press; 1996. 432 p.
190. Sun Q, Kiernan UA, Shi L, Phillips DA, Kahn BB, Hu FB, et al. Plasma retinol-binding protein 4 (RBP4) levels and risk of coronary heart disease: A prospective analysis among women in the nurses' health study. *Circulation.* 2013;127(19):1938–47.
191. Liu Y, Wang D, Li D, Sun R, Xia M. Associations of retinol-binding protein 4 with oxidative stress, inflammatory markers, and metabolic syndrome in a middle-aged and elderly Chinese population. *Diabetol Metab Syndr.* 2014;6(25):1–8.
192. Yun SL, A YK, Jin WC, Kim M, Yasue S, Hee JS, et al. Dysregulation of adipose glutathione peroxidase 3 in obesity contributes to local and systemic oxidative stress. *Mol Endocrinol.* 2008;22(9):2176–89.
193. Voetsch B, Jin RC, Bierl C, Benke KS, Kenet G, Simioni P, et al. Promoter polymorphisms in the plasma glutathione peroxidase (GPx-3) gene: A novel risk factor for arterial ischemic stroke among young adults and children. *Stroke.* 2007;38(1):41–9.
194. Comes AL, Papiol S, Mueller T, Geyer PE, Mann M, Schulze TG. Proteomics for blood biomarker exploration of severe mental illness: pitfalls of the past and potential for the future. *Transl Psychiatry.* 2018;8(160):1–15.
195. Jaros JAJ, Martins-de-Souza D, Rahmoune H, Schwarz E, Leweke FM, Guest PC, et al. Differential phosphorylation of serum proteins reflecting inflammatory changes in schizophrenia patients. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.* 2012;262:453–5.
196. Jaros JA, Rahmoune H, Wesseling H, Leweke FM, Ozcan S, Guest PC, et al.

- Effects of olanzapine on serum protein phosphorylation patterns in patients with schizophrenia. *Proteomics - Clin Appl.* 2015;9(9–10):907–16.
197. Domenici E, Wille DR, Tozzi F, Prokopenko I, Miller S, Brittain C, et al. Plasma protein biomarkers for depression and schizophrenia by multi analyte profiling of case-control collections. *PLoS One.* 2010;5(2):e1966.
 198. Prabakaran S, Wengenroth M, Lockstone HE, Lilley K, Leweke FM, Bahn S. 2-D DIGE analysis of liver and red blood cells provides further evidence for oxidative stress in schizophrenia. *J Proteome Res.* 2007;6(1):141–9.
 199. Todorov H, Searle-White E, Gerber S. Applying univariate vs. multivariate statistics to investigate therapeutic efficacy in (pre)clinical trials: A Monte Carlo simulation study on the example of a controlled preclinical neurotrauma trial. *PLoS One.* 2020;15(3):1–20.
 200. Goldstein BI, Kemp DE, Soczynska JK, McIntyre RS. Inflammation and the phenomenology, pathophysiology, comorbidity, and treatment of bipolar disorder: A systematic review of the literature. *J Clin Psychiatry.* 2009;70(8):1078–90.
 201. Leonard BE, Schwarz M, Myint AM. The metabolic syndrome in schizophrenia: Is inflammation a contributing cause? *J Psychopharmacol.* 2012;26:33–41.
 202. Dunkelberger JR, Song W. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell Res.* 2010;20(1):34–50.
 203. Kaimal V, Bardes EE, Tabar SC, Jegga AG, Aronow BJ. ToppCluster: a multiple gene list feature analyzer for comparative enrichment clustering and network-based dissection of biological systems. *Nucleic Acids Res.* 2010;38:W96–102.
 204. Yatham LN, Kennedy SH, Parikh S V., Schaffer A, Bond DJ, Frey BN, et al. Canadian Network for Mood and Anxiety Treatments (CANMAT) and International Society for Bipolar Disorders (ISBD) 2018 guidelines for the management of patients with bipolar disorder. *Bipolar Disord.* 2018;20(2):97–170.
 205. Raskind MA, Burke BL, Crites NJ, Tapp AM, Rasmussen DD. Olanzapine-induced weight gain and increased visceral adiposity is blocked by melatonin

