UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA

HELENA PASSARELLI GIROUD JOAQUIM

**Proteômica da esquizofrenia:
busca por biomarcadores em plaquetas**

São Paulo
2017

HELENA PASSARELLI GIROUD JOAQUIM

**Proteômica da esquizofrenia:
busca por biomarcadores em plaquetas**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do Título
de Doutor em Ciências

Programa de Psiquiatria
Orientador: Prof. Dr. Wagner F. Gattaz

São Paulo
2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Joaquim, Helena Passarelli Giroud
Proteômica da esquizofrenia : busca por
biomarcadores em plaquetas / Helena Passarelli
Giroud Joaquim. -- São Paulo, 2017.
Tese (doutorado) -- Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Psiquiatria.
Orientador: Wagner Farid Gattaz.

Descritores: 1.Biomarcadores 2.Proteômica
3.Plaquetas 4.Esquizofrenia 5.Transtorno bipolar
6.Transtornos psicóticos

USP/FM/DBD-411/17

Joaquim, HPG. Proteômica da esquizofrenia: busca por biomarcadores em plaquetas [doutorado]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina; 2017.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Ao meu amor companheiro, Luis.

Agradecimentos

Ao Prof. Wagner Farid Gattaz, meu orientador, que é exemplo de entrega à academia e que a cada reunião, correção e bronca me transformou em uma profissional mais crítica e cuidadosa.

À Dra. Leda Talib, minha inspiração diária. Inspiração de cuidado, perseverança, dedicação e amor à pesquisa e ao LIM27. Obrigada por não ter aceitado minha desistência da vida acadêmica e ter me trazido de volta. Obrigada por ser além de chefe: uma amiga e parceira nesses últimos 10 anos. Você foi essencial para meu desenvolvimento, meu equilíbrio e minhas conquistas. Que sorte a minha ter você no meu caminho!

Às meninas Alana, Ana, Bruna, Eliane, Jessyka, Laura, Mislene e Tamires que me acompanharam nessa jornada e me mostraram (mesmo sem saber) que aprender é importante, mas repassar o conhecimento e as lições (de vida e de pós-graduanda) é ainda mais recompensador. Vê-las crescer me fez crescer.

Ao meu amigo e companheiro de trabalho, Matheus Bonatto, pela ajuda na tentativa de desvendar o mundo proteômico.

À equipe do Laboratório de Neurociências - LIM27 que estava presente no dia-a-dia, na logística de coleta, administração de amostras e cafés necessários para manutenção da minha sanidade e atenção.

À equipe administrativa do Instituto de Psiquiatria, em especial Eliza, Isabel e Zelinda que sabem cada detalhe da burocracia das agências de fomento e pós-graduação. Sem vocês tudo seria mais difícil.

A todos envolvidos de alguma forma no desenvolvimento desse projeto. Em especial aos psiquiatras responsáveis pelo recrutamento e acompanhamento dos pacientes: Dr. Martinus van der Bilt, Dr. Marcus Zanetti e Dr. Maurício Serpa.

Ao Prof. Chris Turck e sua equipe do *MaxPlanck Institut für Psychiatrie* que me receberam em Munique de braços abertos durante 6 meses dos mais importantes da minha vida. *Dankeschön!*

À minha família.

Luis, meu marido e amigo, que valoriza minhas escolhas e está sempre ao meu lado (mesmo longe), para me acalmar e comemorar. Que me incentiva e inspira a querer sempre ser melhor.

Meus sogros, Carmen e Sidney, pela compreensão sobre minhas escolhas.

Minha cunhada Fernanda pelas comemorações a cada mini-conquista nesse caminho.

Meus pais Cássia e Ubiratan, meus irmãos Daniel e Gustavo, e meus avós; que são a base do que sou e do que faço.

Por estarem comigo a cada passo e me mostrarem que distância não é nada quando há cumplicidade e vontade de compartilhar. O orgulho e o amor de vocês me impulsionam.

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP; processos 2013/10350-9 e 2016/23181-9), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Associação Beneficente Alzira Denise Hertzog da Silva (ABADHS) pelo apoio financeiro a esta pesquisa. Ao programa de Excelência Acadêmica CAPES pela concessão de auxílio para participação em congressos.

*“A real viagem de descoberta não consiste em buscar novas paisagens,
mas em ter novos olhos”*

Marcel Proust

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação: adaptado de *International Committee of Medical Journal Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Sistema Integrado de Bibliotecas. *Diretrizes para apresentação de dissertações e teses da USP – Parte IV (Vancouver)*. Elaborado por Vânia Martins Bueno de Oliveira Funaro (coordenadora), Maria Cláudia Pestana, na Cavarette Dziabas, Eliana Maria Garcia, Maria Fátima dos Santos, Maria Marta Nascimento e Suely Campos Cardoso. 3ª ed revisada, ampliada e modificada. São Paulo: Sistema Integrado de Bibliotecas; 2016.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com o *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

RESUMO

Esquizofrenia é um transtorno psiquiátrico complexo que afeta cerca de 1% da população mundial. Apesar de progressos consideráveis nos últimos anos, a etiologia da doença ainda não foi elucidada principalmente pela heterogeneidade tanto do início quanto da progressão da doença. Frequentemente os sintomas dos pacientes são comuns a outras desordens neuropsiquiátricas, dificultando a diferenciação por meio de métodos essencialmente clínicos. Por isso, pesquisadores têm tentado identificar medidas baseadas em características moleculares que justifiquem e expliquem a etiologia da esquizofrenia. Já há alguns estudos com marcadores no cérebro, mas por esse ser um material com disponibilidade limitada, os esforços tem se concentrado em encontrar biomarcadores periféricos. Este estudo visou traçar um perfil proteico, em plaquetas, de pacientes *drug-naïve* com diagnóstico de esquizofrenia. Para tanto, comparamos este grupo com controles saudáveis e com controles psiquiátricos. Utilizamos duas abordagens proteômicas complementares para análise: a primeira, uma ferramenta clássica utilizando eletroforese bidimensional com posterior identificação dos spots por espectrometria de massas; e a segunda, uma abordagem de identificação em larga escala por *shotgun label-free*.

Foram analisadas amostras de 16 controles saudáveis, de 11 pacientes com esquizofrenia e de 8 pacientes com transtornos do humor (controle psiquiátrico). Com a eletroforese bidimensional foram identificados 110 *spots* comuns nos géis de controles saudáveis, 83 *spots* comuns aos géis de pacientes com esquizofrenia e 80 *spots* comuns aos géis de pacientes com diagnóstico de transtornos do humor. Foram encontrados 27 *spots* exclusivos do grupo controle, não sendo detectados em nenhum dos dois grupos de pacientes. Esses *spots* foram recortados e analisados por espectrometria de massas revelando proteínas relacionadas com: neurotransmissão, sinapse, neurodesenvolvimento, homeostase celular, sinalização de cálcio, apoptose, resposta imune, e estresse oxidativo. Para verificação dos resultados, escolhemos proteínas de acordo com sua função já descrita na literatura e ineditismo na matriz e na casuística estudadas. Por meio da técnica de *western blotting*, encontramos diminuições significantes nos níveis de anexina A3 e peroxirredoxina 6 nos dois grupos de pacientes. Ambas proteínas diferentemente expressas nos pacientes já foram relacionadas à fosfolipase A₂, que é a principal

enzima responsável pelo metabolismo de fosfolípidos de membrana e tem sido associada à desordens neuropsiquiátricas, inclusive à esquizofrenia.

Ainda há algumas abordagens analíticas e bioinformáticas a serem realizadas na busca por candidatos a biomarcadores de esquizofrenia em plaquetas. Os resultados obtidos por *shotgun* necessitam de uma análise mais aprofundada além da verificação e validação em coortes maiores. A casuística utilizada para este trabalho é bastante valiosa já que permitirá a elucidação de alterações proteômicas já no primeiro episódio psicótico.

Palavras-Chave: biomarcadores, proteômica, plaquetas, esquizofrenia, transtorno bipolar, transtornos psicóticos.

ABSTRACT

Schizophrenia is a multifactorial psychiatric disorder that affects about 1% of the world's population. Despite considerable progress in recent years, the etiology of the disease has not yet been elucidated mainly because the heterogeneity of disease onset and progression. Often the symptoms overlap to other neuropsychiatric disorders, which turns difficult to differentiate through essentially clinical methods. The researchers have focused in identify measurable molecular characteristics that can help to elucidate schizophrenia etiology. There are already important findings regarding markers in the brain, but recent efforts have focused on finding peripheral biomarkers. This study aimed to find a protein profile in platelets of schizophrenia drug-naïve patients. For comparison we recruited two more groups: healthy controls and psychiatric control. We used two complementary proteomic approaches for analysis: a classic tool using two-dimensional electrophoresis with subsequent identification of the spots by mass spectrometry; and a large-scale label-free shotgun identification approach.

The sample comprised 11 schizophrenic patients, 8 patients with mood disorders (psychiatric control) and 16 healthy controls. 2-DE profiles of each sample were generated in triplicate. 110 proteins spots were identified in most gels of control group, 83 in most gels of schizophrenia group, and 80 proteins spots in most gels of bipolar disorder patients. Among these proteins spots, 76 were common to all three groups; 5 to controls and schizophrenia group; 2 common to controls and bipolar disorders groups; 2 exclusive of bipolar disorder patients and 27 proteins spots were identified exclusively in the control group. The 27 exclusive protein spots of control group were identified by LC-MS/MS. Proteins related to neurotransmission, synapse, neurodevelopment, cellular homeostasis, calcium signaling, apoptosis, immune response, and oxidative stress were identified. To verify the results, we chose proteins according to their function already described in the literature and novelty in platelets and first onset psychosis patients research. By western blotting we verified the difference in levels of annexin A3 and peroxiredoxin 6 between groups, but not of glutathione S-transferase pi 1 or 78-kDa glucose-regulated protein. Both proteins differentially expressed have already been related to phospholipase A2, which is the main enzyme responsible for the membrane phospholipids metabolism and has been

associated with neuropsychiatric disorders, including schizophrenia. Despite the good and promising results presented and published, there are still some analytical and bioinformatic approaches to be performed in search for candidates for platelet schizophrenia biomarkers. The data from shotgun approach require further analysis, as well as verification and validation in larger cohorts. The sample enrolled in this study is greatly important and certainly informed us much about the proteomic alterations still in the first onset psychosis.

Keywords: biomarkers, proteomics, platelets, schizophrenia, bipolar disorder, psychotic disorders.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema representativo das etapas de separação de proteínas pela técnica de eletroforese bidimensional (2D).	36
Figura 2. Representação esquemática das etapas subsequentes à separação das proteínas por eletroforese bidimensional (2D).	37
Figura 3. Géis selecionados para análise da imagem e seleção dos spots diferentemente expressos.	42
Figura 4. Diagrama de Venn com spots identificados em cada grupo diagnóstico com a metodologia de eletroforese bidimensional.	43
Figura 5. Figura representativa dos spots exclusivos do grupo controle que foram selecionados, recortados e posteriormente analisados por espectrômetro de massas.	43
Figura 6. Rede formada a partir das proteínas identificadas em spots retirados dos géis de controles saudáveis.	52
Figura 7. Expressão proteica da anexina A3 em plaquetas de acordo com os grupos diagnósticos..	53
Figura 8. Rede formada a partir das proteínas identificadas em spots retirados dos géis de controles saudáveis.	54
Figura 9. Expressão proteica da PRX6 (peroxirredoxina 6) em plaquetas de acordo com os grupos diagnósticos.....	55
Figura 10. Expressão proteica da GSTP1 (glutathione s-transferase Pi 1) em plaquetas de acordo com os grupos diagnósticos.....	55
Figura 11. Expressão proteica da GRP78 (<i>glucose-regulated protein</i>) em plaquetas de acordo com os grupos diagnósticos.	56
Figura 12. Diagrama de Venn com proteínas identificadas em cada grupo diagnóstico com a metodologia de <i>shotgun</i>	56
Figura 13. Distribuição das proteínas identificadas antes da normalização.	57
Figura 14. Distribuição das proteínas identificadas após normalização pelo método de Vsn.	58
Figura 15. Rede formada a partir das proteínas identificadas e diferentemente expressas nos grupos diagnósticos.....	59
Figura 16. Análise dos processos biológicos relacionados às proteínas diferencialmente expressas utilizando o software PANTHER 7.0.	61
Figura 17. Análise da função molecular das proteínas diferencialmente expressas utilizando o software PANTHER 7.0.....	62
Figura 18. Análise da localização celular das proteínas diferencialmente expressas utilizando o software PANTHER 7.0.....	63
Figura 19. SDS-Page corado com Coomassie-blue utilizado para conferir a integridade da amostra após os preparos acima descritos.....	83
Figura 20. Amostras focalizadas em tiras de pH 3-10 linear e separadas por SDS-Page.	85
Figura 21. Amostras focalizadas em tiras de pH 4-7 linear e separadas por SDS-Page.	85
Figura 22. SDS-Page de 150ug de proteínas totais focalizadas em tira de pH 4-7 linear.....	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais achados em artigos de proteômica na busca por biomarcadores da esquizofrenia em matrizes periféricas entre 2013 e 2017.	27
Tabela 2. Dados demográficos dos indivíduos recrutados.	34
Tabela 3. Protocolo de incubação para cada anticorpo utilizado considerando tempo e concentração.	38
Tabela 4. Proteínas identificadas exclusivamente nas amostras de controles de acordo com o número de identificação do spot recortado dos géis resultantes da eletroforese bidimensional (continua).	44
Tabela 5. Número de proteínas com coeficiente de variação (CV) de 20 %, 30 % e 50 % de acordo com método utilizado para normalização dos valores de quantificação.	58
Tabela 6. Volume dos <i>spots</i> encontrados em todos os géis analisados de controles saudáveis (continua).	87
Tabela 7. Volume dos <i>spots</i> encontrados em todos os géis analisados de controles saudáveis (conclusão).	89
Tabela 8. Volume dos <i>spots</i> encontrados em todos os géis analisados de pacientes com diagnóstico de esquizofrenia (continua).	90
Tabela 9. Volume dos <i>spots</i> encontrados em todos os géis analisados de pacientes com diagnóstico de transtornos do humor (continua).	92
Tabela 10. Volume dos spots que tiveram <i>matching</i> em cada grupo diagnóstico (continua).	94
Tabela 11. Lista das proteínas identificadas por <i>shotgun</i> diferentemente expressas nos 3 grupos diagnósticos.	97
Tabela 12. Proteínas identificadas por <i>shotgun</i> já relacionadas às vias celulares da ANXA3.	100

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2D-PAGE	eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida
ANXA3	anexina A3
ATP	adenosina trifosfato
BSA	albumina de soro bovino
CID-10	10ª revisão da Classificação Internacional das Doenças
DNA	ácido desoxirribonucleico
DSM IV	4ª edição da Classificação Americana dos Transtornos Mentais
DTT	ditiotreitól
GRP78	78-kDa glucose-regulated protein
GST	glutathionas-transferases
GSTP1	glutathione S-transferase pi 1
IPG	<i>immobilized pH gradient</i>
LC/MS	cromatografia líquida de alta eficiência e espectrometria de massas
MBP	proteína básica de mielina
MOG	glicoproteína de mielina de oligodendrocitos
mRNA	ácido ribonucleico mensageiro
NMDA	receptores glutamatérgicos N-methyl-D-aspartato
PANSS	escala de sintomas positivos e negativos
PCP	fenciclidina
PKC	fosfoquinase C
PLA₂	fosfolipase A ₂
PRP	plasma rico em plaquetas
PRX6	peroxirredoxina 6
PRXs	peroxirredoxinas
RNA	ácido ribonucleico
ROS	espécies reativas de oxigênio
SCZ	esquizofrenia
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SNC	sistema nervoso central
TB	transtorno bipolar
Tris-HCl	trisaminometano - ácido clorídrico

SUMÁRIO

RESUMO	
ABSTRACT	
LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE TABELAS	
ABSTRACT	3
1 INTRODUÇÃO.....	19
1.1 Aspectos gerais da esquizofrenia	19
1.2 Biomarcadores na esquizofrenia.....	22
1.3 Proteômica na busca de biomarcadores na esquizofrenia	24
2 OBJETIVOS.....	30
3 JUSTIFICATIVA.....	31
4 DESENHO	32
5 MATERIAL E MÉTODOS.....	33
5.1 Casuística.....	33
5.2 Separação e lavagem das plaquetas	34
5.3 Preparo de amostra com precipitação das proteínas	35
5.4 Eletroforese bidimensional.....	35
5.5 Identificação dos <i>spots</i> por espectrômetro de massas.....	37
5.6 Validação de proteínas de interesse	38
5.7 <i>Shotgun label-free</i>	39
5.8 Análise dos dados e estatística.....	39
6 RESULTADOS	41
6.1 Eletroforese bidimensional e análise por espectrometria de massas	41
6.2 Validação de proteínas de interesse	53
6.2.1 Metabolismo de membrana.....	53
6.2.2 Estresse oxidativo.....	53
6.3 <i>Shotgun</i>	56
7 DISCUSSÃO.....	64
8 CONCLUSÃO	71
REFERÊNCIAS	72
APÊNDICES	83
ANEXOS.....	101

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais da esquizofrenia

Esquizofrenia é um transtorno psiquiátrico complexo que afeta cerca de 1% da população mundial (van Os e Kapur, 2009). Apesar de progressos consideráveis nos últimos anos, a etiologia da doença ainda não foi elucidada. Há uma clara influência de fatores genéticos associados à esquizofrenia. No entanto, 85% das pessoas com esquizofrenia não tem um parente de primeiro grau com a doença (Sullivan et al., 2003). Também já se observou a influência de fatores ambientais que variam desde complicações obstétricas (Cannon et al., 2000; Cannon et al., 2002; Clarke et al., 2006) e infecções pré-natais até fatores sociodemográficos (Mueser e McGurk, 2004) e abuso de substâncias (Arseneault et al., 2000; Arseneault et al., 2002; Arseneault et al., 2004; Bobes et al., 2010).

O diagnóstico de esquizofrenia é principalmente clínico. É necessário investigar o estado psicopatológico atual e histórico, antecedentes pessoais e familiares (clínicos e psiquiátricos) e abuso de substâncias (revisado em Mueser e McGurk, 2004). Exames laboratoriais e de imagem auxiliam a descartar uma origem orgânica no quadro de psicoses. Oficialmente, o diagnóstico da esquizofrenia no Brasil é feito de acordo com os critérios da 10ª revisão da Classificação Internacional das Doenças (CID-10) (Organização Mundial de Saúde, 1993). O diagnóstico também pode ser feito baseado nos critérios da 4ª edição da Classificação Americana dos Transtornos Mentais (DSM IV-TR) (American Psychiatry Association, 2002).

A esquizofrenia se caracteriza basicamente por: presença de sintomas psicóticos ou positivos (delírios, alucinações), de desorganização (do pensamento e da conduta), sintomas negativos (embotamento afetivo-volitivo), perdas cognitivas e sintomas depressivos e ansiosos (revisado em Silveira et al., 2012). Pode ser dividida em fases pré-mórbida, prodrômica, progressiva e crônica (Lieberman et al., 2001). A fase prodrômica precede o início da doença. É comum que nessa fase a família já procure profissionais em decorrência do aparecimento de sintomas depressivos, que haja o diagnóstico de transtornos do humor e o paciente seja tratado com antidepressivos. Esse período culmina, frequentemente, no primeiro

episódio de psicose. A partir daí inicia-se a chamada fase progressiva do transtornos e evolui para a fase de estabilidade, mas ainda sujeito a recaídas (Napal et al., 2012). Além disso, pode ser dividida em subtipos: paranóide, desorganizada, catatônica, simples e residual. Há mais um subtipo não relacionado, mas possível tanto na CID-10 quanto na DSM IV, que é a esquizofrenia indiferenciada.

Fisiopatologia

- Hipótese dopaminérgica

A hipótese dopaminérgica é a mais estudada e aceita acerca da fisiopatologia da esquizofrenia. As duas principais fontes de evidência que sustentam esta hipótese são: a indução de quadros psicóticos por anfetamina (agente que induz liberação de dopamina) (Laruelle et al., 1996); e o efeito terapêutico das drogas antipsicóticas que bloqueiam os receptores dopaminérgicos, principalmente do subtipo D2 (Kapur e Seeman, 2001).