- replacement therapy in rats. *Neuropsychopharmacology*. 2007;32(2):284–8.
206. Jamaluddin SJ, Nilugal KC, Kulkarni NM, Fattepur S, Abdullah I, Ugandar RE. High fat worsens olanzapine induced metabolic abnormalities in rats. *Br Food J*. 2020;1–11.
 207. Ghuman J, Zunszain PA, Petitpas I, Bhattacharya AA, Otagiri M, Curry S. Structural basis of the drug-binding specificity of human serum albumin. *J Mol Biol*. 2005;353(1):38–52.
 208. Rimac H, Debeljak Ž, Bojić M, Miller L. Displacement of drugs from human serum albumin: From molecular interactions to clinical significance. *Curr Med Chem*. 2017;24(18):1930–47.
 209. Shahlaei M, Rahimi B, Ashrafi-Kooshk MR, Sadrjavadi K, Khodarahmi R. Probing of possible olanzapine binding site on human serum albumin: Combination of spectroscopic methods and molecular dynamics simulation. *J Lumin*. 2015;158:91–8.
 210. Banis GE, Winkler T, Barton P, Chocron SE, Kim E, Kelly DL, et al. The binding effect of proteins on medications and its impact on electrochemical sensing: Antipsychotic clozapine as a case study. *Pharmaceuticals*. 2017;10(3):1–12.
 211. Pfrieger FW. Cholesterol homeostasis and function in neurons of the central nervous system. *Cell Mol Life Sci*. 2003;60(6):1158–71.
 212. Vance JE, Karten B, Hayashi H. Lipid dynamics in neurons. *Biochem Soc Trans*. 2006;34(3):399–403.
 213. Boiko AS, Mednova IA, Kornetova EG, Semke A V., Bokhan NA, Loonen AJM, et al. Apolipoprotein serum levels related to metabolic syndrome in patients with schizophrenia. *Heliyon*. 2019;5(7):e02033.
 214. Lu M, Lu Q, Zhang Y, Tian G. ApoB/apoA1 is an effective predictor of coronary heart disease risk in overweight and obesity ☆. *J Biomed Res*. 2011;25(4):266–73.
 215. Kappelle PJWH, Gansevoort RT, Hillege JL, Wolffenbuttel BHR, Dullaart RPF. Apolipoprotein B/A-I and total cholesterol/high-density lipoprotein cholesterol

- ratios both predict cardiovascular events in the general population independently of nonlipid risk factors, albuminuria and C-reactive protein. *J Intern Med.* 2011;269(2):232–42.
216. Jauhar S, Young AH. Controversies in bipolar disorder; role of second-generation antipsychotic for maintenance therapy. *Int J Bipolar Disord.* 2019;7(1).
 217. Prior RL, Cao G. In vivo total antioxidant capacity: Comparison of different of analytical methods. *Free Radic Biol Med.* 1999;27:1173–81.
 218. Kohen R, Nyska A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol Pathol.* 2002;30(6):620–50.
 219. Møller P, Loft S. Dietary antioxidants and beneficial effect on oxidatively damaged DNA. *Free Radic Biol Med.* 2006;41(3):388–415.
 220. Carocho M, Ferreira ICFR. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food Chem Toxicol.* 2013;51(1):15–25.
 221. Sies H. Biochemistry of Oxidative Stress. *Angew Chemie Int Ed English.* 1986;25:1058–71.
 222. Jones DP. Redefining Oxidative Stress. *Antioxid Redox Signal.* 2006;8(9–10):1865–79.
 223. Sies H, Jones D. Oxidative Stress. *Encycl Stress.* 2007;3:45–8.
 224. Prabhulkar S, Tian H, Wang X, Zhu J-J, Li C-Z. Engineered Proteins: Redox Properties and Their Applications. *Antioxid Redox Signal.* 2012;17(12):1796–822.
 225. Droge W. Redox regulation in anabolic and catabolic processes. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2006;9:190–5.
 226. Janssen-heininger YMW, Mossman BT, Heintz NH, Forman HJ, Kalyanaraman B, Finkel T, et al. Redox-based regulation of signal transduction: Principles, pitfalls, and promises. *Free Radic Biol Med.* 2008;45:1–17.