Uma série de evidências sugere que as anormalidades do sistema dopaminérgico não são uma consequência de um problema primário nos neurônios dopaminérgicos, mas uma alteração nas vias neuronais que controlam o fluxo de dopamina (Laruelle et al., 1999). Alguns autores supõem que o sistema dopaminérgico de pacientes com esquizofrenia esteja hiperresponsivo, porque quando submetidos a uma dose de anfetamina liberam maior quantidade de dopamina em relação aos controles (Laruelle et al., 1996; Breier et al., 1997; Abi-Dargham et al., 1998).

Já em 1975, Seeman e colaboradores demonstraram haver uma relação entre a potência dos diferentes antipsicóticos e sua afinidade pelos receptores dopaminérgicos D2. Atualmente, sabemos que todos os antipsicóticos bloqueiam receptores D2, mas com diferentes graus de afinidade (Talbot e Laruelle, 2002). Muitos pacientes exibem altos níveis de bloqueio dos receptores D2 sem apresentar resposta clínica adequada (Pilowsky et al., 1993). Por outro lado, drogas como a clozapina e a quetiapina são eficazes no tratamento da esquizofrenia, apesar de bloquear um número muito menor de receptores D2 (Farde et al., 1992; Pilowsky et al., 1992). Neste sentido, muitos pesquisadores têm se interessado pelos sistemas que regulam ou modulam o tônus dopaminérgico, como o sistema glutamatérgico.

- Hipótese glutamatérgica

A hipótese do envolvimento do sistema glutamatérgico na fisiopatologia da esquizofrenia surgiu da observação que pacientes com esquizofrenia apresentavam diminuição de glutamato no líquido (Kim et al., 1980). Embora esse achado não tenha sido consistentemente reproduzido (Gattaz et al., 1982), ele originou uma teoria sugerindo déficit de glutamato na esquizofrenia e impulsionou inúmeros estudos na área.

Pesquisas recentes têm sugerido que os receptores glutamatérgicos N-methyl-D-aspartato (NMDA) estão envolvidos na fisiopatologia da esquizofrenia e podem ser alvo para tratamento farmacológico. Os receptores NMDA são neurorreceptores ionotrópicos essenciais para a plasticidade neuronal (Bliss et al., 1993). A atividade dos receptores NMDA é regulada por uma série de fatores que determinam a abertura do canal iônico e consequente entrada do cálcio na célula (Wesseling et al., 2014).

A fonte de evidências mais substancial do envolvimento de receptores NMDA na esquizofrenia está relacionada aos efeitos da fenciclidina (PCP), uma droga desenvolvida como anestésico, mas amplamente usada como droga de abuso. Usuários de PCP desenvolvem com grande frequência sintomas psicóticos que se assemelham a quadros esquizofrênicos (Luby et al., 1959). Estudos posteriores demonstraram que o mecanismo indutor de psicose é justamente o bloqueio de receptores NMDA (Lodge e Anis, 1982). Existem diversos agonistas e antagonistas para os diferentes sítios de ligação do receptor NMDA que foram testados, reproduzindo esses achados ao longo dos anos (Javitt e Zukin, 1991; Olney e Farber, 1995; Javitt et al., 2012; Egerton e Stone, 2012).

Dentre os modelos farmacológicos da esquizofrenia, o modelo de hipofunção NMDA é o que produz quadros psicóticos que mais se assemelham à esquizofrenia. De especial interesse é que em ratos, estereotipias causadas pelo antagonista MK-801 foram antagonizadas por medicamentos antipsicóticos, validando-se assim o modelo glutamatérgico para a psicose (Gattaz et al., 1994; Behrens e Gattaz, 1992).

Um aspecto interessante desse modelo em humanos é que essas drogas raramente induzem psicose em crianças. Isto sugere que os efeitos psicopatogênicos dos antagonistas de NMDA dependem da maturação do sistema nervoso central (SNC), assim como os quadros de esquizofrenia que se iniciam na

adolescência e muito raramente acometem criança (Bressan e Pilowski, 2003; Olney e Farber, 1995).

1.2 Biomarcadores na esquizofrenia

Há alguns anos já se vem tentando identificar biomarcadores moleculares para desordens psiquiátricas que possam auxiliar na detecção de grupos de risco, na elucidação de mecanismos fisiopatológicos da doença, no diagnóstico e prognóstico, no desenvolvimento de terapias e monitorização dos pacientes (revisado em Singh e Rose, 2009; Martins-de-Souza, 2012; Bahn et al., 2013; Vargas, 2014).

Um biomarcador é definido como uma “característica mensurável que reflete processos fisiológicos, farmacológicos ou patológicos” (European Medicines Agency; www.emea.europa.eu). Sendo assim, alterações específicas e mensuráveis por exames de imagem, laboratoriais de fluídos periféricos (sangue, líquido, urina) ou até mesmo moléculas específicas como RNA e DNA podem ser consideradas marcadores biológicos.

Os estudos de neuroimagem são os achados mais efetivos na busca desses biomarcadores e permitiram observar alterações estruturais cerebrais relacionadas à esquizofrenia (revisado em Pickard, 2011). Ao longo de um século de estudos em neuropatologia da esquizofrenia, várias alterações foram apontadas e metanálises confirmaram a presença de alargamento ventricular e diminuição do volume cortical e hipocampal (Harrison, 1999). Essa redução parece estar mais relacionada à diminuição do volume neuronal e das ramificações dendríticas e axonais do que a uma redução do número de neurônios, sugerindo que a alteração sináptica seria o elemento central na patologia da esquizofrenia (Glantz et al., 2006; Harrison, 1999). A ausência de gliose e da assimetria cortical têm sido apontadas como achados sugestivos de alterações precoces no desenvolvimento cerebral em pacientes com esquizofrenia (Bogerts, 1999). Vários estudos de imagem de nosso grupo puderam confirmar, nas últimas décadas, a existência de alterações anatômicas cerebrais em associação ao diagnóstico de esquizofrenia quando comparados com controles saudáveis (Gattaz et al., 1988; Sallet et al., 2003 ab).

Recentemente, estudos morfométricos detalhados identificaram reduções volumétricas cerebrais em portadores de esquizofrenia, envolvendo o córtex

temporal medial (hipocampo, giro para-hipocampal e amígdala), o córtex pré-frontal, o neocórtex temporal, a ínsula, os gânglios da base e o tálamo (Wright et al., 2000; Honea et al., 2005). Tais achados foram identificados não apenas em amostras de pacientes com esquizofrenia crônica, mas também em grupos de pacientes em primeiro episódio psicótico, demonstrando a presença de alterações estruturais já no início da doença (Steen et al., 2006). Essas alterações precoces dão suporte às hipóteses de que os sintomas da esquizofrenia podem ter, como base fisiopatológica, processos cerebrais com início nas fases do neurodesenvolvimento. Por outro lado, alguns estudos revelam que algumas alterações cerebrais podem progredir ao longo do tempo, sugerindo a ocorrência de processos neurodegenerativos durante o curso da doença (Ho et al., 2003). Na mesma linha, estudos envolvendo indivíduos com alto risco para desenvolver a doença vêm demonstrando que algumas alterações cerebrais, tais como redução de volume hipocampal, podem preceder o início da doença e tendem a progredir com a evolução da esquizofrenia (Keshavan et al., 2006).

Há também diversos estudos em diferentes níveis celulares que envolvem: genoma, transcriptoma, proteoma e metaboloma. Em alguns casos, inclusive, os achados se sobrepõem fortalecendo a associação de determinadas vias biológicas ao desenvolvimento da doença. Inúmeros achados relacionam o sistema imune e vias de inflamação à esquizofrenia. Também foram descritas diferenças de expressão de genes e proteínas relacionados ao metabolismo, ciclo celular e apoptose comparando pacientes e grupos controle.

Candidatos a biomarcadores genéticos já foram extensamente estudados e descritos (Le-Niculescu et al., 2009; Poelmans et al., 2011; Barnett e Smoller 2009; Kvajo et al., 2010). Porém, apesar de serem úteis, estudos genômicos não elucidaram importantes questões da fisiopatologia da esquizofrenia e nem identificaram biomarcadores para diagnóstico, prognóstico ou tratamento (revisado em Davaliev et al., 2016). A expressão gênica não se correlaciona necessariamente com o padrão de expressão proteica e não permite identificar ou quantificar proteínas que tenham papel fundamental na desordem relacionada (Neale et al., 2012). Além disso, cada vez mais se acredita na interação de processos do neurodesenvolvimento e efeitos ambientais para desencadear o início da doença (Albus, 2012).

Assim, a procura por biomarcadores tem-se voltado para os verdadeiros efetores da função fisiológica: as proteínas. O conjunto de proteínas expressas e suas interações com outras moléculas variam de acordo com o tecido ou até mesmo a célula em determinado período de tempo, espaço e condição fisiológica que se encontra, especialmente quando comparados estados patológicos e normais (Lakhan, 2006; Sokolowska et al., 2013).

1.3 Proteômica na busca de biomarcadores na esquizofrenia

Proteoma é o conjunto de proteínas expressa por determinada célula, tecido ou organismo em um tempo e condições definidos (Wilkins et al., 1996; Ngounou, 2013; Sokolowska et al., 2012) incluindo modificações decorrentes de fatores internos ou externos (Darie et al., 2004, 2005; Sokolowska et al., 2012; Spellman et al., 2008). A proteômica tem como objetivo elucidar processos biológicos baseada na comparação quantitativa e qualitativa de proteomas. Há algumas características biológicas que não podem ser acessadas por meio de estudos de genômica, apenas proteômica, na busca por biomarcadores: i) a expressão ou função proteica pode ser alterada por diferentes processos pós-traducionais que dificilmente serão identificados no DNA; ii) não há uma correlação entre níveis de transcrição a partir do DNA e tradução a partir do mRNA; iii) ocorrência de *splicing* alternativos e modificações pós-traducionais podem resultar diferentes proteínas a partir de um único gene transcrito (Darie et al., 2004, 2005; Sokolowska et al., 2012, Davalieva et al., 2016).

Entre 2013 e 2017 foram publicados, entre artigos originais e revisões, 151 trabalhos em revistas internacionais sobre proteômica da esquizofrenia e sua aplicabilidade na busca por biomarcadores. Nos 5 anos anteriores a esse período foram menos de 100 publicações. Isso demonstra a importância e também o crescimento nesse campo de pesquisa. Estudos em diferentes tecidos auxiliaram na interpretação e elucidação de complexas redes e vias proteicas e vias de transdução de sinais que estão sabidamente alteradas na esquizofrenia. Além disso, os avanços nas plataformas de análise de dados proteômicos têm permitido a identificação de centenas a milhares de moléculas sem que uma hipótese inicial seja, necessariamente, pensada. Aumentando, assim, as chances de identificação de candidatos a biomarcadores nas mais diversas matrizes.

A maioria dos estudos já publicados acerca da proteômica em esquizofrenia foram realizados em tecido cerebral, investigando seis diferentes regiões: córtex frontal e pré-frontal (Johnston-Wilson et al., 2000; Prabakaran et al., 2004; Mei et al., 2006; Novikova et al., 2006; Huang et al., 2008; Pennington et al., 2008; Smalla et al., 2008; Behan et al., 2009; English et al., 2009; Martins-de-Souza et al., 2009a,b; Varadarajulu et al., 2012), córtex cingulado anterior (Beasley et al., 2006; Clark et al., 2006, 2007; Martins-de-Souza et al., 2010c Föcking et al., 2015), corpo caloso (Sivagnanasundaram et al., 2007; Steiner et al., 2014; Saia-Cereda et al., 2015), lobotemporal neocórtex (Martins-de-Souza et al., 2009b,d), hipocampo (Nesvaderani et al., 2009; Föcking et al., 2011 Martins-de-Souza et al., 2010a) e tálamo (Varadarajulu et al., 2012). Independente da região analisada ou da abordagem utilizada, algumas alterações são comuns e parecem realmente estar associadas à fisiopatologia da esquizofrenia (revisado em Davalieva et al., 2016).

Proteínas relacionadas às vias do metabolismo energético (glicólise, ciclo de Krebs) são constantemente citadas nas diferentes regiões cerebrais. Além disso, diferentes ATP-sintases já foram descritas, sugerindo alterações também na função mitocondrial em pacientes com esquizofrenia. Uma das principais consequências da desregulação do metabolismo energético é a superprodução de espécies reativas a oxigênio e consequente estresse oxidativo.

O estresse oxidativo é consequência de um controle redox anormal (Wu et al., 2013) em que os níveis celulares de espécies reativas de oxigênio (ROS) excedem a capacidade antioxidante. Embora os níveis normais de ROS sejam necessários para a função fisiológica adequada, ROS excessivos podem: 1) afetar a viabilidade do DNA, introduzir mutações e modificar a expressão gênica (Konat, 2003); 2) modificar aminoácidos de forma que as proteínas sejam tornadas não funcionais (Stadtman e Levine, 2003); 3) causar peroxidação lipídica, resultando em danos à membrana celular e às membranas das organelas celulares (Horton e Fairhurst, 1987). Pacientes psicóticos em geral estão em uma condição de longo prazo de estresse oxidativo significativamente aumentada (Owe-Larsson et al., 2011; Ruiz-Litago et al., 2012). Um aumento significativo do estresse oxidativo e diminuição da atividade antioxidante tem sido observado no estágio crônico da esquizofrenia em comparação com a fase aguda (Dadheech et al., 2006). Em estudos de proteômica esta alteração já foi relacionada a diversos grupos de enzimas, mas principalmente

às peroxirredoxinas (PRXs), glutationas-transferases (GST), oxirredutases NADPH-dependentes e enzimas antioxidantes (revisado em Wu et al., 2013).

Modificações na abundância de proteínas envolvidas na manutenção da estrutura celular também têm sido consistentemente descritas. Os principais componentes do citoesqueleto alterados são: (1) microfilamentos compostos de actina, (2) microtúbulos compostos por tubulina, (3) filamentos intermediários, que são uma família de cerca de 70 proteínas diferentes e (4) proteínas associadas a microtúbulos. Essas alterações na estrutura e membrana de células nervosas podem culminar em alterações de transdução de sinal e função sináptica (Davalieva et al., 2016).

Apesar de os principais estudos relacionados a proteômica da esquizofrenia terem utilizado tecido cerebral como matriz não se pode desconsiderar a influência da medicação crônica, da idade e do próprio curso da doença nas características moleculares e no perfil proteico do tecido (Harrison et al., 2011). Sendo assim, estudos mais novos têm focado em matrizes periféricas mais acessíveis como plasma e soro sanguíneos, líquido, ou até mesmo fibroblastos, células mononucleares e saliva (resumidos na Tabela 1).

Tabela 1. Principais achados em artigos de proteomica na busca por biomarcadores da esquizofrenia em matrizes perifericas entre 2013 e 2017.

Referencia	Matriz	Principais achados
Domenici et al., 2010	Plasma	Alteracao de fatores de crescimento ediferentes neurotrofinas em pacientes com esquizofrenia.
Guest et al., 2010	Soro	Aumento dos níveis circulantes de peptideos relacionados à insulina e à cromogranina A em pacientes em primeiro surto de esquizofrenia.
Herberth et al.,2010	Celulas mononucleares sanguineas	Proteinas relacionadas a vias de glicolise capazes de discriminar pacientes drug-naive com esquizofrenia.
Martins-de-Souza et al., 2010	Liquor	Alteracoes no metabolismo de colesterol e de fosfolipides.
Schwarz et al.,2010	Soro	Validação de um painel de biomarcadores para a assinatura molecular de desenvolvimento esquizofrenia.
Wang et al., 2010	Fibroblastos	Alterações na expressão de mRNA e proteínas do ciclo celular e resposta ao crescimento de fibroblastos de pacientes com esquizofrenia.
Guest et al., 2011	Soro	Sete analitos mostraram diferenças significativas na esquizofrenia, apoiando a hipótese de desequilíbrio metabólico, como a resistência à insulina.
Schwarz et al., 2011	Soro	Proposta de assinatura de biomarcadores para início ou desenvolvimento da esquizofrenia. Apesar de nao especifico em comparacao com depressao e transtorno bipolar, possivel diferenciar controles saudaveis.
Albertini et al., 2012	Liquor	Redução global das espécies de A β , não apenas A β 1-42.
Jaros et al., 2012	Soro	59 fosfoproteínas alteradas quanto a fosforilação, mas não em níveis totais de proteína.
Li et al., 2012	Soro	27 proteínas alteradas e relacionadas a vias do sistema imunológico.
Schwarz et al., 2012	Soro	A identificação de 20 moléculas (p.e, cortisol, CTGF, SAP, TFF3, IL-17) alteradas antes das manifestações clínicas da esquizofrenia.
Schwarz et al., 2012	Soro	Assinaturas moleculares da gravidade dos sintomas e resposta ao tratamento, incluindo biomarcadores relacionados à insulina e leptina.
Baumgartner et al., 2013	Soro	Sugere a expressão de 14-3-3 γ como fator de normalização na pesquisa de biomarcadores.
Schwarz et al., 2013	Soro	Estratificacao de pacientes SCZ com base em diferenças distintas em seus perfis de soro molecular.
Awam et al., 2014	Soro	Combinacao de perfil metabólico/proteomico, sugerindo moléculas como colesterol, lipídios bioativos e apolipoproteína A como biomarcadores.
Iavarone et al., 2014	Saliva	Propoe saliva como boa matriz na busca por biomarcadores e confirma uma alteracao da via imune dos glóbulos brancos periféricos associada à esquizofrenia
de Witte et al., 2014	Soro	Modulação de citocinas pró e anti-inflamatórias após tratamento antipsicótico.
Martins-de-Souza et al., 2015	Plasma	Pacientes respondedores e nao respondedores apresentaram alteracoes nas mesmas vias bioquímicas, porem, foram reguladas em diferentes direções.

Fonte: Adaptada e atualizada de Nascimento e Martins-de-Souza, 2015.

O líquido tem sido investigado em estudos proteômicos em pacientes com esquizofrenia devido à sua proximidade com o cérebro e à periferia (Albertini et al., 2012; Huang et al., 2006; Huang et al., 2007; Maccarrone et al., 2013; Martins-De-Souza et al., 2010a; Zougman et al., 2008). Maccarrone e colaboradores (2013) propuseram uma lista de candidatos a biomarcadores que inclui proteínas relacionadas a crescimento neuronal, proliferação e diferenciação celular, neurotransmissão, e estresse oxidativo. Além disso, a expressão diferencial de proteínas como apolipoproteína A1, apolipoproteína E e prostaglandina D2 foi observada no líquido de pacientes com esquizofrenia, confirmando a hipótese de alterações nos níveis de colesterol e metabolismo de fosfolípidios na doença (Huang et al., 2008; Martins-De-Souza et al. 2010d). Além disso, os níveis alterados de MBP (proteína básica de mielina) e MOG (glicoproteína de mielina de oligodendrócitos) foram detectados no líquido de pacientes com esquizofrenia (Martins-De-Souza et al., 2010a), apoiando a importância dos oligodendrócitos na doença (Haroutunian et al., 2014; Nave e Ehrenreich 2014). Porém, as concentrações normais de proteínas no líquido correspondem a aproximadamente 0,5% de suas concentrações no soro ou plasma, exigindo técnicas analíticas altamente sensíveis. Além disso, a acessibilidade da matriz é moderadamente invasiva, tornando difícil a realização de estudos longitudinais. Os estudos já realizados descreveram principalmente alterações nos níveis de proteínas envolvidas com transporte de colesterol e metabolismo fosfolipídico (Davalieva et al., 2016).

A principal vantagem do uso de sangue para a descoberta de biomarcadores é que, com a exceção da urina, que geralmente não contém proteína, o sangue é o fluido corporal que pode ser coletado de forma mais fácil e menos invasiva para estudos clínicos. Essa acessibilidade permite múltiplas amostragens em diferentes estágios da doença e do tratamento. Além disso, o sangue interage com todos os tecidos e, portanto, pode indicar mudanças em diferentes partes do organismo (Prabakaran et al., 2007; Pickard, 2015; Lai et al., 2016; Guest et al., 2016; Goff et al., 2016; Sabherwal et al., 2016).