227. Castegna A, Aksenov M, Aksenova M, Markesbery WR, Butterfield DA. Proteomics identification of oxidatively modified proteins in Alzheimer's disease brain. Part I: creatinine kinase bb, glutamine synthase, and ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L-1. *Free Radic Biol Med*. 2002;33(4):562–71.
228. Sies H, Berndt C, Jones DP. Oxidative stress. *Annu Rev Biochem*. 2017;(86):715–48.
229. Held JM, Gibson BW. Regulatory Control or Oxidative Damage? Proteomic Approaches to Interrogate the Role of Cysteine Oxidation Status in Biological Processes. *Mol Cell Proteomics*. 2012;11(4):1–11.
230. Priscille Giron, Dayon L, Sanchez J-C. Cysteine tagging from MS-based proteomics. *Mass Spectrom Rev*. 2011;30:366–95.
231. Conte M Lo, Carroll KS. The Chemistry of Thiol Oxidation and Detection. In: Jakob U, Reichmann D, editors. *Oxidative stress and Redox regulation*. Dordrecht: Springer; 2013. p. 1–42.
232. Jacob C, Giles GI, Giles NM, Sies H. Sulfur and selenium: The role of oxidation state in protein structure and function. *Angew Chemie Int Ed*. 2003;42:4742–58.
233. Go Y, Jones DP. The Redox Proteome *. *J Biol Chem*. 2013;288(37):26512–20.
234. Brandes N, Schmitt S, Jakob U. Thiol-based redox switches in eukaryotic proteins. *Antioxidants Redox Signal*. 2009;11(5):997–1014.
235. Lennicke C, Rahn J, Heimer N, Lichtenfels R, Wessjohann LA, Seliger B. Redox proteomics: Methods for the identification and enrichment of redox-modified proteins and their applications. *Proteomics*. 2016;16(2):197–213.
236. Lee S, Kim SM, Lee RT. Thioredoxin and thioredoxin target proteins: From molecular mechanisms to functional significance. *Antioxid Redox Signal*. 2013;18(10):1167–93.
237. Phalen TJ, Weirather K, Deming PB, Anathy V, Howe AK, Vliet A Van Der, et al. Oxidation state governs structural transitions in peroxiredoxin II that correlate with cell cycle arrest and recovery. *J Cell Biol*. 2006;175(5):779–89.
238. Schafer FQ, Buettner GR. Redox environment of the cell as viewed through the

- redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med*. 2001;30(11):1191–212.
239. Dalle-donne I, Rossi R, Colombo G, Giustarini D, Milzani A. Protein S - glutathionylation: a regulatory device from bacteria to humans. *Trends Biochem Sci*. 2009;34(2):85–96.
 240. Lindahl M, Mata-cabana A, Kieselbach T. The disulfide proteome and other reactive cysteine proteomes: Analysis and functional significance. *Antioxid Redox Signal*. 2011;14(12):2582–630.
 241. Reddie KG, Carroll KS. Expanding the functional diversity of proteins through cysteine oxidation. *Curr Opin Chem Biol*. 2008;12(6):746–54.
 242. El Refaey M, Watkins CP, Kennedy EJ, Chang A, Zhong Q, Ding KH, et al. Oxidation of the aromatic amino acids tryptophan and tyrosine disrupts their anabolic effects on bone marrow mesenchymal stem cells. *Mol Cell Endocrinol*. 2015;410:87–96.
 243. Stadtman ER. Protein oxidation and aging. *Free Radic Res*. 2006;40(12):1250–8.
 244. Brioschi M, Polvani G, Fratto P, Parolari A, Agostoni P, Tremoli E, et al. Redox proteomics identification of oxidatively modified myocardial proteins in human heart failure: Implications for protein function. *PLoS One*. 2012;7(5).
 245. Tomin T, Schittmayer M, Honeder S, Heininger C, Birner-Gruenberger R. Irreversible oxidative post-translational modifications in heart disease. *Expert Rev Proteomics*. 2019;16(8):681–93.
 246. Gómez-Serrano M, Camafeita E, López JA, Rubio MA, Bretón I, García-Consuegra I, et al. Differential proteomic and oxidative profiles unveil dysfunctional protein import to adipocyte mitochondria in obesity-associated aging and diabetes. *Redox Biol*. 2017;11:415–28.
 247. Butterfield DA, Perluigi M, Reed T, Muharib T, Hughes CP, Robinson RAS, et al. Redox proteomics in selected neurodegenerative disorders: From its infancy to future applications. *Antioxidants Redox Signal*. 2012;17(11):1610–55.
 248. Aguilera G, Colín-González AL, Rangel-López E, Chavarría A, Santamaría A.