Os estudos de proteômica no sangue têm sido focados no soro e no plasma. Os dois primeiros estudos publicados nesse campo revelaram níveis alterados de proteínas de resposta de fase aguda (Yang et al., 2006; Wan et al., 2007), sugerindo uma associação entre os sistemas de resposta inflamatória e a fisiopatologia da

esquizofrenia. Estudos posteriores descreveram proteínas mais significativamente alteradas pertencentes à família das apolipoproteínas, envolvidas no metabolismo de lipoproteínas de alta densidade e lipoproteínas ricas em triglicerídeos, e na via reversa de transporte de colesterol. Além disso, foram encontradas proteínas envolvidas na resposta imune e resistência à insulina (Levin et al., 2010; Jaros et al., 2012; Li et al., 2012).

A maioria dos estudos com plasma e soro não empregaram técnicas de descobertas, mas imunoensaios multiplexados contendo subconjuntos selecionados de biomarcadores, construídos com base nos achados de estudos prévios. Esses estudos descreveram o aumento de peptídeos relacionados com insulina em indivíduos em primeiro surto de esquizofrenia e não tratados, sugerindo que a desregulação das vias metabólicas da glicose podem estar relacionadas ao desenvolvimento da esquizofrenia (Guest et al., 2010, 2011; Schwarz et al., 2012c). Alterações da resposta imune (Schwarz et al., 2012b, c) e níveis alterados de hormônios (prolactina, cortisol, progesterona e hormônio do crescimento) (Domenici et al., 2010; Guest et al., 2011) em pacientes com esquizofrenia quando comparados a controles também já foram descritos.

A grande variedade de vias envolvidas e, conseqüentemente, de proteínas, associadas à complexidade da esquizofrenia reforça a necessidade de identificação e validação de biomarcadores. A análise proteômica comparativa de matrizes periféricas é de maior interesse clínico, pois pode revelar biomarcadores para diagnóstico, escolha de terapia e prognóstico da esquizofrenia.

2 OBJETIVOS

- Comparar o perfil proteico de pacientes em primeiro episódio psicótico *drug-naïve* de esquizofrenia e controles saudáveis.
- Investigar um grupo controle composto por pacientes psiquiátricos com transtornos do humor para verificar a especificidade dos achados para a esquizofrenia.

3 JUSTIFICATIVA

É sabido que quanto antes se identificar, diagnosticar e começar a tratar pacientes em quadros psicóticos, melhor o prognóstico clínico do paciente (Larsen et al., 2011). Alguns trabalhos com pacientes com esquizofrenia e primeiro episódio psicótico já demonstraram diferenças nos níveis de cortisol (Walker et al., 2013), marcadores de resposta metabólica (Schwarz et al., 2012a) e marcadores de resposta imune (Levin et al., 2010) corroborando com evidências de que o sangue pode ser uma boa fonte para a procura de biomarcadores (Bahn et al., 2011).

As plaquetas vêm sendo amplamente utilizadas como modelo para estudar na periferia alterações que ocorrem no sistema nervoso central. Foram descritas e comprovadas algumas similaridades entre plaquetas e neurônios que têm permitido o uso das plaquetas como modelo periférico da evolução de processos bioquímicos que ocorrem no sistema nervoso central relacionados com doenças neuropsiquiátricas. É importante ressaltar a facilidade e conveniência na obtenção das plaquetas, o que também são características importantes para um candidato a matriz biológica de biomarcador (Padovani et al., 2001). Apesar disso, ainda não tivemos acesso a qualquer relato de proteômica das plaquetas de pacientes com esquizofrenia ou transtornos afetivos.

Uma abordagem proteômica pode auxiliar no entendimento dos mecanismos moleculares, vias de sinalização e interações proteína-proteína envolvidos na manifestação de determinado transtorno.

4 DESENHO

Estudo transversal de pacientes em primeiro episódio psicótico e sem medicação prévia.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Casuística

Foram recrutados 28 pacientes com esquizofrenia e 27 pacientes com transtornos do humor em fase aguda de primeiro episódio psicótico no ambulatório do Grupo de Psicoses do LIM-27 do Instituto de Psiquiatria – FMUSP. Para o grupo controle foram recrutados 30 indivíduos sem histórico pessoal de doenças neuropsiquiátricas, atendendo ao balanceamento das variáveis sócio-demográficas com relação ao grupo de pacientes.

Os critérios de inclusão adotados foram: idade entre 18 e 55 anos; diagnóstico de Esquizofrenia ou Transtorno Esquizofreniforme (DSM-IV – APA, 1994); ausência de história atual ou nos últimos 6 meses de dependência de álcool e/ou drogas psicoativas (DSM-IV); e ausência de história prévia ou atual de hidrocefalia, epilepsia, traumatismo crânio-encefálico, doenças neurológicas degenerativas ou uso prolongado de corticosteróides. Todos os participantes dessa pesquisa assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

A confirmação do diagnóstico foi realizada por meio da SCID – I/ P – Entrevista Clínica Estruturada para Transtornos do Eixo I do DSM – IV, versão 2.0 (First et al, 2002).

A psicopatologia foi avaliada por meio da Escala de Sintomas Positivos e Negativos – PANSS (Kay et al., 1987): subescalas positiva (7 itens), negativa (7 itens) e de psicopatologia geral (16 itens), com escores de 1 a 7.

Entre os indivíduos recrutados não houve diferença nas médias de idade entre os grupos. Porém pudemos observar menor média de escolaridade no grupo de pacientes com esquizofrenia e maior frequência de mulheres no grupo com transtorno bipolar (Tabela 2).

Tabela 2. Dados demográficos dos indivíduos recrutados.

Diagnóstico	SCZ (n=28)	TB (n=27)	Controle (n=30)	p
Gênero (M/F)	17/11	5/22	16/14	0,03
Idade (média ± dp)	26,0 ± 7,4	28,9 ± 5,6	26,2 ± 3,9	0,12
Escolaridade em anos (média ± dp)	10,8 ± 3,5	13,7 ± 2,1	14,7 ± 2,3	0,01
Tempo de doença em dias (média ± dp)	50,7 ± 52,6	52,92 ± 69,6	-	
PANSS				
<i>Total (média ± dp)</i>	78 ± 22	-	-	
<i>Sintomas positivos (média ± dp)</i>	19 ± 5	-	-	
<i>Sintomas negativos (média ± dp)</i>	18 ± 8	-	-	
<i>Geral (média ± dp)</i>	40 ± 11	-	-	
HAM-D (média ± dp)	-	15 ± 8	-	
YMRS (média ± dp)	-	9 ± 8	-	

Legenda: M=masculino; F=feminino; dp= desvio padrão; SCZ= Esquizofrenia; TB= Transtorno bipolar, PANSS = Escala de sintomas positivos e negativos; HAM-D = Escala Hamilton para avaliação de depressão; YMRS = Escala Young para avaliação de mania; p = significância do teste estatístico ANOVA para idade e escolaridade e teste Chi-quadrado para gênero.

5.2 Separação e lavagem das plaquetas

Foram coletados 40 mL de sangue em quatro tubos com capacidade de 10 mL, contendo anticoagulante citrato de sódio 0,106 mol/L. Adicionou-se em cada tubo 1 mL de ACD-NH. Os tubos foram homogeneizados delicadamente por inversão e centrifugados durante 15 minutos a 1600 rpm a 20 °C. A seguir, os sobrenadante (plasma rico em plaquetas - PRP) foi transferido para outro tubo com capacidade de 50 mL (tipo falcon) e o pH ajustado para 6,5 com ACD-NH. O PRP foi transferido para 4 tubos de poliestireno (4 a 5 mL/tubo) e centrifugado durante 10 minutos a 2400 rpm à 20 °C. O sobrenadante foi removido cuidadosamente por inversão, e adicionado ao pellet 2,5 mL de solução de lavagem.

Após descanso de 10 minutos, as plaquetas foram homogeneizadas até total diluição e então adicionou-se mais 2,5 mL de solução de lavagem. A mistura foi centrifugada por 8 minutos a 2400 rpm, o sobrenadante removido cuidadosamente, e o pellet ressuspendido com 0,5 mL de tris-sacarose, homogeneizando com a pipeta. As plaquetas em tris-sacarose foram armazenadas em 4 criotubos com 0,5 mL e mantidas em freezer -70 °C até o momento do experimento.

5.3 Preparo de amostra com precipitação das proteínas

A 250 µL de amostra de plaquetas isoladas em tampão Tris-Sacarose foram adicionados 10% de coquetel de inibidor de protease (v/v) e 250 µL de tampão de lise celular contendo uréia 7 M, tiouréia 2 M, CHAPS 4% (m/v), DTT 40 mM. Após homogeneização, foram adicionados 1,5 mL de acetona gelada. A amostra foi mantida em freezer -20°C *over night* (14-16 horas). No dia seguinte a amostra foi centrifugada por 30 minutos a 14000 rpm para completa precipitação das proteínas. Descartou-se o sobrenadante e, após total evaporação da acetona, o *pellet* de proteínas foi reconstituído. Para sua utilização em eletroforese bidimensional a reconstituição foi feita com 50 uL do reagente DeStreak (GE lifesciences). Já para a análise por *shotgun label-free*, a amostra foi reconstituída com 50 uL de uréia 8 M em água ultrapura. A quantificação de proteínas foi feita de acordo com o método descrito por Bradford (1976), baseado em uma curva padrão de albumina de soro bovino (BSA) (0,05 – 0,5 mg/mL).

5.4 Eletroforese bidimensional

Para eletroforese bidimensional foram selecionados 11 pacientes com esquizofrenia, 8 pacientes com transtorno bipolar e 16 controles saudáveis a partir da coorte total, baseado na disponibilidade de material biológico e quantidade de proteína total.

A eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2D-PAGE) foi utilizada para a separação das proteínas da amostra. Na primeira etapa as proteínas foram separadas por ponto isoelétrico (pI), na segunda por massa molecular em SDS-PAGE. Cada ponto do gel é chamado de *spot* e representa, na teoria, uma proteína diferente (O'Farrell, 1975) (Figura 1). Foram analisadas as densitometrias dos *spots*, permitindo uma quantificação relativa. Os *spots* considerados significativamente diferentes foram recortados para identificação e quantificação por espectrômetro de massas.

Figura 1. Esquema representativo das etapas de separação de proteínas pela técnica de eletroforese bidimensional (2D).

A focalização isoeletrica (primeira dimensão) foi conduzida em tiras de poliacrilamida desidratadas de 7 cm com gradiente imobilizado de pH 4 - 7 linear (IPG - *Immobilized pH Gradient*, GE lifescience). As tiras IPG foram reidratadas em um suporte (*strip holder*) de tamanho correspondente a elas. A solução (amostra + tampão) foi aplicada no suporte e a tira colocada com a face contendo o gel para baixo. Sobre estas, 2 mL de óleo mineral (*dry strip cover fluid*, Amersham GE Healthcare, USA) foram aplicados a fim de evitar a cristalização da uréia. A reidratação seguiu a uma temperatura constante de 20 °C durante 12 horas. Imediatamente a seguir, foi iniciada a focalização isoeletrica que foi realizada no equipamento Ettan IGPhor3 (GE lifesciences) de acordo com o seguinte gradiente: 150 V por 15 minutos, 105 minutos até a voltagem atingir 4000 V, em seguida acumulam-se 15813 Vh e ao final do processo acumulam-se 20 kVh. Ao final da focalização as tiras foram conservadas à temperatura de -70 °C antes de iniciar a segunda dimensão da eletroforese.

As tiras de poliacrilamida foram tratadas para redução das pontes dissulfeto durante 15 minutos com uma solução contendo Tris-HCl pH 8.8 50 mM, ureia 6 M, glicerol 30% (v/v), SDS 2% (m/v) e DTT 2% (m/v). Após este tratamento as tiras foram transferidas para uma segunda solução durante 15 minutos. Esta solução continha os mesmos componentes da primeira solução, substituindo-se o DTT 2% por iodoacetamida 2,5% para alquilar as proteínas e prevenir sua reoxidação durante a eletroforese.

A segunda dimensão da eletroforese foi realizada em um gel de poliacrilamida 10%. A corrida foi realizada por 2h30min a 10 mA/gel. Após a corrida as proteínas foram fixadas no gel utilizando uma solução de ácido acético: metanol: água

ultrapura (1:4:5 v/v/v) por 30 minutos. Em seguida o gel foi corado com Coomassie G-250 (Candiano, 2004) *over night* (14-16h) e lavado com água ultrapura (4 vezes de 15 minutos). Os géis foram digitalizados e armazenados em ácido acético 4% a 4 °C para posterior análise. Segundo critério de análise de imagem de 2D-PAGE descrito, recortamos os *spots* selecionados e armazenamos em ácido acético para posterior digestão e identificação por espectrometria de massas.

O processo de padronização do protocolo esta descrito no APÊNDICE A.

5.5 Identificação dos *spots* por espectrômetro de massas

A remoção do corante dos *spots* selecionados, redução, alquilação e digestão dos mesmos pela ação de tripsina; com posterior eluição dos peptídeos purificados seguiu a metodologia clássica proposta por Shevchenko e colaboradores (2006). Ao final da eluição, os peptídeos secos sob *speedvac* foram então purificados em resina de C18 (ZipTip, Millipore) conforme recomendações do fabricante. Então, submetidos à espectrometria de massas de alta resolução com um nano comatógrafo *in line* (nanoLC-LTQ-Orbitrap Velos, Thermo Science) (Figura 2).

Figura 2. Representação esquemática das etapas subsequentes à separação das proteínas por eletroforese bidimensional (2D).

Apesar de bastante utilizada, a técnica de separação por 2D pode não ser eficiente na detecção de proteínas com peso molecular muito alto ou muito baixo, assim como ponto isoelétrico muito ácido ou muito básico. Além disso, proteínas pouco abundantes são dificilmente identificadas, porém os dados gerados são reprodutíveis e robustos, gerando assim uma boa confiabilidade no método.

5.6 Validação de proteínas de interesse

A partir da identificação e análise estatística das proteínas diferentemente expressas, foram selecionadas quatro proteínas para serem validadas em todas as amostras de indivíduos recrutados. Essa seleção foi realizada de acordo com achados descritos na literatura e função biológica de interesse já descrita. Para tanto, foi empregado o método de *western blotting* e anticorpos específicos das proteínas anexina A3 (ANXA3), glutathione S-transferase pi 1 (GSTP1), 78-kDa glucose-regulated protein (GRP78) e peroxirredoxina 6 (PRX6).

Para cada uma das proteínas foi feito um gel SDS-Page 12% de poliacrilamida, e as proteínas foram separadas de acordo com o peso molecular. Para cada amostra foram utilizados 25 µg de proteína (diluídas em tampão de amostra *Laemmli buffer*), em duplicata. Após isso, foi feita a transferência para membrana de nitrocelulose e a reação com o anticorpo específico de acordo com protocolo padronizado (Tabela 3). A β -actina foi utilizada como padrão de controle interno em todas as membranas.

Tabela 3. Protocolo de incubação para cada anticorpo utilizado considerando tempo e concentração.

PROTEÍNA	BLOQUEIO	INCUBAÇÃO	
		Anticorpo Primário	Anticorpo Secundário
ANXA3	12 horas, 5% leite	1 hora; 1:10000 (ab6276, Abcam)	1:20000 / 1 hora <i>Anti-Rabbit</i> IgG (GE Healthcare Life Sciences)
GSTP1	12 horas, 5% leite	1 hora; 0,25 ug/mL (MAB6455, R&D Systems)	1:3000 / 1 hora <i>Anti-Mouse</i> IgG (Sigma)
GRP78	12 horas, 5% leite	1 hora; 0,5 ug/mL (MAB4846, R&D Systems)	1:3000 / 1 hora <i>Anti-Mouse</i> IgG (Sigma)
PRX6	12 horas, 5% leite	1 hora; 0,25 ug/mL (MAB3490, R&D Systems)	1:3000 / 1 hora <i>Anti-Mouse</i> IgG (Sigma)
β-actina	-	1 hora; 1:10000 <i>Anti-Beta Actin</i> (Abcam)	1:2000 / 1 hora <i>Anti-Mouse</i> IgG (Sigma)

5.7 Shotgun label-free

A abordagem *shotgun* é, basicamente, a identificação de proteínas empregando uma combinação de cromatografia líquida de alta eficiência e espectrometria de massas (LC/MS): as proteínas presentes na mistura são digeridas e os peptídeos resultantes são separados por cromatografia líquida e identificados por espectrometria de massas, sem alvo específico (Vessecchi et al., 2011). Para essa etapa foram utilizadas as mesmas amostras utilizadas para eletroforese bidimensional: 11 pacientes com esquizofrenia, 8 pacientes com transtorno bipolar e 16 controles saudáveis.

Para tanto, foi empregado um equipamento LTQ-Orbitrap Velos ETD (Thermo) acoplado com Easy nanoLC II (Thermo). 1 µg de amostra contendo peptídeos foram separados em coluna C18RP em gradiente de 70 minutos. As condições cromatográficas foram checadas utilizando 50 fmol de padrão de BSA digerido com tripsina. O arraste de cada amostra foi removida entre corridas utilizando água e ácido fórmico 0,1% nas mesmas condições cromatográficas e de aquisição de dados; e cada amostra analisada em duplicata. A concentração de proteínas foi determinada sem a utilização de marcadores com isótopos estáveis (*label-free*) (Vessecchi et al., 2011).

As análises foram realizadas no Centro de Facilidades para a Pesquisa (CEFAP), unidade de Proteômica e espectrometria de massas (BIOMASS), da Universidade de São Paulo.

5.8 Análise dos dados e estatística

Para análise de diferenças de gênero foi utilizado o teste Chi-quadrado. A normalidade dos resíduos foi verificada com gráficos QQ. Para as variáveis que seguem uma distribuição normal, realizamos o teste de ANOVA, seguidos pelo teste *post hoc* de Tukey para correção de múltiplas comparações. O teste de Kruskal-Wallis foi realizado para as variáveis que não seguem distribuição normal, seguido do teste de Dunn-Bonferroni para correção de múltiplas comparações. As análises foram realizadas por meio dos softwares estatísticos SPSS v.14 (*Statistical Package for Social Science*, Chicago, IL).

Para seleção dos *spots* diferentemente expressos a análise estatística foi realizada na própria plataforma do *software* ImageMaster2D (GE lifesciences). Os arquivos .raw derivados da análise por espectrometria de massas, tanto referente aos *spots* quanto *shotgun*, foram processados utilizando a plataforma SEQUEST e os peptídeos e as proteínas foram identificados utilizando o banco de dados Uniprot-Swiss-prot (2015, taxonomia: Homo-sapiens). Foi considerada uma taxa de falsa descoberta (FDR) < 0,01; e um mínimo de 2 peptídeos únicos por proteína. Para quantificação foram utilizadas as áreas sob as curvas cromatográficas (revisado em Old, 2005).

Para normalização dos dados obtidos por *shotgun* foram testadas diferentes metodologias utilizando o *software* R versão 3.1.0. A análise estatística para identificar a expressão proteica diferencial entre grupos diagnósticos foi realizada por meio do *software* Perseus versão 1.6.0.2. A identificação dos componentes celulares, função molecular e processos biológicos foram determinados utilizando a plataforma *Gene Ontology* (<http://geneontology.org/>) e PANTHER versão 11 (Mi et al., 2017). A rede de interações entre as proteínas deste estudo foram obtidas pelo *software* STRING (<http://stringdb.org/>).

A significância estatística para todas as análises foi estabelecida para valores de $p < 0,05$ ($\alpha=95\%$).

6 RESULTADOS

A análise proteômica para descoberta de candidatos a biomarcadores consistiu de 5 principais etapas:

- Isolamento da proteína a partir de plaquetas como matriz
- Fracionamento e separação de uma mistura complexa de proteínas
- Análise das frações por espectrômetro de massas
- Uso de ferramentas de bioinformáticas e bancos de dados para processamento das informações obtidas
- Validação das proteínas encontradas e propostas como biomarcadores

6.1 Eletroforese bidimensional e análise por espectrometria de massas

Foram analisadas 16 amostras de controles saudáveis, 11 de pacientes com esquizofrenia e 8 de pacientes com transtornos do humor (controle psiquiátrico). Foram selecionados três géis de cada grupo para a análise das imagens. Para esta seleção levou-se em consideração a boa qualidade/resolução dos géis e número de *spots*/gel (Figura 3).

Figura 3. Géis selecionados para análise da imagem e seleção dos *spots* diferentemente expressos.

Legenda: A) géis de controles saudáveis; B) géis de pacientes com transtornos do humor; C) géis de pacientes com esquizofrenia.