- Redox signaling, neuroinflammation, and neurodegeneration. *Antioxidants Redox Signal.* 2018;28(18):1626–51.
249. Tovmasyan A, Go Y-M, Jones D, Spasojevic I, Batinic-Haberle I. Redox proteomics of 4T1 breast cancer cell after treatment with MnTE-2-PyP5+/ascorbate system. *Free Radic Biol Med.* 2016;100(Supplement):S112–3.
 250. Ng F, Berk M, Dean O, Bush AI. Oxidative stress in psychiatric disorders: Evidence base and therapeutic implications. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2008;11(6):851–76.
 251. Mahadik SP, Evans D, Lal H. Oxidative stress and role of antioxidant and ω -3 essential fatty acid supplementation in schizophrenia. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry.* 2001;25(3):463–93.
 252. Michel TM, Thome J, Martin D, Nara K, Zwerina S, Tatschner T, et al. Cu, Zn- and Mn-superoxide dismutase levels in brains of patients with schizophrenic psychosis. *J Neural Transm.* 2004;111(9):1191–201.
 253. Akyol A, Herken H, Uz E, Fadıllıoğlu E, Ünal S, Söğüt S, et al. The indices of endogenous oxidative and antioxidative processes in plasma from schizophrenic patients: The possible role of oxidant/antioxidant imbalance. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry.* 2002;26(5):995–1005.
 254. Machado-Vieira R, Andreazza AC, Viale CI, Zanatto V, Cereser V, Vargas R da S, et al. Oxidative stress parameters in unmedicated and treated bipolar subjects during initial manic episode: A possible role for lithium antioxidant effects. *Neurosci Lett.* 2007;421(1):33–6.
 255. Savas HA, Gergerlioglu HS, Armutcu F, Herken H, Yilmaz HR, Kocoglu E, et al. Elevated serum nitric oxide and superoxide dismutase in euthymic bipolar patients: Impact of past episodes. *World J Biol Psychiatry.* 2006;7(1):51–5.
 256. Andreazza AC, Anna MK, Frey BN, Bond DJ, Kapczinski F, Young LT, et al. Oxidative stress markers in bipolar disorder: A meta-analysis. *J Affect Disord.* 2008;111:135–44.
 257. Siwek M, Krzysztof S, Misztak P. Thiobarbituric acid-reactive substances:

- Markers of an acute episode and a late stage of bipolar disorder. *Neuropsychobiology*. 2016;73:116–22.
258. Altuntas I, Aksoy H, Coskun I, Çayköylü A, Akçay F. Erythrocyte superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities, and malondialdehyde and reduced glutathione levels in schizophrenic patients. *Clin Chem Lab Med*. 2000;38(12):1277–81.
 259. Tunçel ÖK, Sarisoy G, Bilgici B, Pazvantoglu O, Çetin E, Ünverdi E, et al. Oxidative stress in bipolar and schizophrenia patients. *Psychiatry Res*. 2015;228(3):688–94.
 260. Thompson A, Schäfer J, Kuhn K, Kienle S, Schwarz J, Schmidt G, et al. Tandem mass tags: A novel quantification strategy for comparative analysis of complex protein mixtures by MS/MS. *Anal Chem*. 2003;75(8):1895–904.
 261. Wiese S, Reidegeld KA, Meyer HE, Warscheid B. Protein labeling by iTRAQ: A new tool for quantitative mass spectrometry in proteome research. *Proteomics*. 2007;7(3):340–50.
 262. Ross PL, Huang YN, Marchese JN, Williamson B, Parker K, Hattan S, et al. Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Mol Cell Proteomics*. 2004;3(12):1154–69.
 263. Jaffrey SR, Snyder SH. The Biotin Switch Method for the Detection of S-Nitrosylated Proteins. *Sci STKE*. 2001;1–10.
 264. Qu Z, Meng F, Bomgarden RD, Viner RI, Li J, Rogers JC, et al. Proteomic quantification and site-mapping of S-nitrosylated proteins using isobaric iodoTMT reagents. *J Proteome Res*. 2014;13(7):3200–11.
 265. Bachi A, Dalle-donne I, Scaloni A. Redox proteomics: Chemical principles, methodological approaches and biological/ biomedical promises. *Chem Rev*. 2013;113(1):596–698.
 266. Zhou Y, Shan Y, Zhang L, Zhang Y. Recent advances in stable isotope labeling based techniques for proteome relative quantification. *J Chromatogr A*. 2014;1365:1–11.
 267. Gygi SP, Rist B, Gerber SA, Turecek F, Gelb MH, Aebersold R. Access

- Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nat Biotechnol.* 1999;17:994–9.
268. Sethuraman M, McComb ME, Huang H, Huang S, Heibeck T, Costello CE, et al. Isotope-coded affinity tag (ICAT) approach to redox proteomics: Identification and quantitation of oxidant-sensitive cysteine thiols in complex protein mixtures. *J Proteome Res.* 2004;3(6):1228–33.
 269. Boersema PJ, Raijmakers R, Lemeer S, Mohammed S, Heck AJR. Multiplex peptide stable isotope dimethyl labeling for quantitative proteomics. *Nat Protoc.* 2009;4(4):484–94.
 270. Altelaar AFM, Frese CK, Preisinger C, Hennrich ML, Schram AW, Timmers HTM, et al. Benchmarking stable isotope labeling based quantitative proteomics. *J Proteomics.* 2013;88:14–26.
 271. Lau HT, Suh HW, Golkowski M, Ong SE. Comparing SILAC- and stable isotope dimethyl-labeling approaches for quantitative proteomics. *J Proteome Res.* 2014;13(9):4164–74.
 272. Hsu JL, Huang SY, Chow NH, Chen SH. Stable-isotope dimethyl labeling for quantitative proteomics. *Anal Chem.* 2003;75(24):6843–52.
 273. Hsu JL, Huang SY, Shiea JT, Huang WY, Chen SH. Beyond quantitative proteomics: Signal enhancement of the a1 ion as a mass tag for peptide sequencing using dimethyl labeling. *J Proteome Res.* 2005;4(1):101–8.
 274. Gu L, Evans AR, Robinson RAS. Sample multiplexing with cysteine-selective approaches: CysDML and cPILOT. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2015;26(4):615–30.
 275. Gu L, Robinson RAS. A simple isotopic labeling method to study cysteine oxidation in Alzheimer's disease: Oxidized cysteine-selective dimethylation (OxcysDML). *Anal Bioanal Chem.* 2016;408(11):2993–3004.
 276. Guo J, Gaffrey MJ, Su D, Liu T, Camp DG, Smith RD, et al. Resin-assisted enrichment of thiols as a general strategy for proteomic profiling of cysteine-based reversible modifications. *Nat Protoc.* 2014;9(1):64–75.
 277. Perluigi M, Butterfield DA. The identification of protein biomarkers for oxidative

- stress in Down syndrome. *Expert Rev Proteomics*. 2011;8(4):427–9.
278. Merle NS, Noe R, Halbwachs-Mecarelli L, Fremeaux-Bacchi V, Roumenina LT. Complement system part II: Role in immunity. *Front Immunol*. 2015;6(257).

ANEXO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Dados sobre a pesquisa

Título do projeto: “Estudo proteômico e metalômico para a identificação de possíveis biomarcadores em amostras de soro sanguíneo de pacientes com transtorno afetivo bipolar”

Pesquisador responsável: Alessandra Sussilini

Cargo/função: Professora do Instituto de Química da Unicamp

Faço parte do projeto de pesquisa que tem como objetivo analisar e comparar as proteínas e metaloproteínas de sangue, em pessoas portadoras do transtorno afetivo bipolar ou não (grupo controle), buscando verificar se existe uma relação entre estas proteínas com o transtorno afetivo bipolar, com o tratamento aplicado ou com fatores genéticos.

Para poder realizar esta pesquisa, necessito que o(a) senhor(a) concorde em responder a um breve questionário a respeito dos dados pessoais, do uso de medicamentos e da presença de doenças, e também em doar **5 mL** de sangue para ser analisado. Além disso, convidamos também você a participar de uma entrevista, respondendo perguntas sobre sua saúde mental atual, problemas de saúde apresentados no passado por você ou familiares e tratamentos realizados. Concordando em participar da pesquisa, profissionais qualificados irão coletar o sangue.

É garantido o **sigilo absoluto** de sua identidade na apresentação dos resultados obtidos durante a pesquisa. Caso haja interesse, eu poderei lhe fornecer o resultado individual da análise do seu sangue. Não haverá benefício financeiro ou de qualquer outro tipo. O desconforto e risco possível da participação se referem à coleta de sangue, mas esta será realizada por profissionais qualificados, usando material adequado e descartável. É também garantido que o(a) senhor(a) pode desistir de participar da pesquisa a qualquer momento, sem prejuízos para o seu tratamento atual ou futuro, e que, se eu não autorizar, as amostras coletadas não serão utilizadas para outros fins (elas somente serão utilizadas de acordo com os objetivos deste trabalho).

O(a) senhor(a) receberá uma cópia deste documento e eu me colocarei à disposição para o seu acompanhamento ao laboratório de coleta e também para esclarecimentos necessários antes, durante e após a pesquisa.

Declaro que, depois de esclarecido (a) pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, concordo em participar do Projeto de Pesquisa. Autorizo o armazenamento do meu sangue pelo IQ-Unicamp para utilização em pesquisas futuras, desde que elas sejam devidamente aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da FCM-Unicamp, e se cabível, pelo Conselho Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP):

_____ Sim _____ Não

Campinas, _____ de _____ de 20____.