Inicialmente identificamos os *spots* presentes na maioria dos géis de cada grupo diagnóstico. Foram identificados 110 *spots* nos géis de controles saudáveis (Apêndice B), 83 *spots* nos géis de pacientes com diagnóstico de esquizofrenia (Apêndice C) e 80 *spots* nos géis de pacientes com diagnóstico de transtornos do humor (Apêndice D).

Dentre os *spots* identificados 76 eram comuns aos três grupos diagnósticos; 5 eram comuns aos controles e pacientes com esquizofrenia; 2 aos controles e psicóticos com transtornos do humor; 2 apenas no grupo de psicóticos com transtornos do humor e 27 presentes apenas no grupo (Apêndice E, figura 4).

Figura 4. Diagrama de Venn com *spots* identificados em cada grupo diagnóstico com a metodologia de eletroforese bidimensional.

Em uma segunda etapa, recortamos os *spots* exclusivos do grupo controle (Figura 5). Os *spots* isolados foram identificados e quantificados por espectrometria de massas. Para cada *spot* pudemos identificar mais de uma proteína, todavia foram consideradas apenas as proteínas que apresentaram pelo menos 3 peptídeos identificados (Tabela 4).

Figura 5. Figura representativa dos *spots* exclusivos do grupo controle que foram selecionados, recortados e posteriormente analisados por espectrômetro de massas.

Tabela 4. Proteínas identificadas exclusivamente nas amostras de controles de acordo com o número de identificação do *spot* recortado dos géis resultantes da eletroforese bidimensional (continua).

Número do <i>spot</i>	Identificação no banco de dados	Nome da proteína	Número de peptídeos únicos	Número de peptídeos identificados	MW [kDa]	calc. pI
2	O75223	<i>Gamma-glutamylcyclotransferase</i>	4	4	21,0	5,14
2	Q9NP72	<i>Ras-related protein Rab-18</i>	4	4	23,0	5,24
4	A0A087X0I4	<i>Coatomer subunit epsilon</i>	3	3	34,5	5,20
4	B4E2V5	<i>cDNA FLJ52062, highly similar to Erythrocyte band 7 integral membrane protein</i>	4	4	25,9	7,39
4	D3DP13	<i>Fibrinogen beta chain, isoform CRA_e</i>	3	3	39,7	7,30
4	J3KTF8	<i>Rho GDP-dissociation inhibitor 1 (Fragment)</i>	4	4	21,6	5,49
4	K7EP07	<i>Tubulin-folding cofactor B (Fragment)</i>	3	3	19,3	5,34
4	O00299	<i>Chloride intracellular channel protein 1</i>	5	5	26,9	5,17
4,13	A8K2W3	<i>cDNA FLJ78516</i>	3	3	47,1	5,25
4,7	P01834	<i>Ig kappa chain C region</i>	3	3	11,6	5,87
5	P20340	<i>Ras-related protein Rab-6A</i>	3	3	23,6	5,54
5	Q68DS3	<i>Putative uncharacterized protein DKFZp686H17246 (Fragment)</i>	3	3	14,7	5,25
6	H3BMH2	<i>Ras-related protein Rab-11A (Fragment)</i>	3	3	17,7	8,34
6	P09211	<i>Glutathione S-transferase P</i>	6	7	23,3	5,64
6	P51149	<i>Ras-related protein Rab-7a</i>	7	7	23,5	6,70
7	G3V3I1	<i>Proteasome subunit alpha type</i>	3	3	16,6	8,63
7	P00492	<i>Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase</i>	4	4	24,6	6,68
7	P30041	<i>Peroxiredoxin-6</i>	6	6	25,0	6,38
7	Q14696	<i>LDLR chaperone MESD</i>	3	3	26,1	7,78
7	Q15365	<i>Poly(rC)-binding protein 1</i>	4	4	37,5	7,09

Legenda: MW=molecular weight (peso molecular); calc.pI=pI teórico.

Tabela 4. Proteínas identificadas exclusivamente nas amostras de controles de acordo com o número de identificação do *spot* recortado dos géis resultantes da eletroforese bidimensional (continuação).

Número do <i>spot</i>	Identificação no banco de dados	Nome da proteína	Número de peptídeos únicos	Número de peptídeos identificados	MW [kDa]	calc. pI
7,8	P60174-1	<i>Isoform 2 of Triosephosphate isomerase</i>	3	3	26,7	6,90
8,1	V9HVZ7	<i>Epididymis luminal protein 176</i>	3	3	25,0	5,66
8,12	A8MX94	<i>Glutathione S-transferase P</i>	5	5	19,5	5,97
8,9	B1AK87	<i>Capping protein (Actin filament) muscle Z-line, beta, isoform CRA_a</i>	4	4	29,3	6,92
9	P0DMM9	<i>Sulfotransferase 1A3</i>	3	3	34,2	6,01
9	P12429	<i>Annexin A3</i>	5	5	36,4	5,92
9	P31937	<i>3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase, mitochondrial</i>	4	4	35,3	8,13
9	Q5FWF9	<i>IGL @ protein</i>	4	4	24,8	5,59
9	Q5TA02	<i>Glutathione S-transferase omega-1 (Fragment)</i>	4	4	23,3	7,21
9	Q9H0P0-3	<i>Isoform 4 of Cytosolic 5'-nucleotidase 3A OS=Homo sapiens</i>	5	5	32,5	5,72
9	X6RJS7	<i>Lys-63-specific deubiquitinase BRCC36 (Fragment)</i>	5	5	25,7	6,39
10	A8K0T9	<i>cDNA FLJ75422, highly similar to Homo sapiens capping protein (actin filament) muscle Z-line, alpha 1, mRNA</i>	3	4	32,9	5,69
10	J9ZVQ3	<i>Apolipoprotein E (Fragment)</i>	3	3	26,8	8,12
10	P62136	<i>Serine/threonine-protein phosphatase PP1-alpha catalytic subunit</i>	4	5	37,5	6,33
10,11	P11177-2	<i>Isoform 2 of Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial</i>	4	4	37,2	5,90
10,11	P47755	<i>F-actin-capping protein subunit alpha-2</i>	5	6	32,9	5,85

Legenda: MW=molecular weight (peso molecular); calc.pI=pI teórico.

Tabela 4. Proteínas identificadas exclusivamente nas amostras de controles de acordo com o número de identificação do *spot* recortado dos géis resultantes da eletroforese bidimensional (continuação).

Número do <i>spot</i>	Identificação no banco de dados	Nome da proteína	Número de peptídeos únicos	Número de peptídeos identificados	MW [kDa]	calc. pI
10,15	F5H1C6	<i>Fermitin family homolog 3 (Fragment)</i>	4	4	33,1	7,87
10,15	P07195	<i>L-lactate dehydrogenase B chain</i>	4	4	36,6	6,05
11	Q9HAV0	<i>Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-4</i>	3	4	37,5	6,00
12	B4DWC4	<i>cDNA FLJ61180, highly similar to Chloride intracellular channel protein 4</i>	3	3	27,8	6,38
12	P02647	<i>Apolipoprotein A-I</i>	4	4	30,8	5,76
13	A0A024RC87	<i>Ribonuclease/angiogenin inhibitor 1, isoform CRA</i>	4	4	49,4	4,84
13	B0AZV0	<i>cDNA, FLJ79540, highly similar to Serine-threonine kinase receptor-associated protein</i>	6	6	28,5	4,91
13	B4DN58	<i>cDNA FLJ53765, highly similar to Tubulin alpha chain</i>	3	3	20,0	4,48
13	B4DWH0	<i>cDNA FLJ55670, highly similar to EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1</i>	3	3	32,6	6,38
13	P01024	<i>Complement C3</i>	4	4	187,0	6,40
13	P10644	<i>cAMP-dependent protein kinase type I-alpha regulatory subunit</i>	4	4	43,0	5,35
13	Q75MP1	<i>Putative uncharacterized protein PRKAR2B (Fragment)</i>	3	3	34,1	4,86
13,14	B7Z7R8	<i>cDNA FLJ55622, highly similar to Multimerin-1</i>	4	4	110,7	7,02
14	A8K5I6	<i>cDNA FLJ78643, highly similar to Homo sapiens cornulin (CRNN), mRNA</i>	3	3	53,5	6,10

Legenda: MW=molecular weight (peso molecular); calc.pI=pI teórico.

Tabela 4. Proteínas identificadas exclusivamente nas amostras de controles de acordo com o número de identificação do *spot* recortado dos géis resultantes da eletroforese bidimensional (continuação).

Número do <i>spot</i>	Identificação no banco de dados	Nome da proteína	Número de peptídeos únicos	Número de peptídeos identificados	MW [kDa]	calc. pI
14	B3KX51	<i>cDNA FLJ44754 fis, clone BRACE3030748, highly similar to Guanine nucleotide-binding protein G(i), alpha-2 subunit</i>	3	3	34,9	5,38
14	H7C3I1	<i>Hsc70-interacting protein (Fragment)</i>	3	3	16,3	4,88
14	M0R0Y2	<i>Alpha-soluble NSF attachment protein</i>	6	6	29,1	5,16
14	P55735-2	<i>Isoform 2 of Protein SEC13 homolog</i>	3	3	34,0	5,72
14	Q5T0H7	<i>Gelsolin</i>	3	3	20,8	4,84
16	A0A024R609	<i>Pyruvate kinase</i>	6	6	37,5	6,39
16	B4DI57	<i>cDNA FLJ54111, highly similar to Serotransferrin</i>	3	3	63,4	7,21
16	B4E3A8	<i>cDNA FLJ53963, highly similar to Leukocyte elastase inhibitor</i>	4	4	38,7	6,67
16	P02679-2	<i>Isoform Gamma-A of Fibrinogen gamma chain</i>	3	3	49,5	6,09
16	Q8N532	<i>TUBA1C protein</i>	3	3	36,6	7,96
16	Q9Y570	<i>Protein phosphatase methylesterase 1</i>	5	5	42,3	5,97
16,17	B3KML9	<i>cDNA FLJ11352 fis, clone HEMBA1000020, highly similar to Tubulin beta-2C chain</i>	3	4	44,6	4,93
16,17	Q7Z503	<i>Succinyl-CoA ligase subunit beta</i>	3	3	43,6	5,58
17	L8B934	<i>MHC class I antigen (Fragment)</i>	3	3	40,6	6,47
17	Q8TES4	<i>FLJ00119 protein (Fragment)</i>	11	11	153,5	5,78
18	B4DT77	<i>Annexin</i>	3	3	37,8	7,18
18	P35998	<i>26S protease regulatory subunit 7</i>	7	7	48,6	5,95
18	P50395-2	<i>Isoform 2 of Rab GDP dissociation inhibitor beta</i>	5	5	45,6	6,24

Legenda: MW=molecular weight (peso molecular); calc.pI=pl teórico.

Tabela 4. Proteínas identificadas exclusivamente nas amostras de controles de acordo com o número de identificação do *spot* recortado dos géis resultantes da eletroforese bidimensional (continuação).

Número do <i>spot</i>	Identificação no banco de dados	Nome da proteína	Número de peptídeos únicos	Número de peptídeos identificados	MW [kDa]	calc. pI
18	Q6P164	<i>Kinesin-like protein (Fragment)</i>	4	4	38,7	7,09
18	Q9UQ80-2	<i>Isoform 2 of Proliferation-associated protein 2G4</i>	3	3	38,0	7,53
19	B4DZS8	<i>Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (Fragment)</i>	3	3	97,6	6,04
19	B4E335	<i>cDNA FLJ52842, highly similar to Actin, cytoplasmic 1</i>	6	6	39,2	5,59
19	B7Z2X4	<i>cDNA FLJ53327, highly similar to Gelsolin</i>	3	3	77,7	5,69
19	B7Z597	<i>cDNA FLJ54373, highly similar to 60 kDa heat shock protein, mitochondrial</i>	3	3	60,0	5,74
19	H3BQ34	<i>Pyruvate kinase</i>	4	4	30,7	6,95
19	P31150	<i>Rab GDP dissociation inhibitor alpha</i>	6	6	50,6	5,14
19	P48643-2	<i>Isoform 2 of T-complex protein 1 subunit epsilon</i>	7	7	49,5	6,19
19	P49588	<i>Alanine--tRNA ligase, cytoplasmic</i>	3	3	106,7	5,53
19	Q16555-2	<i>Isoform 2 of Dihydropyrimidinase-related protein 2</i>	3	3	58,1	6,15
19	Q6XQN6-3	<i>Isoform 3 of Nicotinate phosphoribosyltransferase</i>	4	4	56,1	5,67
19	Q7Z759	<i>CCT8 protein</i>	11	11	54,1	5,31
19	Q96IE3	<i>Similar to plectin 1, intermediate filament binding protein, 500kD (Fragment)</i>	3	3	113,7	5,55
19,2	Q5D862	<i>Filaggrin-2</i>	3	3	247,9	8,31
20	A8K9P0	<i>cDNA FLJ78413, highly similar to Homo sapiens albumin, mRNA</i>	10	10	69,2	6,28
20	B7Z5H9	<i>cDNA FLJ53291, highly similar to Beta-galactosidase-related protein</i>	3	3	60,5	6,99
20	P68363-2	<i>Isoform 2 of Tubulin alpha-1B chain</i>	3	3	37,2	4,98
20	Q02153-2	<i>Isoform HSGC-2 of Guanylate cyclase soluble subunit beta-1</i>	5	5	66,7	5,19

Legenda: MW=molecular weight (peso molecular); calc.pI=pl teórico.

Tabela 4. Proteínas identificadas exclusivamente nas amostras de controles de acordo com o número de identificação do *spot* recortado dos géis resultantes da eletroforese bidimensional (continuação).

Número do <i>spot</i>	Identificação no banco de dados	Nome da proteína	Número de peptídeos únicos	Número de peptídeos identificados	MW [kDa]	calc. pI
20,23	P08107	<i>Heat shock 70 kDa protein 1A/1B</i>	4	9	70,0	5,66
21	B4DFN9	<i>cDNA FLJ54303, highly similar to Heat shock 70 kDa protein 1</i>	3	3	62,4	5,69
21,22	B4DJ81	<i>NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mitochondrial</i>	3	3	66,9	5,38
22	B7Z2V6	<i>cDNA FLJ53889, highly similar to Vacuolar ATP synthase catalytic subunit A, ubiquitous isoform (EC 3.6.3.14)</i>	3	3	37,7	5,41
23	B4DTD5	<i>cDNA FLJ57890, highly similar to Filamin-A</i>	5	5	71,8	5,82
23	C9JV37	<i>Thrombin light chain (Fragment)</i>	3	3	35,9	4,82
23	E5RK69	<i>Annexin</i>	3	3	51,7	6,05
23	P02790	<i>Hemopexin</i>	3	3	51,6	7,02
23,24	B4DRH6	<i>cDNA FLJ54509, highly similar to Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial</i>	3	3	78,3	8,92
24	A1A5C5	<i>RRBP1 protein</i>	3	3	84,3	5,01
24	E9PKE3	<i>Heat shock cognate 71 kDa protein</i>	4	6	68,8	5,52
24,25	B4DMA2	<i>cDNA FLJ54023, highly similar to Heat shock protein HSP 90-beta</i>	3	8	79,1	5,02
24,25	P04217	<i>Alpha-1B-glycoprotein</i>	3	3	54,2	5,86
24,27	P35579	<i>Myosin-9</i>	3	3	226,4	5,60
25	A0A087WVV2	<i>Ribosome-binding protein 1</i>	8	8	102,7	5,34
25	A8K6Z6	<i>cDNA FLJ78262, highly similar to Homo sapiens semenogelin II (SEMG2), mRNA</i>	4	4	65,6	9,07
25	B7Z565	<i>cDNA FLJ54739, highly similar to Alpha-actinin-1</i>	7	7	94,7	5,69

Legenda: MW=molecular weight (peso molecular); calc.pI=pI teórico.

Tabela 4. Proteínas identificadas exclusivamente nas amostras de controles de acordo com o número de identificação do *spot* recortado dos géis resultantes da eletroforese bidimensional (continuação).

Número do <i>spot</i>	Identificação no banco de dados	Nome da proteína	Número de peptídeos únicos	Número de peptídeos identificados	MW [kDa]	calc. pI
25	E9PIT3	<i>Thrombin light chain</i>	6	6	65,4	5,71
25	F5GXS0	<i>Complement C4-B</i>	5	5	187,6	7,33
25	G5E9F8	<i>Protein S (Alpha), isoform CRA_b</i>	3	3	60,3	5,87
25	P04279	<i>Semenogelin-1</i>	5	5	52,1	9,29
25	P13667	<i>Protein disulfide-isomerase A4</i>	6	6	72,9	5,07
25	Q2VPJ6	<i>HSP90AA1 protein (Fragment)</i>	3	6	68,3	5,19
25	Q8TE77	<i>Protein phosphatase Slingshot homolog 3</i>	3	3	73,0	5,30
25,26	P23229-4	<i>Isoform Alpha-6X2A of Integrin alpha-6</i>	5	5	119,0	7,27
26	B3KTA8	<i>cDNA FLJ37971 fis, clone CTONG2009958, highly similar to CERULOPLASMIN (EC 1.16.3.1)</i>	3	3	89,0	5,85
26	B4DLU2	<i>cDNA FLJ56496, highly similar to Integrin alpha-IIb</i>	3	3	56,4	5,31
26	P12814	<i>Alpha-actinin-1</i>	7	9	103,0	5,41
26	Q6ZNL4	<i>FLJ00279 protein (Fragment)</i>	3	3	65,7	8,85
26,27	O43707	<i>Alpha-actinin-4</i>	7	9	104,8	5,44
26,27	P55072	<i>Transitional endoplasmic reticulum ATPase</i>	21	21	89,3	5,26
27	A6NEC2	<i>Puromycin-sensitive aminopeptidase-like protein</i>	3	3	53,7	5,34
27	E9PLF4	<i>Heat shock cognate 71 kDa protein (Fragment)</i>	5	5	20,4	7,33
27	P12814-2	<i>Isoform 2 of Alpha-actinin-1</i>	8	10	102,6	5,50
8,9,10,11,12	A0PJG0	<i>THBS1 protein (Fragment)</i>	4	4	43,9	5,94
1,2,4,8,10,11,12,14,25,27	A0A087WWY3	<i>Filamin-A</i>	3	3	245,7	5,97

Legenda: MW=molecular weight (peso molecular); calc.pI=pI teórico.

Tabela 4. Proteínas identificadas exclusivamente nas amostras de controles de acordo com o número de identificação do *spot* recortado dos géis resultantes da eletroforese bidimensional (conclusão).

Número do <i>spot</i>	Identificação no banco de dados	Nome da proteína	Número de peptídeos únicos	Número de peptídeos identificados	MW [kDa]	calc. pI
10,11,15	F2Z393	<i>Transaldolase</i>	3	3	35,3	8,97
19,23,26,27	P18206-2	<i>Isoform 1 of Vinculin</i>	10	10	116,6	6,09
2,15,16,22	B4E3Q9	<i>cDNA FLJ59659, highly similar to Vinculin</i>	3	3	100,9	5,48
2,4,7-20,22-27	Q9Y490	<i>Talin-1</i>	5	5	269,6	6,07
20,21,23	P38606-2	<i>Isoform 2 of V-type proton ATPase catalytic subunit A</i>	9	9	64,7	5,66
20-23	B7Z4V2	<i>cDNA FLJ51907, highly similar to Stress-70 protein, mitochondrial</i>	6	6	72,4	5,94
20-23	P11142	<i>Heat shock cognate 71 kDa protein</i>	3	23	70,9	5,52
21,22,24	P00734	<i>Prothrombin</i>	5	5	70,0	5,90
21-25	P11021	<i>78 kDa glucose-regulated protein</i>	3	4	72,3	5,16
24-27	B4DTY9	<i>Integrin beta</i>	4	4	83,5	5,06
25-26	Q59FC6	<i>Tumor rejection antigen (Gp96) 1 variant (Fragment)</i>	6	7	65,9	5,19
4,5,24	B4DHz6	<i>Transferrin, isoform CRA_c</i>	3	3	47,4	7,05
4,9,12,13,16, 17,18,20,21,22, 24,25,26,27	B4DVQ0	<i>cDNA FLJ58286, highly similar to Actin, cytoplasmic 2</i>	3	3	37,3	5,71
1,2,4,5,8,9,10, 11,12,14,15,16, 18,19,25,26,27	Q5HY54	<i>Filamin-A</i>	4	4	276,4	6,05
6,9,11,25	B4E1B2	<i>cDNA FLJ53691, highly similar to Serotransferrin</i>	4	4	74,8	7,12
7, 24 e 26	A0A024R9Q1	<i>Thrombospondin 1, isoform CRA</i>	6	6	129,3	4,94
9,11,12,14,15,1 6,17,25,26,27	Q9H4B7	<i>Tubulin beta-1 chain</i>	3	4	50,3	5,17

Legenda: MW=molecular weight (peso molecular); calc.pI=pl teórico.