Assinatura do(a) doador(a)

pesquisador

Assinatura do

Para maiores informações, dúvidas e esclarecimentos sobre a pesquisa, falar com Alessandra Sussulini - telefone: (19) 3521-3060 ou (19) 99324-5795; e-mail: sussulini@iqm.unicamp.br; endereço: Laboratório B226,

Comitê de Ética em Pesquisa - telefone: (19) 35218936; endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126. Cidade Universitária “Zeferino Vaz”, Barão

FORMULÁRIO DE COLETA DE DADOS

GRUPO:
HC:

Data de coleta : / /

1) Nome:

2) Idade: anos

3) Altura: _____

4) Peso: _____

5) É fumante? () sim () não

Caso sim, há quanto tempo? _____ Quantos cigarros por dia? _____

6) Possui alguma doença? () sim () não

Caso sim, qual (is)? _____

7) Faz uso de medicamentos (não considerar aqueles utilizados no tratamento do transtorno afetivo bipolar, se for o caso)? ☐ sim ☐ não

Caso sim: Qual (is)? _____

	Qual
--	------

a dose? _____

Há quanto tempo? _____

Quanto ao transtorno afetivo bipolar:

6) Há quanto tempo foi diagnosticada a doença? _____

7) Já foi diagnosticada anteriormente como depressiva? () sim () não

8) Qual (is) medicamento (s) é (são) utilizado (s) em seu tratamento?

9) Qual a dose? _____

10) Há quanto tempo faz este tratamento? _____

11) Já fez algum tratamento diferente antes do atual? () sim () não

Caso sim, com qual (is) medicamento (s)? Qual a dose?

Outras observações ou comentários:

Tabela ANEXO. Lista de informações de proteínas quantificadas em amostras de soro por MaxQuant ver. 1.6.0.1 usando Perseus ver. 1.6.14.0

IDs	Nome	Gene	Score	# de Peptídeos	Razor + unique peptides	Unique peptides	Sequence coverage [%]	Unique + razor sequence coverage [%]	Unique sequence coverage [%]
Q96IY4	Carboxypeptidase B2	CPB2	5,0	5	5	5	20,5	20,5	20,5
Q06033	Inter-alpha-trypsin inhibitor 3	ITIH3	26,1	7	7	7	14,2	14,2	14,2
P01871	Ig mu chain C region	IGHM	323,3	19	19	19	51,8	51,8	51,8
P22352	Glutathione peroxidase 3	GPX3	13,5	4	4	4	19,6	19,6	19,6
P35542	Serum amyloid A-4 protein	SAA4	67,9	3	3	3	16,8	16,8	16,8
P02746	Complement C1q subcomponent subunit B	C1QB	25,3	2	2	2	12,7	12,7	12,7
P06681	Complement C2	C2	18,9	19	5	5	33,1	10,7	10,7
A0A0G2JMB2	Immunoglobulin heavy constant alpha 2	IGHA2	107,5	14	4	1	72,1	30,9	7,4
Q92954	Proteoglycan 4	PRG4	2,0	2	2	2	3,5	3,5	3,5
P02656	Apolipoprotein C-III	APOC3	47,4	3	3	3	39,3	39,3	39,3
Q03591	Complement factor H-related protein 1	CFHR1	323,3	12	6	1	68,3	39,5	3,7
P00736	Complement C1r subcomponent	C1R	256,4	21	21	21	45,5	45,5	45,5
P00751	Complement factor B	CFB	323,3	43	43	29	39,4	39,4	25
Q14624	Inter-alpha-trypsin inhibitor 4	ITIH4	323,3	35	35	33	49,2	49,2	47,3
P05090	Apolipoprotein D	APOD	97,8	6	6	6	26,5	26,5	26,5
P02768	Serum albumin	ALB	96,1	25	25	22	49,9	49,9	46
P05156	Complement factor I	CFI	115,4	16	16	16	37,7	37,7	37,7
P05452	Tetranectin	CLEC3B	39,3	5	5	5	45,6	45,6	45,6
P03952	Plasma kallikrein	KLKB1	196,2	12	12	12	20,1	20,1	20,1

O14791	Apolipoprotein L1	APOL1	323,3	9	9	9	28,1	28,1	28,1
O43866	CD5 antigen-like	CD5L	17,6	7	7	7	26,8	26,8	26,8
O75636	Ficolin-3	FCN3	32,7	4	4	4	21,2	21,2	21,2
P00450	Ceruloplasmin	CP	323,3	46	46	3	57,7	57,7	5
P00734	Prothrombin	F2	291,1	27	27	27	48,9	48,9	48,9
P00738	Haptoglobin	HP	323,3	29	29	15	64,8	64,8	44,8
P00739	Haptoglobin-related protein	HPR	88,6	20	6	6	54	28,2	28,2
P00742	Coagulation factor X	F10	13,2	8	8	8	20,7	20,7	20,7
P00747	Plasminogen	PLG	323,3	31	31	30	53,2	53,2	51,4
P00748	Coagulation factor XII	F12	143,5	8	8	8	20,5	20,5	20,5
P01008	Antithrombin-III	SERPINC1	186,5	21	21	21	44,8	44,8	44,8
P01009	Alpha-1-antitrypsin	SERPINA1	323,3	31	31	3	66,3	66,3	5,7
P01011	Alpha-1-antichymotrypsin	SERPINA3	323,3	16	16	16	42,1	42,1	42,1
P01019	Angiotensinogen	AGT	304,3	12	12	12	31,5	31,5	31,5
P01023	Alpha-2-macroglobulin	A2M	323,3	76	76	68	63,3	63,3	57,1
P01024	Complement C3	C3	323,3	112	112	100	74,1	74,1	67,7
P01031	Complement C5	C5	323,3	29	29	29	26,1	26,1	26,1
P01042	Kininogen-1	KNG1	323,3	17	17	1	44,7	44,7	1,9
P01834	Ig kappa chain C region	IGKC	323,3	7	7	7	80,4	80,4	80,4
P01876	Ig alpha-1 chain C region	IGHA1	323,3	16	16	6	64,9	64,9	27,8
P02647	Apolipoprotein A-I	APOA1	323,3	29	29	28	78,3	78,3	78,3
P02649	Apolipoprotein E	APOE	323,3	14	14	14	51,7	51,7	51,7
P02652	Apolipoprotein A-II	APOA2	323,3	7	7	7	51,1	51,1	51,1
P02743	Serum amyloid P-component	APCS	48,5	6	6	6	29,1	29,1	29,1
P02748	Complement component C9	C9	113,3	14	14	14	34,2	34,2	34,2
P02749	Beta-2-glycoprotein 1	APOH	203,2	15	15	15	60,6	60,6	60,6
P02750	Leucine-rich alpha-2-glycoprotein	LRG1	323,3	10	10	10	40,9	40,9	40,9
P02751	Fibronectin	FN1	323,3	56	56	56	42,6	42,6	42,6
P02753	Retinol-binding protein 4	RBP4	208,9	10	10	10	72,4	72,4	72,4
P02760	Alpha-1-microglobulin	AMBP	151,7	11	11	11	44,6	44,6	44,6

P02763	Alpha-1-acid glycoprotein 1	ORM1	323,3	9	9	6	44,8	44,8	32,3
P02765	Alpha-2-HS-glycoprotein	AHSG	323,3	10	10	10	42,2	42,2	42,2
P02766	Transthyretin	TTR	323,3	11	11	11	73,5	73,5	73,5
P02774	Vitamin D-binding protein	GC	323,3	30	30	2	70,7	70,7	5,7
P02775	Platelet basic protein	PPBP	59,8	6	6	6	38,3	38,3	38,3
P02787	Serotransferrin	TF	323,3	60	60	52	73,2	73,2	64,2
P02790	Hemopexin	HPX	323,3	18	18	18	55,8	55,8	55,8
P04003	C4b-binding protein alpha chain	C4BPA	323,3	21	21	21	45,4	45,4	45,4
P04004	Vitronectin	VTN	323,3	15	15	15	34,9	34,9	34,9
P04114	Apolipoprotein B-100	APOB	323,3	187	187	187	52,6	52,6	52,6
P04196	Histidine-rich glycoprotein	HRG	323,3	14	14	14	37,7	37,7	37,7
P04217	Alpha-1B-glycoprotein	A1BG	323,3	16	16	16	57,2	57,2	57,2
P05154	Plasma serine protease inhibitor	SERPINA5	6,3	6	6	6	18	18	18
P05155	Plasma protease C1 inhibitor	SERPING1	180,3	12	12	12	27	27	27
P05160	Coagulation factor XIII B chain	F13B	6,6	7	7	7	19,2	19,2	19,2
P05543	Thyroxine-binding globulin	SERPINA7	11,7	7	7	7	23,1	23,1	23,1
P05546	Heparin cofactor 2	SERPIND1	323,3	15	15	15	36,7	36,7	36,7
P06276	Cholinesterase	BCHE	8,8	7	7	7	17,9	17,9	17,9
P06396	Gelsolin	GSN	323,3	24	24	24	41	41	41
P06727	Apolipoprotein A-IV	APOA4	323,3	24	24	24	59,3	59,3	59,3
P07225	Vitamin K-dependent protein S	PROS1	111,0	13	13	13	25,7	25,7	25,7
P07357	Complement component C8 alpha chain	C8A	101,9	12	12	12	31,5	31,5	31,5
P07358	Complement component C8 beta chain	C8B	43,0	13	13	13	34,5	34,5	34,5
P07360	Complement component C8 gamma chain	C8G	63,2	9	9	9	55	55	55
P07996	Thrombospondin-1	THBS1	60,3	15	15	15	18,6	18,6	18,6
P08185	Corticosteroid-binding globulin	SERPINA6	67,2	8	8	8	30,1	30,1	30,1