A partir desta identificação, utilizamos a plataforma String-db para tentar estabelecer interações proteína-proteína, criando redes e vias que podem estar presentes ou ativas em plaquetas apenas de controles saudáveis. Com este software, pudemos identificar proteínas já descritas relacionadas com: neurotransmissão e sinapse, neurodesenvolvimento, homeostase celular, sinalização de cálcio, apoptose, resposta imune, e estresse oxidativo (Figura 6).

Figura 6. Rede formada a partir das proteínas identificadas em *spots* retirados dos géis de controles saudáveis.

Legenda: As linhas representam a interação das proteínas listadas na tabela 4. Quanto mais densa a linha, maior a evidência já encontrada relativa a esta interação proteína-proteína. Fonte: Stringdb.com

6.2 Validação de proteínas de interesse

6.2.1 Metabolismo de membrana

Entre as proteínas ainda não descritas ou relacionadas na literatura neuropsiquiátrica, a supressão da expressão ANXA3 em pacientes em primeiro episódio psicótico despertou especial interesse. Utilizando a técnica de *western blotting*, observamos uma diferença dos níveis da ANXA3 nos três grupos ($p < 0,001$), estando menores nos pacientes com esquizofrenia quando comparados a controles ($p = 0,001$) ou pacientes com transtorno bipolar ($p < 0,001$) não havendo diferença na comparação entre pacientes com transtorno bipolar e controles saudáveis ($p = 0,991$) (Figura 7).

Figura 7. Expressão proteica da anexina A3 em plaquetas de acordo com os grupos diagnósticos.

Legenda: SCZ = esquizofrenia; TB = transtorno bipolar.

6.2.2 Estresse oxidativo

Foram identificadas proteínas relacionadas ao estresse oxidativo (destacadas na Figura 8): HSP90AA1, HSP90AB1, HSP90B1, HSPA5, HSPA8, HSPA9, HSPD1, GGCT, GSTO1, GSTP1 e PRDX6, entre outras.

Figura 8. Rede formada a partir das proteínas identificadas em *spots* retirados dos géis de controles saudáveis.

Legenda: Em destaque (vermelho) proteínas relacionadas a resposta ao estresse. As linhas representam a interação das proteínas indicadas. Quanto mais densa a linha, maior a evidência já encontrada relativa a esta interação. Fonte: Stringdb.com

Entre elas, conseguimos validar nossos achados referentes a PRX6 (Figura 9), observando uma diminuição nos pacientes com relação aos controles ($p=0,049$) considerando os três grupos diagnósticos. Quando agregamos todos os pacientes em um grupo de psicoses e comparamos ao grupo controle, a diferença fica mais clara ($p=0,028$).

Figura 9. Expressão proteica da PRX6 (peroxirredoxina 6) em plaquetas de acordo com os grupos diagnósticos.

Com relação à GSTP1 (Figura 10) e à GRP78 (Figura 11), apesar de verificarmos a presença nas plaquetas, não houve diferença dos níveis quando comparados os diagnósticos ($p = 0,913$ e $p = 0,709$; respectivamente).

Figura 10. Expressão proteica da GSTP1 (glutathione s-transferase Pi 1) em plaquetas de acordo com os grupos diagnósticos.

Figura 11. Expressão proteica da GRP78 (*glucose-regulated protein*) em plaquetas de acordo com os grupos diagnósticos.

Legenda: SCZ = esquizofrenia; TB = transtorno bipolar.

6.3 Shotgun

Com esta abordagem analisamos as 16 amostras de controles saudáveis, 11 amostras de pacientes com esquizofrenia e 8 pacientes com transtornos do humor (controle psiquiátrico). Para a análise foram excluídas as proteínas que não foram identificadas por shotgun na maioria (50% + 1) dos pacientes de cada grupo e/ou tiveram menos de 3 peptídeos únicos identificados.

Figura 12. Diagrama de Venn com proteínas identificadas em cada grupo diagnóstico com a metodologia de *shotgun*.

Em seguida, a área dos picos obtidos no espectro de massas de cada peptídeo, gerado a partir da digestão com tripsina, foi utilizada para inferir a quantidade de proteína em cada amostra. Para determinar as proteínas diferentemente expressas entre os grupos, foi necessário testar a normalidade de distribuição da nossa amostra (Figura 13).

Figura 13. Distribuição das proteínas identificadas antes da normalização.

Para normalização testamos diferentes abordagens (revisado em Välikangas et al., 2016):

- ii) corrigimos o valor de cada proteína da amostra pela soma de todas as proteínas da mesma amostra
- iii) utilizamos a normalização baseada na estabilização de variância (do inglês *Variance stabilization normalization*, *Vsn*)

i) calculamos a razão do log2 e foram consideradas as proteínas com fold-change maior ou igual a 2.

Considerando os coeficientes de variação (CVs) observados para cada uma das proteínas encontradas (Tabela 6), optamos por utilizar os dados obtidos por meio da *Vsn* que ajustou melhor à nossa amostra e demonstrou ser a melhor metodologia para normalização dentre as testadas (Figura 14).

Tabela 5. Número de proteínas com coeficiente de variação (CV) de 20 %, 30 % e 50 % de acordo com método utilizado para normalização dos valores de quantificação.

Metodo de normalização	CV < 20 %	CV < 30 %	CV < 50%
<i>Sem normalização</i>	11	138	570
<i>Divisão pela soma</i>	214	368	633
<i>Vsn</i>	1006	-	-
<i>Log2</i>	963	-	-

Figura 14. Distribuição das proteínas identificadas após normalização pelo método de *Vsn*.

Uma das abordagens possíveis de interpretação desses dados é a associação destas proteínas à seus processos biológicos(Figura 16), funções moleculares (Figura 17) e localização celular (Figura 18). Para tanto utilizamos a plataforma PANTHER v.11 que nos mostrou as associações a seguir. Salientamos também, a que se referem as maiores porcentagens de cada uma das associações.

Figura 16. Análise dos processos biológicos relacionados às proteínas diferencialmente expressas utilizando o software PANTHER 7.0.

Fonte: Adaptado de Panther 7.0

Figura 17. Análise da função molecular das proteínas diferencialmente expressas utilizando o software PANTHER 7.0.

Fonte: Adaptado de Panther 7.0

Figura 18. Análise da localização celular das proteínas diferencialmente expressas utilizando o software PANTHER 7.0.

Fonte: Adaptado de Panther 7.0

7 DISCUSSÃO

O objetivo desse estudo foi estabelecer os perfis proteicos de pacientes com diagnóstico de esquizofrenia ou transtorno bipolar ainda no primeiro episódio psicótico e compará-los com o perfil de controles saudáveis, na busca por biomarcadores em plaquetas.

Há diversos estudos que tentaram esclarecer características bioquímicas da esquizofrenia. Diferentes matrizes, critérios diagnósticos, tempo de doença e tratamento, permitem diferentes achados, o que dificulta o estabelecimento e esclarecimento das vias realmente relevantes para o desenvolvimento da esquizofrenia. A abordagem proteômica em amostra de pacientes com diagnóstico de esquizofrenia, segundo a maioria dos trabalhos disponíveis na literatura, foi empregada para estudos do tecido cerebral (Oliveira et al., 2013). Porém, a dificuldade de acesso a essa matriz, tem levado a busca por matrizes periféricas como líquido, fibroblastos e, preferencialmente, soro ou plasma. Este é o primeiro estudo de proteômica de plaquetas em doenças neuropsiquiátricas. A proposta de utilizar plaquetas como modelo neurofarmacológico surgiu em meados de 1954 (Barradas e Mikhailidis, 1993) e desde então já foram descritas e comprovadas algumas similaridades entre plaquetas e neurônios que têm permitido o uso das plaquetas como modelo periférico do metabolismo cerebral.

Há relatos recorrentes relacionados principalmente a déficits sinápticos, anormalidades na formação da rede neural e alterações na neurotransmissão. Além disso, também é frequente a descrição de alterações relacionadas à resposta inflamatória, alterações em oligodendrócitos, disfunção mitocondrial e desequilíbrio de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Freedman, 2003; Martins-de-Souza et al., 2009). Algumas das proteínas que encontramos diferentemente expressas corroboram alguns achados de estudos proteômicos em cérebro de pacientes, validando as plaquetas como uma boa matriz para estudar na periferia o que ocorre no SNC.

Em nosso estudo encontramos alterações na expressão de proteínas relacionadas ao estresse oxidativo. O estresse oxidativo proveniente das mitocôndrias provoca danos no DNA, alterando a expressão gênica e a síntese de proteínas podendo provocar apoptose e morte celular. Este processo pode

prejudicar a plasticidade sináptica e, conseqüentemente a neurotransmissão. Esses danos podem ter início nas fases de neurodesenvolvimento, anos antes da manifestação dos primeiros sinais clínicos de uma doença mental (Ben-Shachar e Laifenfeld, 2004). Neste estudo encontramos diminuição de proteínas *heat shock* (HSP90AA1, HSP90AB1, HSP90B1, HSPA5, HSPA8, HSPA9, HSPD1) importantes para o controle do enovelamento correto das proteínas, GGCT que controla a homeostase de glutathione e a indução de apoptose, glutathione s-transferases associadas à neutralização da oxidação celular (GSTO1, GSTP1) e peroxirredoxina PRDX6 responsável pela redução do peróxido de hidrogênio. Essas quatro últimas já foram descritas como diferentemente expressas em tecido cerebral de pacientes com esquizofrenia em comparação a controles saudáveis (Prabakaran et al., 2004; Martins-de-Souza et al., 2010ab; Föking et al., 2014; Föking et al., 2011; Wesseling et al., 2013). Especialmente a GSTP1 tem um papel na regulação da atividade da CDK5 protegendo contra neurodegeneração (Sun et al., 2011). A ausência destas proteínas nos grupo de pacientes com esquizofrenia e transtorno bipolar poderia esta relacionada com uma diminuição da neuroproteção, aumentando o risco para o adoecimento.

Alterações do metabolismo energético foram frequentemente observadas em pacientes com esquizofrenia. Pacientes com esquizofrenia tem uma tolerância à glicose e uma maior resistência à insulina em relação a indivíduos saudáveis, o que pode evidenciar prejuízos no equilíbrio energético dependente de glicose (Fernandez-Egea et al. 2008; Guest et al. 2010; Ryan et al. 2003). Outros estudos também demonstraram que o metabolismo energético cerebral está comprometido em pacientes com esquizofrenia (Fernandez-Egea et al. 2009; Martins-de-Souza 2011; Prabakaran et al. 2004; Wolkin et al. 1985). Além disso, já foi demonstrado que a fosforilação oxidativa contribui com a susceptibilidade a apresentar episódios psicóticos (Blass, 2002). No nosso estudo identificamos diferenças nos níveis de proteínas relacionadas ao metabolismo energético como alfa-glicoproteína-B (A1BG), apolipoproteínas (APOA1, APOE) que tem papel no transporte do colesterol, piruvato quinase (PKM), PPP1CA que é uma proteína fosfatase essencial para plasticidade sináptica, proteínas quinases (PRKAR1A, PRKAR2B) e subunidades do proteossoma (PSMA6, PSMC2) que são responsáveis pela degradação programada de proteínas. Algumas outras proteínas envolvidas nessas

vias já foram descritas como alteradas em modelos animais de esquizofrenia: a ATP-ase ATP6V1A e a NADH-desidrogenase NDUF51 que são importantes para o equilíbrio das vias de fosforilação oxidativas (Wesseling et al, 2013; Ji et al., 2009; Rosenfeld et al., 2011; Karry et al., 2004). Já em pacientes, comparados a controles saudáveis, os achados mais consistentes são alterações em proteínas como lactato desidrogenase B e aldolase C, e menores níveis de piruvato e NADPH (English et al., 2009; Herberth et al., 2011; Föcking et al., 2011; Martins-de-Souza et al., 2011; Wesseling et al., 2013). Nossos achados corroboram aqueles descritos na literatura indicando um desequilíbrio metabólico em pacientes com esquizofrenia. A presença de enzimas responsáveis pelo correto enovelamento de proteínas, controle de degradação de proteínas e apoptose, apenas no grupo de controles saudáveis indicam que no grupo de pacientes essas funções biológicas estão deficientes.

Encontramos, em nossa amostra diminuição de proteínas relacionadas ao citoesqueleto como GSN que auxilia na formação de filamento de actina, e microfilamentos de actina (ACTB, ACTN1, ACTN4, CAPZA1, CAPZA2, CAPZB, VCL) e tubulina (TBCB, TUBA1C, TUBB1). Alterações semelhantes em esquizofrenia já foram descritas na literatura e são relevantes para a manutenção da estrutura celular (English et al., 2009; Martins-de-Souza et al., 2010b; Föcking et al., 2014; Wesseling et al., 2013; Baumgartner et al., 2013). Encontramos também diminuição de proteínas relacionadas à neurotransmissão e sinapse como a galactosidade-beta-1 (GLB1), a fosfatase PPP1CA que participa do metabolismo celular e síntese de proteínas, a GNB4 que é uma proteína integrante de proteínas G envolvida na modulação e transdução de sinais transmembrana e PRDX6, estas duas últimas já descritas como diferentemente expressas em tecido cerebral humano *post mortem* de pacientes com esquizofrenia (Föking et al., 2014).

Encontramos ainda proteínas relacionadas com homeostase e sinalização de cálcio, como anexinas (ANXA3, ANXA6, ANXA7), a GSN que tem sua função dependente do cálcio e PPP1CA, relacionada ao controle dos canais iônicos transmembrana (Ceulemans e Bollen, 2004). Alterações nos níveis de proteínas envolvidas na sinalização de cálcio tem sido descritas em esquizofrenia (Martins-de-Souza et al., 2009a; Iavarone et al., 2014; Wesseling et al., 2013; Martins-de-Souza et al., 2008) e são de especial interesse visto sua ação no funcionamento dos receptores dopaminérgicos D1 e D2 (Bergson et al., 2003). Apesar de a hipótese

dopaminérgica não explicar completamente a esquizofrenia e seus sintomas, ainda é a principal teoria acerca da fisiopatologia deste transtorno. A presença de proteínas associadas à homeostase e sinalização do cálcio apenas em controles saudáveis pode evidenciar a importância dessas vias no funcionamento correto dos receptores dopaminérgicos.

Neste trabalho detectamos pela primeira vez em plaquetas a expressão de algumas proteínas relevantes para a função e plasticidade cerebrais e que estavam diferentemente expressas em pacientes com esquizofrenia. Para estas proteínas fizemos a validação do achado por *western blotting*.

A primeira proteína considerada para validação foi a ANXA3. As anexinas, no geral, são proteínas dependentes de cálcio, ligantes de fosfolípides. Geralmente citosólicas, estão presentes tanto na forma solúvel, quanto em forma estável associada aos componentes do citoesqueleto ou a proteínas responsáveis pelas interações entre a matriz celular e extracelular (Moss e Morgan, 2004). As funções já relacionadas às anexinas são diversas: anticoagulação, endocitose e exocitose, transdução de sinal, proliferação celular, diferenciação celular e apoptose celular (Perron et al., 1997; Moss e Morgan, 2004; Mussunoor e Murray, 2008). Além disso, a ANXA3 já foi relacionada à função de inibir a enzima fosfolipase A₂ (PLA₂) (Hofmann et al., 2000). A PLA₂ é a principal enzima responsável pelo metabolismo de fosfolípidos de membrana e tem sido estudada e relacionada a desordens neuropsiquiátricas inclusive à esquizofrenia (revisado em Shaeffer et al., 2012). Nosso grupo foi o primeiro a descrever um aumento da atividade de PLA₂ no plasma, soro e plaquetas de pacientes com esquizofrenia e *drug-free* (Gattaz et al., 1988, 1990, 1994; Tavares et al., 2003). Esses achados foram replicados por outros grupos tanto em sangue quanto em cérebro humano (Ross et al., 1997, 1999, Noponen et al., 1993; Smesny et al., 2005). Com a nossa primeira abordagem, utilizando eletroforese bidimensional (2D) não detectamos a proteína ANXA3 no nosso grupo de pacientes com esquizofrenia. Esta ausência poderia estar relacionada à desinibição da atividade da PLA₂, como encontramos em vários estudos independentes. Focando na família das anexinas, buscamos nos resultados de *shotgun* proteínas relacionadas com essa via intracelular e encontramos proteínas já relacionadas tanto com o controle de sua atividade, quanto substratos. Corroborando nosso achado inicial a ANXA3 está menos expressa em pacientes,

assim como a anexina A5. A PLA₂, PKC (fosfoquinase C) e outras anexinas aparecem também alteradas (Apêndice G).

Confirmamos também por *western blotting* a redução dos níveis de PRX6 em pacientes em primeiro episódio psicótico (tanto com transtorno bipolar como com esquizofrenia) e controles saudáveis. Esse achado sugere uma relação desta proteína com o risco para estados psicóticos em geral. A PRX6 tem dois sítios de ligação com funções distintas. O primeiro relacionado diretamente com a redução de processos de estresse oxidativo por meio da redução dos níveis de H₂O₂, das cadeias curtas de ácidos-graxos e da hidroperoxidação de fosfolípidos (Mahadik et al., 2006). O segundo sítio relaciona-se ao *turnover* dos fosfolípidos de membrana por meio de sua atividade semelhante à da PLA₂ (Chen et al., 2000). Há apenas um estudo na literatura que relaciona a expressão de PRX6 e pacientes com psicose, no qual nosso grupo observou um aumento dessa proteína em tecido cerebral de pacientes com esquizofrenia (Martins-de-Souza, 2009a). Apesar de nossos achados parecerem controversos é necessário considerar diferenças importantes no desenho do estudo. No presente estudo foram utilizadas células periféricas (plaquetas), de pacientes em primeiro episódio psicótico sem medicação prévia, enquanto que no anterior foi utilizado tecido cerebral, de pacientes já medicados e com anos de doença, o que pode alterar a expressão proteica. Dada a sua função de iPLA₂, esperavamos que os níveis de PRX6 estivessem aumentados nos pacientes desse estudo, visto que existe um aumento do *turnover* de fosfolípidos mediado pela PLA₂. De fato, nosso grupo já descreveu este aumento em lobo frontal de pacientes com esquizofrenia (Gattaz et al., 1990). Mais estudos precisam ser realizados para validar esse achado e explicar essa discrepância nos achados relativos ao metabolismo de membrana de acordo com a matriz estudada.

Apesar de não haver estudos acerca da PRX6 em plaquetas, no que diz respeito a estresse oxidativo, há inúmeras evidências do aumento desses processos na esquizofrenia (Mitra et al., 2017; Barron et al., 2017; Magalhães et al., 2016; Hardingham e Do, 2016; Koga et al., 2016; Markkanen et al., 2016; Nasyrova et al., 2015; Smaga et al., 2015), incluindo pacientes drug-naïve (Emiliani et al., 2014; Yao and Keshavan, 2011). Em revisões recentes Koga e colegas (2016) e Lai e colegas (2016) mostraram diminuição de moléculas antioxidantes (Dietrich-Muszalska et al., 2005; Dietrich-Muszalska e Olas 2009), e aumento de marcadores de estresse

oxidativo (Das et al., 1995; Dietrich-Muszalska et al., 2005; Dietrich-Muszalska e Olas, 2009; Dietrich-Muszalska e Kwiatkowska, 2014) em diferentes matrizes periféricas. Dessa forma, considerando o seu papel antioxidante, nossos achados de diminuição dos níveis da PRX6 em pacientes psicóticos está de acordo com a diminuição de outros agentes antioxidantes descrita na literatura.

As diferenças nos níveis das proteínas GRP78 e GSTP1 não puderam ser comprovadas pelo método de *western blotting*. Como nas outras proteínas já discutidas, eram esperados níveis menores em pacientes quando comparados aos controles, já que essas proteínas têm papéis importantes e bem descritos acerca da proteção contra o estresse oxidativo celular. Porém, na nossa amostra, não observamos diferenças nos níveis plaquetários entre os diferentes grupos diagnósticos.

A GRP78 (ou HSPA5) é uma chaperona que é sintetizada *on demand* e age como uma das principais reguladoras do estresse oxidativo no retículo endoplasmático, auxiliando no processo de enovelamento das proteínas sintetizadas pela célula (Gething 1997; Niforou et al., 2014; Moreno e Tiffany-Castiglioni, 2015). Já foi descrito um aumento de anticorpos anti-GRP78 em pacientes com esquizofrenia e que a medicação com antipsicóticos reduz essas concentrações (Schwarz et al. 1999). *In vitro* também já foi demonstrado que antipsicóticos atípicos (olanzapina e quetiapina) diminuem as concentrações da proteína GRP78 (Kurosawa et al., 2007). Visto que nossos pacientes eram livres de medicação, esperávamos encontrar um aumento da proteína em relação aos controles saudáveis. Em nossos resultados, ainda na etapa da eletroforese bidimensional foi o oposto. A GRP78 mostrou-se ausente nos pacientes psiquiátricos, o que poderia ser explicado como uma falha no mecanismo de controle do enovelamento de proteínas. Assim, mesmo em processos de estresse oxidativo aumentados, a célula não produzia essa proteína para auto-defesa. Porém, essa diferença não se manteve na etapa de validação.

Não encontramos diferenças na expressão da GSTP1 entre pacientes e controles. A GSTP1 foi a primeira proteína da superfamília das glutathionas-S-transferases a ter seu papel relacionado ao controle do estresse oxidativo celular (Adler et al., 1999ab; Wang et al., 2001). São elas que catalizam as trocas tiol-dissulfeto capazes de atribuir o papel antioxidante a moléculas de glutathiona (Popov,

2014). Nossos achados em plaquetas estão em linha com um estudo em cérebro de pacientes com esquizofrenia, pacientes com transtorno de humor e controles saudáveis e que não encontrou diferença nos níveis de GSTP1 (Gawryluk et al., 2011). Todavia, estudos em tecido cerebral, líquido e plasma descrevem níveis mais baixos dessa proteína em pacientes psicóticos (Flatow et al., 2013, Gawryluk et al., 2011; Do et al., 2000; Wu et al., 2013; Micó et al., 2011). Há apenas um estudo em cérebro de pacientes com esquizofrenia, pacientes com transtorno de humor e controles saudáveis e que não encontrou diferença nos níveis de GSTP1 (Gawryluk et al., 2011) o que corrobora nossos achados em plaquetas. Apesar de não ser claro o papel dessa via na esquizofrenia, sabe-se que há uma associação no desenvolvimento dos sintomas (Barron et al., 2017). Mais estudos serão necessários para esclarecer a relação da GSTP1 com quadros psicóticos.

8 CONCLUSÃO

As plaquetas se mostraram mais uma vez uma boa matriz para estudar no sistema periférico alterações nas doenças neuropsiquiátricas, por serem acessíveis, de fácil preparo e análise. Os dados obtidos nesse estudo são dados inéditos e promissores, considerando a casuística de primeiro episódio psicótico e a abordagem abrangente combinando análise das amostras por eletroforese bidimensional e *shotgun*. Os resultados descritos aqui podem ser expandidos de acordo com novas abordagens de análise de dados e validados em casuística maior, o que certamente será possível em um futuro próximo. Deve-se estudar também a possibilidade de que alguns biomarcadores não sejam específicos para uma determinada doença, mas sim relacionados com a produção de sintomas comuns a diferentes estados psicopatológicos, como por exemplo alucinações ou sintomas paranóides.

Ainda há uma necessidade urgente de biomarcadores, mas o campo da proteômica está se desenvolvendo rapidamente, com melhorias na espectrometria de massa, algoritmos de identificação de peptídeos e bioinformática. Estudos maiores, coleta e processamento padronizados de amostras e plataformas proteômicas altamente sofisticadas prometem avanços na busca por biomarcadores diagnósticos, prognósticos e terapêuticos para a esquizofrenia.

REFERÊNCIAS

- Abi-Dargham A, Gil R, Krystal J, Baldwin RM, Seibyl JP, Bowers M, et al. Increased striatal dopamine transmission in schizophrenia: confirmation in a second cohort. *Am J Psychiatry*. 1998; 155:761-7.
- Adler V, Yin Z, Fuchs SY, Benezra M, Rosario L, Tew KD, et al. Regulation of JNK signaling by GSTp. *EMBO J*. 1999; 18:1321-1334.
- Adler V, Yin Z, Tew KD, Ronai Z. Role of redox potential and reactive oxygen species in stress signaling. *Oncogene*. 1999; 18: 6104-6111.
- Albertini V, Benussi L, Paterlini A, Glionna M, Prestia A, Bocchio-Chiavetto L, et al. Distinct cerebrospinal fluid amyloid-beta peptide signatures in cognitive decline associated with Alzheimer's disease and schizophrenia. *Electrophoresis*. 2012; 33:3738-44.
- Albus M. Clinical courses of schizophrenia. *Pharmacopsychiatry*. 2012; 45:31–35.
- American Psychiatry Association. DSM IV-TR: Manual diagnóstico e estatístico dos transtornos mentais. 2002; 4. Ed. Porto Alegre: Artmed.
- Arseneault L, Cannon M, Poulton R, Murray R, Caspi A, Moffitt TE. Cannabis use in adolescence and risk for adult psychosis: longitudinal prospective study. *BMJ*. 2002; 325(7374):1212-3.
- Arseneault L, Cannon M, Witton J, Murray RM. Casual association between cannabis and psychosis: examination of the evidence. *Br J Psychiatry*. 2004; 184:110-7.
- Arseneault L, Moffitt TE, Caspi A, Taylor PJ, Silva PA. Mental disorder and violence in a total birth cohort: results from the Dunedin Study. *Arch Gen Psychiatry*. 2000; 57(10):979-86.
- Awam-Al K, Haußleiter IS, Dudley E, Donev R, Brüne M, Juckel G, et al. Multiplatform metabolome and proteome profiling identifies serum metabolite and protein signatures as prospective biomarkers for schizophrenia. *J Neural Transm*. 2014; 1–12.
- Baggerly KA, Morris JS, Coombes KR. Reproducibility of SELDI-TOF protein patterns in serum: comparing datasets from different experiments. *Bioinformatics*. 2004; 20:777–785.
- Bahn S, Noll R, Barnes A, Schwarz E, Guest PC. Challenges of introducing new biomarker products for neuropsychiatric disorders into the market. *Int Rev Neurobiol*. 2011;101:299-327.
- Bahn S, Schwraz E, Harris LW, Martins-de-Souza D, Rahmoune H, Guest PC. Biomarker blood tests for diagnosis and management of mental disorders: focus on schizophrenia. *Revista de Psiquiatria Clínica*. 2013;40(1):2-9.
- Barnett JH, Smoller JW. The genetics of bipolar disorder. *Neuroscience*. 2009; 164(1):331-43.
- Barradas MA, Mikhailidis DP. The use of platelets as models for neurons: possible applications to the investigation of eating disorders. *Biomed Pharmacother*. 1993; 47(1):11-8.
- Barron H, Hafizi S, Andreazza AC, Mizrahi R. Neuroinflammation and Oxidative Stress in Psychosis and Psychosis Risk. *Int J Mol Sci*. 2017; 18(3).
- Baumgartner R, Umlauf E, Veitinger M, Guterres S, Rappold E, Babeluk R, et al. Identification and validation of platelet low biological variation proteins, superior to GAPDH, aBELActin and tubulin, as tools in clinical proteomics. *J Proteomics*. 2013; 94:540–551.
- Beasley CL, Pennington K, Behan A, Wait R, Dunn MJ, Cotter D. Proteomic analysis of the anterior cingulate cortex in the major psychiatric disorders: evidence for disease-associated changes. *Proteomics*. 2006; 6:3414–3425.
- Behan AT, Byrne C, Dunn MJ, Cagney G, Cotter DR. Proteomic analysis of membrane microdomain-associated proteins in the dorsolateral prefrontal cortex in schizophrenia and bipolar disorder reveals alterations in LAMP, STXBP1 and BASP1 protein expression. *Mol Psychiatry*. 2009; 14(6):601-13.
- Behrens S, Gattaz WF. MK-801 induced stereotypies in rats are decreased by haloperidol and increased by diazepam. *J Neural Transm Gen Sect*. 1992; 90(3):219-24.
- Ben-Shachar D, Laifenfeld D. Mitochondria, synaptic plasticity, and schizophrenia. *Int Rev Neurobiol*. 2004; 59: 273–296.

- Bergson C, Levenson R, Goldman-Rakic PS, Lidow MS. Dopamine receptorinteracting proteins: the Ca(2+) connection in dopamine signaling. *Trends Pharmacol Sci.* 2003; 24:486–492.
- Blass JP. Glucose/mitochondria in neurological conditions. *Int Rev Neurobiol.* 2002; 51:325–376.
- Bliss TV, Collingridge GL. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature.* 1993; 361:31-9.
- Bobes J, Arango C, Garcia-Garcia M, Rejas J. Healthy lifestyle habits and 10-year cardiovascular risk in schizophrenia spectrum disorders: an analysis of the impact of smoking tobacco in the CLAMORS schizophrenia cohort. *Schizophr Res.* 2010; 119:101–9.
- Bogerts B. The neuropathology of schizophrenic diseases: historical aspects and present knowledge. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.* 1999; 249:2-13.
- Breier A, Su TP, Saunders R, Carson RE, Kolachana BS, de Bartolomeis A, et al. Schizophrenia is associated with elevated amphetamine-induced synaptic dopamine concentrations: evidence from a novel positron emission tomography method. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997; 94:2569-74.
- Bressan RA, Pilowsky LS. Glutamatergic hypothesis of schizophrenia. *Rev Bras Psiquiatr.* 2003; 25(3):177-83.
- Candiano G, Bruschi M, Musante L, Santucci L, Ghiggeri GM, Carnemolla B, et al. Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis.* 2004; 25(9):1327-33.
- Cannon M, Jones PB, Murray RM. Obstetric complications and schizophrenia: historical and meta-analytic review. *American Journal Psychiatry.* 2002; 159(7):1080-92.
- Cannon TD, Rosso IM, Hollister JM, Bearden CE, Sanchez LE, Hadley T. A prospective cohort study of genetic and perinatal influences in the etiology of schizophrenia. *Schizophr Bull.* 2000; 26(2):351-66.
- Ceulemans H, Bollen M. Functional diversity of protein phosphatase-1, a cellular economizer and reset button. *Physiol Rev.* 2004;84(1):1-39.
- Chen JW, Dodia C, Feinstein SI, Jain MK, Fisher AB. 1-Cys peroxiredoxin, a bifunctional enzyme with glutathione peroxidase and phospholipase A2 activities. *J Biol Chem.* 2000; 275(37):28421-7.
- Clark D, Dedova I, Cordwell S, Matsumoto I. A proteome analysis of the anterior cingulate cortex gray matter in schizophrenia. *Mol Psychiatry.* 2006; 11:459–470.
- Clark D, Dedova I, Cordwell S, Matsumoto I. Altered proteins of the anterior cingulate cortex white matter proteome in schizophrenia. *Proteomics Clin.* 2007; 1:157–166.
- Clarke MC, Harley M, Cannon M. The role of obstetric events in schizophrenia. *Schizophr Bull.* 2006; 32(1):3-8.
- Dadheech, Mishra S, Gautam S, Sharma P. Oxidative stress, alpha-tocopherol, ascorbic acid and reduced glutathione status in schizophrenics. *Indian J Clin Biochem.* 2006; 21(2):34–38.
- Darie CC, Biniossek ML, Jovine L, Litscher ES, Wassarman PM. Structural characterization of fish egg vitelline envelope proteins by mass spectrometry. *Biochemistry.* 2004; 43(23):7459-78.
- Darie CC, Biniossek ML, Winter V, Mutschler B, Haehnel W. Isolation and structural characterization of the Ndh complex from mesophyll and bundle sheath chloroplasts of Zea mays. *FEBS J.* 2005; 272(11):2705-16.
- Das DK, Maulik N, Moraru II. Gene expression in acute myocardial stress. Induction by hypoxia, ischemia, reperfusion, hyperthermia and oxidative stress. *J Mol Cell Cardiol.* 1995; 27(1):181-93.
- Davalieva K, Maleva-Kostovska I, Dwork AJ. Proteomics Research in Schizophrenia. *Frontiers in Cellular Neuroscience.* 2016;10:18. doi:10.3389/fncel.2016.00018.
- de Witte L, Tomasik J, Schwarz E, Guest PC, Rahmoune H, Kahn RS, et al. Schizophrenia research. *Schizophr Res.* 2014; 154: 23–29.
- Dietrich-Muszalska A, Kwiatkowska A. Generation of superoxide anion radicals and platelet glutathione peroxidase activity in patients with schizophrenia. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 2014; 10:703-9.

- Dietrich-Muszalska A, Olas B, Rabe-Jablonska J. Oxidative stress in blood platelets from schizophrenic patients. *Platelets*. 2005; 16(7):386-91.
- Dietrich-Muszalska A, Olas B. Isoprostenes as indicators of oxidative stress in schizophrenia. *World J Biol Psychiatry*. 2009; 10(1):27-33.
- Do KQ, Trabesinger AH, Kirsten-Kruger M, Lauer CJ, Dydak U, Hell D, et al. Schizophrenia: Glutathione deficit in cerebrospinal fluid and prefrontal cortex in vivo. *Eur J Neurosci*. 2000; 12:3721-8.
- Domenici E, Wille DR, Tozzi F, Prokopenko I, Miller S, McKeown A, et al. Plasma protein biomarkers for depression and schizophrenia by multi analyte profiling of case-control collections. *PLoS ONE*. 2010; 5:9166.
- Egerton A, Stone JM. The glutamate hypothesis of schizophrenia: neuroimaging and drug development. *Curr Pharm Biotechnol*. 2012; 13(8):1500-12.
- Emiliani FE, Sedlak TW, Sawa A. Oxidative stress and schizophrenia: recent breakthroughs from an old story. *Curr Opin Psychiatry*. 2014; 27(3):185-90.
- English JA, Dicker P, Föcking M, Dunn MJ, Cotter DR. 2-D DIGE analysis implicates cytoskeletal abnormalities in psychiatric disease. *Proteomics*. 2009; 9: 3368-82.
- English JA, Dicker P, Föcking M, Dunn MJ, Cotter DR. 2-D DIGE analysis implicates cytoskeletal abnormalities in psychiatric disease. *Proteomics*. 2009; 9:3368-82.
- Farde L, Nordstrom AL. PET analysis indicates atypical central dopamine receptor occupancy in clozapine-treated patients. *Br J Psychiatry Suppl*. 1992; 30-3.
- Fernandez-Egea E, Bernardo M, Donner T, Conget I, Parellada E, Justicia A, et al. Metabolic profile of antipsychotic-naïve individuals with nonaffective psychosis. *Br J Psychiatry*. 2009; 194:434-438.
- Fernandez-Egea E, Bernardo M, Parellada E, Justicia A, GarciaRizo C, Esmatjes E, et al. Glucose abnormalities in the siblings of people with schizophrenia. *Schizophr Res*. 2008; 103:110-3.
- First MB, Spitzer RL, Gibbon M, Williams JBW. Structured clinical interview for DSM-IV-TR Axis I Disorders. Research version. Non-patient edition (SCID-I/NP). New York: Biometrics Research, New York State Psychiatric Institute, 2002.
- Flatow J, Buckley P, Miller BJ. Meta-analysis of oxidative stress in schizophrenia. *Biol Psychiatry*. 2013; 74:400-9.
- Föcking M, Dicker P, English JA, Schubert KO, Dunn MJ, Cotter DR. Common proteomic changes in the hippocampus in schizophrenia and bipolar disorder and particular evidence for involvement of cornu ammonis regions 2 and 3. *Arch Gen Psychiatry*. 2011; 68: 477-88.
- Föcking M, Lopez LM, English JA, Dicker P, Wolff A, Brindley E, et al. Proteomic and genomic evidence implicates the postsynaptic density in schizophrenia. *Mol Psychiatry*. 2015; 20(4):424-32.
- Freedman R. Schizophrenia. *N Engl J Med*. 2003; 349(18):1738-49.
- Gattaz WF, Gattaz D, Beckmann H. Glutamate in schizophrenics and healthy controls. *Arch Psychiatr Nervenkr*. 1982; 231(3):221-5.
- Gattaz WF, Hübner CK, Nevalainen TJ, Thuren T, Kinnunen PKJ. Increased serum phospholipase A2 activity in schizophrenia: a replication study. *Biological Psychiatry*. 1990;28:495-501.
- Gattaz WF, Rost W, Kohlmeyer K, Bauer K, Hübner C, Gasser T. CT scans and neuroleptic response in schizophrenia: a multidimensional approach. *Psychiatry Res*. 1988; 26(3):293-303.
- Gattaz WF, Schummer B, Behrens S. Effects of zotepine, haloperidol and clozapine on MK-801-induced stereotypy and locomotion in rats. *J Neural Transm Gen Sect*. 1994; 96(3):227-32.
- Gawryluk JW, Wang JF, Andreazza AC, Shao L, Yatham LN, Young LT. Prefrontal cortex glutathione S-transferase levels in patients with bipolar disorder, major depression and schizophrenia. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2011; 14(8):1069-74.
- Gawryluk JW, Wang JF, Andreazza AC, Shao L, Young LT. Decreased levels of glutathione, the major brain antioxidant, in post-mortem prefrontal cortex from patients with psychiatric disorders. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2011; 14:123-30.

- Gething MJ. Guidebook to Molecular Chaperones and Protein-folding Catalysts. Oxford, Oxford University Press. 1997
- Glantz LA, Gilmore JH, Lieberman JA, Jarskog LF. Apoptotic mechanisms and the synaptic pathology of schizophrenia. *Schizophr Res*. 2006; 81(1):47-63.
- Goff DC, Romero K, Paul J, Mercedes Perez-Rodriguez M, Crandall D, Potkin SG. Biomarkers for drug development in early psychosis: Current issues and promising directions. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2016; 26(6):923-37.
- Guest FL, Guest PC, Martins-de-Souza D. The emergence of point-of-care blood-based biomarker testing for psychiatric disorders: enabling personalized medicine. *Biomark Med*. 2016; 10(4):431-43.
- Guest PC, Schwarz E, Krishnamurthy D, Harris LW, Leweke FM, Rothermundt M, et al. Altered levels of circulating insulin and other neuroendocrine hormones associated with the onset of schizophrenia. *Psychoneuroendocrinology*. 2011; 36(7):1092-6.
- Guest PC, Wang L, Harris LW, Burling K, Levin Y, Ernst A, et al. Increased levels of circulating insulin-related peptides in first-onset, antipsychotic naive schizophrenia patients. *Mol Psychiatry*. 2010; 15:118–9.
- Hardingham GE, Do KQ. Linking early-life NMDAR hypofunction and oxidative stress in schizophrenia pathogenesis. *Nat Rev Neurosci*. 2016; 17(2):125-34.
- Haroutunian V, Katsel P, Roussos P, Davis KL, Altshuler LL, Bartzokis G. Myelination, oligodendrocytes, and serious mental illness. *Glia*. 2014; 62(11):1856-77.
- Harrison PJ. The neuropathology of schizophrenia. A critical review of the data and their interpretation. *Brain*. 1999; 122(4):593-624.
- Harrison PJ. Using our brains: the findings, flaws, and future of postmortem studies of psychiatric disorders. *Biol Psychiatry*. 2011; 69:102–3.
- Herberth M, Koethe D, Cheng TMK, Krzyszton ND, Schoeffmann S, Guest PC et al. Impaired glycolytic response in peripheral blood mononuclear cells of first-onset antipsychotic-naive schizophrenia patients. *Mol Psychiatry*. 2011; 16:848–59.
- Ho BC, Andreasen NC, Nopoulos P, Arndt S, Magnotta V, Flaum M. Progressive structural brain abnormalities and their relationship to clinical outcome: a longitudinal magnetic resonance imaging study early in schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry*. 2003; 60(6):585-94.
- Hofmann A, Raguénès-Nicol C, Favier-Perron B, Mesonero J, Huber R, Russo-Marie F, Lewit-Bentley A. The annexin A3-membrane interaction is modulated by an N-terminal tryptophan. *Biochemistry*. 2000; 4;39(26): 7712-21.
- Honea R, Crow TJ, Passingham D, Mackay CE. Regional deficits in brain volume in schizophrenia: a meta-analysis of voxel-based morphometry studies. *Am J Psychiatry*. 2005;162(12):2233-45.
- Horton AA, Fairhurst S. Lipid peroxidation and mechanisms of toxicity. *Crit Rev Toxicol*. 1987; 18(1):27–79.
- Huang JT, Leweke FM, Oxley D, Wang L, Harris N, Koethe D, et al. Disease biomarkers in cerebrospinal fluid of patients with first-onset psychosis. *PLoS Med*. 2006; 3(11):428.
- Huang JT, Leweke FM, Tsang TM, Koethe D, Kranaster L, Gerth CW, et al. CSF metabolic and proteomic profiles in patients prodromal for psychosis. *PLoS One*. 2007; 2(8):756.
- Huang JT, 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(12):1118-28.
- Iavarone F, Melis M, Platania G, Cabras T, Manconi B, Petruzzelli R, et al. Characterization of salivary proteins of schizophrenic and bipolar disorder patients by top-down proteomics. *J Proteomics*. 2014; 103: 15–22.
- Jaros JA, Martins-de-Souza D, Rahmoune H, Rothermundt M, Leweke FM, Guest PC, et al. Protein phosphorylation patterns in serum from schizophrenia patients and healthy controls. *J Proteomics*. 2012; 76:43–55.