P08603	Complement factor H	CFH	323,3	56	56	50	60,4	60,4	54
P08697	Alpha-2-antiplasmin	SERPINF2	60,5	9	9	9	23,4	23,4	23,4
P09871	Complement C1s subcomponent	C1S	58,7	14	14	14	28,5	28,5	28,5
P0C0L4	Complement C4-A	C4A	323,3	70	70	0	49,4	49,4	0
P0C0L5	Complement C4-B	C4B	64,8	70	3	1	49,7	3,3	1
P0CF74	Ig lambda-6 chain C region	IGLC6	229,4	5	5	1	74,5	74,5	9,4
P10643	Complement component C7	C7	182,6	20	20	20	37,4	37,4	37,4
P10909	Clusterin	CLU	230,6	12	12	12	28,6	28,6	28,6
P13671	Complement component C6	C6	275,1	16	16	16	27,5	27,5	27,5
P15169	Carboxypeptidase N catalytic chain	CPN1	50,2	7	7	7	29	29	29
P19652	Alpha-1-acid glycoprotein 2	ORM2	264,8	9	6	6	43,8	31,3	31,3
P19823	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2	ITIH2	323,3	23	23	23	35	35	35
P19827	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1	ITIH1	323,3	24	24	24	36,7	36,7	36,7
P20742	Pregnancy zone protein	PZP	323,3	35	27	27	32,4	25,5	25,5
P20851	C4b-binding protein beta chain	C4BPB	48,6	3	3	3	15,9	15,9	15,9
P22792	Carboxypeptidase N subunit 2	CPN2	15,0	6	6	6	15	15	15
P23142	Fibulin-1	FBLN1	45,7	6	6	2	16,9	16,9	4,8
P25311	Zinc-alpha-2-glycoprotein	AZGP1	323,3	12	12	12	46,6	46,6	46,6
P27169	Serum paraoxonase/arylesterase 1	PON1	308,6	12	12	12	57,2	57,2	57,2
P29622	Kallistatin	SERPINA4	31,9	14	14	14	45	45	45
P35858	Insulin-like growth factor-binding protein complex acid labile subunit	IGFALS	45,9	14	14	14	33,1	33,1	33,1
P36955	Pigment epithelium-derived factor	SERPINF1	97,3	12	12	12	34,7	34,7	34,7
P43652	Afamin	AFM	323,3	22	22	22	41,7	41,7	41,7
P51884	Lumican	LUM	32,5	8	8	8	32	32	32

P55058	Phospholipid transfer protein	PLTP	2,4	3	3	3	10,3	10,3	10,3
P68871	Hemoglobin subunit beta	HBB	142,8	12	12	6	83	83	51
P69905	Hemoglobin subunit alpha	HBA1	67,0	8	8	5	70,4	70,4	47,9
P80748	Ig lambda chain V-III region LOI	IGLV3-9	24,9	3	3	3	41,9	41,9	41,9
Q04756	Hepatocyte growth factor activator	HGFAC	10,0	3	3	3	6,4	6,4	6,4
Q08380	Galectin-3-binding protein	LGALS3BP	36,6	6	6	6	15,9	15,9	15,9
Q15485	Ficolin-2	FCN2	4,2	3	3	3	16,7	16,7	16,7
Q16610	Extracellular matrix protein 1	ECM1	10,9	3	3	3	8,9	8,9	8,9
Q96PD5	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase	PGLYRP2	323,3	11	11	11	31,9	31,9	31,9