- Javitt DC, Zukin SR, Heresco-Levy U, Umbricht D. Has an angel shown the way? Etiological and therapeutic implications of the PCP/NMDA model of schizophrenia. *Schizophr Bull.* 2012; 38(5):958-66.
- Javitt DC, Zukin SR. Recent advances in the phencyclidine model of schizophrenia. *Am J Psychiatry.* 1991; 148:1301-8.
- Ji B, La Y, Gao L, Zhu H, Tian N, Zhang M, et al. A comparative proteomics analysis of rat mitochondria from the cerebral cortex and hippocampus in response to antipsychotic medications. *J Proteome Res.* 2009; 8:3633-41.
- 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; 5:142-9.
- Kapur S, Seeman P. Does fast dissociation from the dopamine d(2) receptor explain the action of atypical antipsychotics? A new hypothesis. *Am J Psychiatry.* 2001; 158:360-9.
- Karry R, Klein E, Ben-Shachar D. Mitochondrial complex I subunits expression is altered in schizophrenia: a postmortem study. *Biol Psychiatry.* 2004; 55:676-84.
- Kay SR, Fiszbein A, Opler LA. The positive and negative syndrome scale for schizophrenia. *Schizophr Bull.* 1987; 13: 261-76.
- Keshavan MS, Roberts M, Wittmann D. Guidelines for clinical treatment of early course schizophrenia. *Curr Psychiatry Rep.* 2006; 8(4):329-34.
- Kim JS, Kornhuber HH, Schmid-Burgk W, Holzmüller B. Low cerebrospinal fluid glutamate in schizophrenic patients and a new hypothesis on schizophrenia. *Neurosci Lett.* 1980; 20:379-82.
- Koga M, Serritella AV, Sawa A, Sedlak TW. Implications for reactive oxygen species in schizophrenia pathogenesis. *Schizophr Res.* 2016; 176(1):52-71.
- Konat GW. H₂O₂-induced higher order chromatin degradation: a novel mechanism of oxidative genotoxicity. *J Biosci.* 2003; 28(1):57-60.
- Krishnamurthy D, Harris LW, Levin Y, Koutroukides TA, Rahmoune H, Pietsch S, et al. Metabolic, hormonal and stress-related molecular changes in post-mortem pituitary glands from schizophrenia subjects. *World of Biological Psychiatry.* 2013; 14(7):478-89.
- Kurosawa S, Hashimoto E, Ukai W, Toki S, Saito S, Saito T. Olanzapine potentiates neuronal survival and neural stem cell differentiation: regulation of endoplasmic reticulum stress response proteins. *J Neural Transm (Vienna).* 2007; 114(9):1121-8.
- Kvajo M, McKellar H, Gogos JA. Molecules, signaling, and schizophrenia. *Curr Top Behav Neurosci.* 2010; 4:629-56.
- Lai CY, Scarr E, Udawela M, Everall I, Chen WJ, Dean B. Biomarkers in schizophrenia: A focus on blood based diagnostics and theranostics. *World J Psychiatry.* 2016; 6(1):102-17.
- Lakhan SE. Schizophrenia proteomics: biomarkers on the path to laboratory medicine? *Diagn Pathol.* 2006; 1:11.
- Larsen TK, Melle I, Auestad B, Haahr U, Joa I, Johannessen JO, et al. Early detection of psychosis: positive effects on 5-year outcome. *Psychol Med.* 2011; 41(7):1461-9.
- Laruelle M, Abi-Dargham A, Gil R, Kegeles L, Innis R. Increased dopamine transmission in schizophrenia: relationship to illness phases. *Biol Psychiatry.* 1999; 46:56-72.
- Laruelle M, Abi-Dargham A, van Dyck CH, Gil R, D'Souza CD, Erdos J, et al. Single photon emission computerized tomography imaging of amphetamine induced dopamine release in drug-free schizophrenic subjects. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996; 93:9235-40.
- Le-Niculescu H, Kurian SM, Yehyawi N, Dike C, Patel SD, Edenberg HJ, et al. Identifying blood biomarkers for mood disorders using convergent functional genomics. *Mol Psychiatry.* 2009; 14(2):156-74. Erratum in: *Mol Psychiatry.* 2009; 14(12):1143.
- Levin Y, Wang L, Schwarz E, Koethe D, Leweke FM, Bahn S. Global proteomic profiling reveals altered proteomic signature in schizophrenia serum. *Molecular Psychiatry.* 2010; 15:1088-100.

- 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.
- Lieberman JA, Perkins D, Belger A, Chakos M, Jarskog F, Boteva K, Gilmore J. The early stages of schizophrenia: speculations on pathogenesis, pathophysiology, and therapeutic approaches. *Biological Psychiatry.* 2001; 50(11):884-97.
- Lodge D, Anis NA. Effects of phencyclidine on excitatory amino acid activation of spinal interneurons in the cat. *Eur J Pharmacol.* 1982; 77:203-4.
- Luby ED, Cohen BD, Rosebush P, Gottlieb JS, Kelley R. Study of a new schizophrenomimetic drug; sernyl. *Arch Neurology Psychiatry.* 1959; 81:363-9.
- Maccarrone G, Ditzgen C, Yassouridis A, Rewerts C, Uhr M, Uhlen M, et al. Psychiatric patient stratification using biosignatures based on cerebrospinal fluid protein expression clusters. *J Psychiatr Res.* 2013. 47(11):1572-80.
- Magalhães PV, Dean O, Andreazza AC, Berk M, Kapczinski F. Antioxidant treatments for schizophrenia. *Cochrane Database Syst Rev.* 2016; 2:CD008919.
- Mahadik SP, Pillai A, Joshi S, Foster A. Prevention of oxidative stress-mediated neuropathology and improved clinical outcome by adjunctive use of a combination of antioxidants and omega-3 fatty acids in schizophrenia. *Int Rev Psychiatry.* 2006; 18(2):119-31.
- Markkanen E, Meyer U, Dianov GL. DNA Damage and Repair in Schizophrenia and Autism: Implications for Cancer Comorbidity and Beyond. *Int J Mol Sci.* 2016; 17(6).
- Martins-de-Souza D, Dias-Neto E, Schmitt A, Falkai P, Gormanns P, Maccarrone G, et al. Proteome analysis of schizophrenia brain tissue. *World J Biol Psychiatry.* 2010; 11: 110–20.
- Martins-de-Souza D, Gattaz WF, Schmitt A, MacCarrone G, Hunyadi-Gulyas E, Eberlin MN, et al. Proteomic analysis of dorsolateral prefrontal cortex indicates the involvement of cytoskeleton, oligodendrocyte, energy metabolism and new potential markers in schizophrenia. *J Psychiatr Res.* 2009; 43, 978–86.
- Martins-de-Souza D, Gattaz WF, Schmitt A, Novello JC, Marangoni S, Turck CW, et al. Proteome analysis of schizophrenia patients Wernicke's area reveals an energy metabolism dysregulation. *BMC Psychiatry.* 2009; 9:17.
- Martins-de-Souza D, Gattaz WF, Schmitt A, Rewerts C, Maccarrone G, Dias-Neto E, Turck CW. Prefrontal cortex shotgun proteome analysis reveals altered calcium homeostasis and immune system imbalance in schizophrenia. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.* 2009; 259: 151–63.
- Martins-de-Souza D, Gattaz WF, Schmitt A, Rewerts C, Marangoni S, Novello JC, et al. Alterations in oligodendrocyte proteins, calcium homeostasis and new potential markers in schizophrenia anterior temporal lobe are revealed by shotgun proteome analysis. *J Neural Transm.* 2008; 116: 275–89.
- Martins-de-Souza D, Harris LW, Guest PC, Bahn S. The role of energy metabolism dysfunction and oxidative stress in schizophrenia revealed by proteomics. *Antioxid Redox Signal.* 2011; 15: 2067–79.
- Martins-de-Souza D, Maccarrone G, Wobrock T, Zerr I, Gormanns P, Reckow S, et al. Proteome analysis of the thalamus and cerebrospinal fluid reveals glycolysis dysfunction and potential biomarkers candidates for schizophrenia. *J Psychiatr Res.* 2010; 44: 1176–89.
- Martins-de-Souza D, Schmitt A, Röder R, Lebar M, Schneider-Axmann T, Falkai P, Turck CW. Sex-specific proteome differences in the anterior cingulate cortex of schizophrenia. *J Psychiatr Res.* 2010; 44: 989–91.
- Martins-de-Souza D, Turck CW. Proteomic biomarkers for psychiatry disorders: a progress update. *Biomarkers Med.* 2012; 6(2):189-92.
- Martins-De-Souza D, Wobrock T, Zerr I, Schmitt A, Gawinecka J, Schneider-Axmann T, et al. Different apolipoprotein E, apolipoprotein A1 and prostaglandin-H2 D-isomerase levels in cerebrospinal fluid of schizophrenia patients and healthy controls. *World J Biol Psychiatry.* 2010; 11(5):719-28
- Martins-de-Souza D. Proteome and transcriptome analysis suggests oligodendrocyte dysfunction in schizophrenia. *Journal of Psychiatry Research.* 2010; 44:49-56.

- Martins-de-Souza, Gattaz WF, Schimtt A, Rewerts C, Marangoni S, Novello JC, et al. Alterations in oligodendrocyte proteins, calcium homeostasis and new potential markers in schizophrenia anterior temporal lobe are revealed by shotgun proteome analysis. *J of Neural Transmission*. 2009b; 116:275-89.
- Mei JF, Kolbin D, Kao HT, Porton B. Protein expression profiling of postmortem brain in schizophrenia. *Schizophr Res*. 2006; 84:204–13.
- Mi H, Huang X, Muruganujan A, Tang H, Mills C, Kang D, Thomas PD. PANTHER version 11: expanded annotation data from Gene Ontology and Reactome pathways and data analysis tool enhancements. *Nucleic Acids Research*. 2017; 45:183–9.
- Micó JA, Rojas-Corrales MO, Gibert-Rahola J, Parellada M, Moreno D, Fraguas D, et al. Reduced antioxidant defense in early onset first-episode psychosis: A case-control study. *BMC Psychiatry*. 2011. 11:26.
- Mitra S, Natarajan R, Ziedonis D, Fan X. Antioxidant and anti-inflammatory nutrient status, supplementation, and mechanisms in patients with schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2017; 78:1-11.
- Moreno JA, Tiffany-Castiglioni E. The chaperone Grp78 in protein folding disorders of the nervous system. *Neurochem Res*. 2015; 40(2):329-35.
- Moss SE, Morgan RO. The annexins. *Genome Biol*. 2004; 5:219.
- Mueser K, McGurk S. Schizophrenia. *Lancet*. 2004; 363:2063-72.
- Mussunoor S, Murray GI. The role of annexins in tumour development and progression. *J Pathol*. 2008; 216: 131-40.
- Napal O, Ojeda N, Elizagárate E, Peña J, Ezcurra J, Gutiérrez M. The course of the schizophrenia and its impact on cognition: a review of literature. *Actas Esp Psiquiatr*. 2012; 40(4):198-220.
- Nascimento JM, Martins de Souza D. The proteome of schizophrenia. *NPJ Schizophrenia*. 2015; 1-10.
- Nasyrova RF, Ivashchenko DV, Ivanov MV, Neznanov NG. Role of nitric oxide and related molecules in schizophrenia pathogenesis: biochemical, genetic and clinical aspects. *Front Physiol*. 2015; 6:139.
- Nave KA, Ehrenreich H. Myelination and oligodendrocyte functions in psychiatric diseases. *JAMA Psychiatry*. 2014; 71(5):582-4.
- Neale BM, Kou Y, Liu L, Ma'ayan A, Samocha KE, Sabo A, et al. Patterns and rates of exonic de novo mutations in autism spectrum disorders. *Nature*. 2012; 485(7397):242-5.
- Nesvaderani M, Matsumoto I, Sivagnanasundaram S. Anterior hippocampus in schizophrenia pathogenesis: molecular evidence from a proteome study. *Aus N Z J Psychiatry*. 2009; 43:310– 22.
- Ngounou-Wetie AG, Sokolowska I, Woods AG, Wormwood KL, Dao S, Patel S, et al. Automated mass spectrometry-based functional assay for the routine analysis of thesecretome. *J Lab Autom*. 2013; 18(1):19-29.
- Niforou K, Cheimonidou C, Trougakos IP. Molecular chaperones and proteasis regulation during redox imbalance. *Redox Biol*. 2014; 2:323-32.
- Nojonen M, Sanfilipo M, Samanich K, Ryer H, Ko G, Angrist B, et al. Elevated PLA₂ activity in schizophrenics and other psychiatric patients. *Biological Psychiatry*. 1993; 34:641-9.
- Novikova SI, He F, Cutrufello NJ, Lidow MS. Identification of protein biomarkers for schizophrenia and bipolar disorder in the postmortem prefrontal cortex using SELDI-TOF-MS Protein Chip profiling combined with MALDI-TOF-PSD-MS analysis. *Neurobiol Dis*. 2006; 23:61–76.
- O'Farrell PH. High Resolution Two-Dimensional Electrophoresis of Proteins. *The Journal of Biological Chemistry*. 1975; 250(10):4007-21.
- Old WM, Meyer-Arendt K, Aveline-Wolf L, Pierce KG, Mendoza A, Sevinsky JR, et al. Comparison of label-free methods for quantifying human proteins by shotgun proteomics. *Mol Cell Proteomics*. 2005; 4(10):1487-502.
- Oliveira BM, Martins-de-Souza D. Large-scale analyses of schizophrenia proteome. *Revista de Psiquiatria Clínica*. 2013; 40(1):16-9.

- Olney JW, Farber NB. NMDA antagonists as neurotherapeutic drugs, psychotogens, neurotoxins, and research tools for studying schizophrenia. *Neuropsychopharmacol.* 1995;13:335-45.
- Organização Mundial da Saúde. Classificação dos transtornos mentais e do comportamento da CIE-10: descrições clínicas e diretrizes diagnósticas. Porto Alegre: Artes médicas; 1993.
- Owe-Larsson B, Ekdahl K, Edbom T, Osby U, Karlsson H, Lundberg C, Lundberg M. Increased plasma levels of thioredoxin-1 in patients with first episode psychosis and long-term schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psych.* 2011; 35:1117–21.
- Padovani A, Pastorino L, Borroni B, Colciaghi F, Rozzini L, Monastero R, et al. Amyloid precursor protein in platelets: a peripheral marker for the diagnosis of sporadic AD. *Neurology.* 2001; 57(12):2243-8.
- Pappin DJC, Hojrup P, Bleasby AJ. Rapid identification of protein by peptide-mass fingerprinting. *Current Biology.* 1993; 3(6): 327-32.
- Pennington K, Beasley CL, Dicker P, Fagan A, English J, Pariante CM, et al. Prominent synaptic and metabolic abnormalities revealed by proteomic analysis of the dorsolateral prefrontal cortex in schizophrenia and bipolar disorder. *Mol Psychiatry.* 2008; 13:1102–17.
- Perron B, Lewit-Bentley A, Geny B, Rosso-Marie F. Can enzymatic activity, or otherwise, be inferred from structural studies of Annexin III? *J Biol Chem.* 1997; 272:11321–6.
- Pickard B. Progress in defining the biological causes of schizophrenia. *Expert Rev Mol Med.* 2011; 13:25.
- Pickard BS. Schizophrenia biomarkers: translating the descriptive into the diagnostic. *J Psychopharmacol.* 2015; 29(2):138-43.
- Pilowsky LS, Costa DC, Ell PJ, Murray RM, Verhoeff NP, Kerwin RW. Antipsychotic medication, D2 dopamine receptor blockade and clinical response: a 123I IBZM SPET (single photon emission tomography) study. *Psychol Med.* 1993; 23:791-7.
- Pilowsky LS, Costa DC, Ell PJ, Murray RM, Verhoeff NP, Kerwin RW. Clozapine, single photon emission tomography, and the D2 dopamine receptor blockade hypothesis of schizophrenia. *Lancet.* 1992; 340:199-202.
- Poelmans G, Pauls DL, Buitelaar JK, Franke B. Integrated genome-wide association study findings: identification of a neurodevelopmental network for attention deficit hyperactivity disorder. *Am J Psychiatry.* 2011; 168(4):365-77.
- Popov D. Protein S-glutathionylation: from current basic to target modifications. *Arch Physiol Biochem.* 2014; 12:1-8.
- Prabakaran S, Swatton JE, Ryan MM, Huffaker SJ, Huang JT, Griffin JL, et al. Mitochondrial dysfunction in schizophrenia: evidence for compromised brain metabolism and oxidative stress. *Mol Psychiatry.* 2004; 9:684–97,643.
- Prabakaran S, Wengeroth M, Lockstone HE, Lilley K, Leweke FM, Bahn S. 2-D DIGE analysis of liver and red blood cells provide further evidence for oxidative stress in schizophrenia. *Journal of Proteome Research.* 2007; 6:141-9.
- Rosenfeld M, Brenner-Lavie H, SGB Ari, Kavushansky A, Ben-Shachar D. Perturbation in mitochondrial network dynamics and in complex I dependent cellular respiration in schizophrenia. *Biol Psychiatry.* 2011; 69: 980–8.
- Ross BM, Hudson C, Erlich J, Warsh JJ, Kish SJ. Increased phospholipid breakdown in schizophrenia. *Archives of General Psychiatry.* 1997; 54:487-94.
- Ross BM, Turenne S, Moszczynska A, Warsh JJ, Kish SJ. Differential alteration of phospholipase A2 activities in brain of patients with schizophrenia. *Brain Research.* 1999; 821:407-13.
- Ruiz-Litago F, Seco J, Echevarría E, Martínez-Cengotitabengoa M, Gil J, Irazusta J, González-Pinto AM. Adaptive response in the antioxidant defence system in the course and outcome in first-episode schizophrenia patients: a 12-months follow-up study. *Psychiatry Res.* 2012; 200:218–22.
- Ryan MC, Collins P, Thakore JH. Impaired fasting glucose tolerance in first-episode, drug-naive patients with schizophrenia. *Am J Psychiatry.* 2003; 160:284–9.

- Sabherwal S, English JA, Föcking M, Cagney G, Cotter DR. Blood biomarker discovery in drug-free schizophrenia: the contribution of proteomics and multiplex immunoassays. *Expert Rev Proteomics*. 2016; 13(12):1141-55.
- Saia-Cereda VM, Cassoli JS, Schmitt A, Falkai P, Nascimento JM, Martins-de-Souza D. Proteomics of the corpus callosum unravel pivotal players in the dysfunction of cell signaling, structure, and myelination in schizophrenia brains. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 2015; 265:601–12.
- Sallet PC, Elkis H, Alves TM, Oliveira JR, Sassi E, Campi de Castro C, et al. Reduced cortical folding in schizophrenia: an MRI morphometric study. *Am J Psychiatry*. 2003; 160(9):1606-13.
- Sallet PC, Elkis H, Alves TM, Oliveira JR, Sassi E, de Castro CC, et al. Rightward cerebral asymmetry in subtypes of schizophrenia according to Leonhard's classification and to DSM-IV: a structural MRI study. *Psychiatry Res*. 2003; 123(1):65-79.
- Schaeffer EL, Gattaz WF, Eckert GP. Alterations of brain membranes in schizophrenia: impact of phospholipase A(2). *Curr Top Med Chem*. 2012; 12(21):2314-23.
- 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; 13:627–32.
- Schwarz E, Guest PC, Steiner J, Bogerts B, Bahn S. Identification of blood-based molecular signatures for prediction of response and relapse in schizophrenia patients. *Transl Psychiatry*. 2012; 2:82.
- Schwarz E, Izmailov R, Spain M, Barnes A, Mapes JP, Guest PC, et al. Validation of a blood-based laboratory test to aid in the confirmation of diagnosis of schizophrenia. *Biomark Insights*. 2010; 5:39-47.
- Schwarz MJ, Riedel M, Gruber R, Ackenheil M, Müller N. Antibodies to heat shock proteins in schizophrenic patients: implications for the mechanism of the disease. *Am J Psychiatry*. 1999; 156(7):1103-4.
- Seeman P, Chau-Wong M, Tedesco J, Wong K. Brain receptors for antipsychotic drugs and dopamine: direct binding assays. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1975; 72(11):4376-80.
- Shevchenko A, Tomas H, Havlis J, Olsen JV, Mann M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat Protoc*. 2006; 1(6):2856-60.
- Silveira C, Marques-Teixeira J, de Bastos-Leite AJ. More than one century of schizophrenia: an evolving perspective. *J Nerv Ment Dis*. 2012; 200(12):1054-7.
- Singh I, Rose N. Biomarkers in psychiatry. *Nature*. 2009; 460(7252):202-7.
- Sivagnanasundaram S, Crossett B, Dedova I, Cordwell S, Matsumoto I. Abnormal pathways in the genu of the corpus callosum in schizophrenia pathogenesis: a proteome study. *Proteomics Clin*. 2007; 1:1291–1305.
- Smaga I, Niedzielska E, Gawlik M, Moniczewski A, Krzek J, Przegaliński E, et al. Oxidative stress as an etiological factor and a potential treatment target of psychiatric disorders. Part 2. Depression, anxiety, schizophrenia and autism. *Pharmacol Rep*. 2015; 67(3):569-80.
- Smalla KH, Mikhaylova M, Sahin J, Bernstein HG, Bogerts B, Schmitt A, et al. A comparison of the synaptic proteome in human chronic schizophrenia and rat ketamine psychosis suggest that prohibitin is involved in the synaptic pathology of schizophrenia. *Mol Psychiatry*. 2008; 13:878–96.
- Smesny S, Kinder D, Willhardt I, Rosburg T, Lasch J, Berger G, et al. Increased calcium-independent phospholipase A2 activity in first but not in multiepisode chronic schizophrenia. *Biological Psychiatry*. 2005; 57:399-405.
- Sokolowska I, Woods AG, Gawinowicz MA, Roy U, Darie CC. Characterization of tumor differentiation factor (TDF) and its receptor (TDF-R). *Cell Mol Life Sci*. 2013; 70(16):2835-48.
- Sokolowska I, Woods AG, Gawinowicz MA, Roy U, Darie CC. Identification of a potential tumor differentiation factor receptor candidate in prostate cancer cells. *FEBS J*. 2012; 279(14):2579-94.

- Spellman DS, Deinhardt K, Darie CC, Chao MV, Neubert TA. Stable isotopic labeling by aminoacids in cultured primary neurons: application to brain-derived neurotrophic factor-dependent phosphotyrosine-associated signaling. *Mol Cell Proteomics*. 2008; 7(6):1067-76.
- Stadtman ER, Levine RL. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids*. 2003; 25(3-4):207-18.
- Steen RG, Mull C, McClure R, Hamer RM, Lieberman JA. Brain volume in first-episode schizophrenia: systematic review and meta-analysis of magnetic resonance imaging studies. *Br J Psychiatry*. 2006; 188:510-8.
- Steiner J, Schmitt A, Schroeter ML, Bogerts B, Falkai P, Turck CW, et al. S100B is downregulated in the nuclear proteome of schizophrenia corpus callosum. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 2014; 264:311-6.
- Sullivan PF, Kendler KS, Neale MC. Schizophrenia as a complex trait: evidence from a meta-analysis of twin studies. *Archives Genetic Psychiatry*. 2003; 60(12):1187-92.
- Sun KH, Chang KH, Clawson S, Ghosh S, Mirzaei H, Regnier F, Shah K. Glutathione-S-transferase P1 is a critical regulator of Cdk5 kinase activity. *J Neurochem*. 2011; 118(5):902-14.
- Talbot PS, Laruelle M. The role of in vivo molecular imaging with PET and SPECT in the elucidation of psychiatric drug action and new drug development. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2002; 12(6):503-11.
- Tavares H, Yacubian J, Talib LL, Barbosa NR, Gattaz WF. Increased phospholipase A2 activity in schizophrenia with absent response to niacin. *Schizophrenia Research*. 2003; 61:1-6.
- Välkängas T, Suomi T, Elo LL. A systematic evaluation of normalization methods in quantitative label-free proteomics. *Brief Bioinform*. 2016; 95.
- van Os J, Kapur S. Schizophrenia. *Lancet*. 2009; 374(9690):635-45.
- Varadarajulu J, Schmitt A, Falkai P, Alsaif M, Turck CW, Martins-de-Souza D. Differential expression of HINT1 in schizophrenia brain tissue. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci*. 2012; 262:167-72.
- Vargas G. Biomarkers in schizophrenia. *Biomark Med*. 2014; 8(1):1-3.
- Vessecchi R, Lopes NP, Gozzo FC, Dörr FA, Murgu M, Lebre DT, et al. Nomenclaturas de espectrometria de massas em língua portuguesa. *Química Nova*. 2011; 34(10):1875-87.
- Walker EF, Trotman HD, Pearce BD, Addington J, Cadenhead KS, Cornblatt BA, et al. Cortisol levels and risk for psychosis: initial findings from the North American prodrome longitudinal study. *Biol Psychiatry*. 2013; 74(6):410-7.
- 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.
- Wang L, Lockstone HE, Guest PC, Levin Y, Palotás A, Pietsch S, et al. Expression profiling of fibroblasts identifies cell cycle abnormalities in schizophrenia. *J Proteome Res*. 2010; 9(1):521-7.
- Wang T, Arifoglu P, Ronai Z, Tew KD. Glutathione S-transferase P 1-1 (GSTP1-1) inhibits c-Jun N-terminal kinase (JNK1) signaling through interaction with the C terminus. *J Biol Chem*. 2001; 276:20999-1003.
- Wesseling H, Chan MK, Tsang TM, Ernst A, Peters F, Guest PC, et al. A combined metabolomic and proteomic approach identifies frontal cortex changes in a chronic phencyclidine rat model in relation to human schizophrenia brain pathology. *Neuropsychopharmacology*. 2013; 38: 2532-44.
- Wesseling H, Guest PC, Lee C-M, Wong EH, Rahmoune H, Bahn S. Integrative proteomic analysis of the NMDA NR1 knockdown mouse model reveals effects on central and peripheral pathways associated with schizophrenia and autism spectrum disorders. *Mol Autism*. 2014; 5:38.
- Wilkins MR, Sanchez JC, Gooley AA, Appel RD, Humphery-Smith I, Hochstrasser DF, Williams KL. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnol Genet Eng Rev*. 1996; 13:19-50.

- Wolkin A, Jaeger J, Brodie JD, Wolf AP, Fowler J, Rotrosen J, et al. Persistence of cerebral metabolic abnormalities in chronic schizophrenia as determined by positron emission tomography. *Am J Psychiatry*. 1985; 142:564–71.
- Wright IC, Rabe-Hesketh S, Woodruff PW, David AS, Murray RM, Bullmore ET. Meta-analysis of regional brain volumes in schizophrenia. *Am J Psychiatry*. 2000; 157(1):16-25.
- Wu JQ, Kosten TR, Zhang XY. Free radicals, antioxidant defense systems, and schizophrenia. *Prog NeuroPsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2013; 46:200–6.
- 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.
- Yao JK, Keshavan MS. Antioxidants, redox signaling, and pathophysiology in schizophrenia: an integrative view. *Antioxid Redox Signal*. 2011; 15(7):2011-35.
- Zougman A, Pilch B, Podtelejnikov A, Kiehnopf M, Schnabel C, Kumar C, Mann M. Integrated analysis of the cerebrospinal fluid peptidome and proteome. *J Proteome Res*. 2008; 7(1):386-99.

APÊNDICES

APÊNDICE A. Padronização

1 Preparo de amostra com precipitação das proteínas

Foram testados alguns preparos de amostra a partir do concentrado de plaquetas obtido (Figura 19). Para separação por eletroforese bidimensional há alguns cuidados que devem ser tomados para que não haja degradação de proteínas, adição de sal ou detergentes em quantidades que impeçam a focalização (1ª dimensão) e/ou baixa concentração de proteínas nas amostras.

Figura 19. SDS-Page corado com Coomassie-blue utilizado para conferir a integridade da amostra após os preparos acima descritos.

Legenda: P1: 1º protocolo de preparo de amostra testado; P2: 2º protocolo de preparo de amostra testado.

1º protocolo: amostra íntegra

A 500 uL de amostra foi adicionado um coquetel de inibidores de proteases (GE lifesciences) e uma solução de ureia 7M + Tiureia 2M + 4% CHAPS+ 40 mM DTT. Após homogeneização com a pipeta, foram adicionados 1,5 mL de acetona gelada e a amostra foi mantida em freezer -20°C *over night* (14-16 horas). Em seguida a amostra foi centrifugada por 30 minutos a 14000 rpm para completa precipitação das proteínas. Descartou-se o sobrenadante e, após total evaporação da acetona, o *pellet* de proteínas foi reconstituído. Para sua utilização em

eletroforese bidimensional a reconstituição foi feita com 50 uL do reagente DeStreak (GE lifesciences).

2º protocolo: centrifugação da amostra para troca de tampão de amostra

A amostra foi centrifugada por 5 minutos, 4 °C a 1500g. Após isso adicionamos um coquetel de inibidores de proteases (GE lifesciences) e uma solução de ureia 7M + Tiureia 2M + 4% CHAPS+ 40 mM DTT. Após homogeneização com a pipeta, foram adicionados 1,5 mL de acetona gelada e a amostra foi mantida em freezer -20°C *over night* (14-16 horas). Em seguida a amostra foi centrifugada por 30 minutos a 14000 rpm para completa precipitação das proteínas. Descartou-se o sobrenadante e, após total evaporação da acetona, o *pellet* de proteínas foi reconstituído. Para sua utilização em eletroforese bidimensional a reconstituição foi feita com 50 uL do reagente DeStreak (GE lifesciences).

3º protocolo: depleção das proteínas mais abundantes e concentração da amostra

A partir das amostras obtidas seguindo os 1º e 2º protocolos, empregamos o kit de depleção de albumina (kit GE lifesciences) para tentar diminuir a concentração destas e de outras proteínas muito abundantes no sangue que pudessem, por ventura, interferir na separação ou na análise dos géis. O kit consiste em empregar uma matriz que tem afinidade com albumina e imunoglobulinas. Ao eluir nossa amostra através dessa matriz, as proteínas mais abundantes se ligam e as menos abundantes são coletadas. Porém, esta pode ser uma etapa crítica para a diminuição de concentração de proteína em uma amostra que, originalmente, já não tem altas concentrações de proteína.

Após a depleção de albumina, perdemos muita proteína. Foi necessário então tentar concentrar a amostra para que tivéssemos um mínimo de proteína que pudesse ser aplicado no gel de separação. Para isso, empregamos o kit de concentração de amostra Vivaspin 2 (GE lifesciences). Obtivemos um volume final de apenas 100 uL de amostra, inviabilizando a utilização desta metodologia.

2 Eletroforese bidimensional

Foram feitos testes para a padronização da faixa de pH das tiras de poliacrilamida para focalização das proteínas das amostras, quantidade de proteína por tira de focalização, concentração de IPG buffer e condições de focalização.

Em um primeiro momento utilizamos os protocolos-padrão do equipamento Ettan IPGphor3 (Gelifesciences) para focalização das tiras. Testamos tiras com faixa de pH 3-10 linear com diferentes quantidades de proteína (Figura 20).

Figura 20. Amostras focalizadas em tiras de pH 3-10 linear e separadas por SDS-Page.

Legenda: A) 30ug de proteínas totais; B) 60ug de proteínas totais; C) 120ug de proteínas totais.

Observamos que as proteínas das nossas amostras de plaquetas se concentravam em pH mais ácido. Para melhorar a separação decidimos testar tiras com faixa de pH 4-7 também linear. Novamente carregamos diferentes quantidades de proteína em cada tira para verificar a capacidade e resolução de separação da amostra (Figura 21).

Figura 21. Amostras focalizadas em tiras de pH 4-7 linear e separadas por SDS-Page.

Legenda: A) 60ug de proteínas totais; B) 150 ug de proteínas totais.

A partir dos resultados acima descritos determinamos que tiras de pH 4-7 lineares, carregadas com 150ug de proteínas totais seriam mais adequadas para a separação das proteínas de plaquetas das nossas amostras.

Testamos então um protocolo de focalização personalizado visando otimizar a separação. As tiras foram reidratadas em duas etapas: 1ª) passiva por 5 horas em um suporte (*strip holder*) de tamanho correspondente a elas em temperatura ambiente. 2ª) ativa por 12h realizada no aparelho Ettan IGPhor3 (GE lifesciences). Imediatamente a seguir, foi iniciada a focalização isoeletrica no mesmo aparelho de acordo com o seguinte gradiente: 150 V por 15 minutos, 105 minutos até a voltagem atingir 4000V, em seguida acumulam-se 15813 Vh e ao final do processo acumulam-se 20 kVh. Após a separação por peso molecular em SDS-Page 10% obtivemos a separação abaixo que segue (Figura 22).

Figura 22. SDS-Page de 150ug de proteínas totais focalizadas em tira de pH 4-7 linear.

APÊNDICE B. Volume dos *spots* encontrados em todos os géis analisados de controlos saudáveis

Tabela 6. Volume dos *spots* encontrados em todos os géis analisados de controlos saudáveis (continua).

Match ID	Gel 1	Gel 2	Gel 3	Coeficiente de variação
0	0.471778	0.843472	0.414275	0.329961
1	0.240143	0.423916	0.224379	0.305849
2	0.0657564	0.626247	0.201436	0.801685
3	0.144246	0.0466075	0.0919936	0.42313
4	0.151593	0.269392	0.177707	0.253119
5	152.084	0.258132	0.843308	0.590279
6	470.796	341.541	254.605	0.249746
7	0.270761	0.0402036	0.308445	0.574274
8	0.790729	0.631928	0.688839	0.0933335
9	0.246031	0.190516	0.332398	0.227759
10	0.215952	0.292714	0.135447	0.299063
11	0.470572	0.272056	13.215	0.66158
12	0.93994	153.169	163.256	0.22332
13	39.757	33.556	433.406	0.103947
14	255.781	248.189	254.972	0.0134565
15	0.765972	0.357735	0.777684	0.308086
16	446.851	523.145	49.838	0.0649272
17	0.610453	245.104	0.834419	0.631419
18	0.290131	0.199397	0.272463	0.154633
19	0.467273	0.823568	0.821541	0.237859
20	0.635362	0.145188	0.433859	0.496945
21	0.200881	0.727999	0.388097	0.49701
22	0.130451	0.0740074	0.147205	0.267126
23	178.102	0.237286	0.527483	0.7894
24	0.109851	0.083582	0.13798	0.201069
25	235.947	149.885	181.814	0.187735
26	0.730508	0.887861	0.852532	0.0818455
27	103.537	161.286	187.084	0.231879
28	0.585173	0.711856	0.444209	0.188346
29	0.075641	0.057293	0.0847726	0.157462
30	0.48214	0.493243	0.563303	0.0700545
31	0.212485	0.330457	0.203653	0.232281
32	0.132973	0.453065	0.199584	0.52659
33	0.171522	0.138787	0.179232	0.107448
34	141.769	272.024	191.458	0.266031
35	0.200385	0.169518	0.257947	0.175098
36	0.522504	0.280023	101.527	0.504853
37	0.177263	0.25482	0.225152	0.14585
38	0.170581	0.124881	0.227514	0.240834

Tabela 7. Volume dos *spots* encontrados em todos os géis analisados de controlos saudáveis (continuação).

Match ID	Gel 1	Gel 2	Gel 3	Coeficiente de variação
39	0.0203795	0.0535712	0.0912947	0.525958
40	0.0790869	0.134697	0.145721	0.243356
41	0.133613	0.199108	0.28516	0.301312
42	0.0758193	0.0866878	0.153584	0.326341
43	0.169671	0.224092	0.446847	0.427943
44	0.0866171	0.0643842	0.174216	0.437356
45	0.046962	0.0343568	0.195848	0.79379
46	0.0287282	0.100771	0.096558	0.438116
47	0.0217715	0.042161	0.0257176	0.295475
48	0.152776	0.624561	0.187842	0.667072
49	0.404203	151.886	0.628618	0.56593
50	0.174262	0.406337	0.263686	0.339594
51	0.357672	0.259243	0.294067	0.134204
52	107.421	0.851329	125.817	0.156747
53	149.652	103.382	137.665	0.150555
54	0.334984	0.314192	0.811968	0.472048
55	0.102398	0.0357343	0.145605	0.477844
56	0.0604277	0.049404	0.0551737	0.0818526
57	0.0698634	0.0570814	0.0590853	0.0905191
58	0.0615317	0.0514748	0.111869	0.35247
59	0.0647502	0.0733494	0.13916	0.359621
60	0.0807267	0.0451463	0.1789	0.556768
61	0.594203	0.188561	0.187302	0.592286
62	0.168735	0.435699	0.2093	0.433041
63	115.749	470.327	300.749	0.489842
64	0.191719	0.241347	0.146915	0.199499
65	0.341236	0.695172	0.449489	0.298971
66	0.41235	0.514251	0.412021	0.10783
67	0.0437771	0.0653668	0.0297284	0.316639
68	0.0398681	0.135546	0.0432646	0.608071
69	0.163265	0.398641	0.578983	0.447575
70	0.229836	0.569186	0.573329	0.351856
71	0.0681559	0.0302647	0.0974767	0.421345
72	0.0420451	0.0696924	0.112149	0.386338
73	0.150929	0.0967261	0.201312	0.285365
74	0.215433	0.175445	0.218118	0.096131
75	0.259069	0.316234	0.258045	0.0978921
76	0.144477	0.366435	0.356342	0.354
77	0.0309142	0.243111	0.0482141	0.895724
78	0.208196	0.107689	0.137476	0.278922
79	0.108609	0.153559	0.124228	0.14467
80	0.31431	0.153922	0.148007	0.375046

Tabela 7. Volume dos *spots* encontrados em todos os géis analisados de controlos saudáveis (conclusão).

Match ID	Gel 1	Gel 2	Gel 3	Coeficiente de variação
81	0.175367	0.15485	0.183556	0.0705035
82	641.841	383.165	448.456	0.223626
83	0.154266	0.123932	0.201418	0.199416
84	0.0436841	0.0592852	0.0872314	0.284141
85	0.0997345	0.046881	0.0716099	0.296833
86	0.0540691	0.0478947	0.0741025	0.190613
87	0.205758	153.698	0.306848	0.885728
88	0.0548033	0.0628494	0.126071	0.392279
89	0.0699351	0.0304509	0.0407125	0.355654
90	0.0738197	0.0483565	0.080854	0.206275
91	0.0668932	0.0557935	0.11793	0.337349
92	0.0893316	0.335844	0.141717	0.561158
93	0.0665449	0.144572	0.0594009	0.42781
94	0.0155085	0.0287008	0.0301214	0.265543
95	0.0154823	0.0321088	0.0276175	0.280131
96	0.115773	0.115712	0.159942	0.15969
97	0.443965	0.0891481	0.581831	0.558419
98	0.494344	0.806836	0.470036	0.259755
99	0.0727417	0.0353728	0.0805496	0.313503
100	0.275509	0.245514	0.368748	0.176917
101	0.20608	0.42793	0.125059	0.505981
102	0.127253	0.402151	0.129357	0.5879
103	0.133097	0.145556	0.0898313	0.194421
104	0.237931	0.406691	0.225033	0.285498
105	0.0585998	0.0449122	0.0481433	0.115559
106	0.393121	0.867695	0.507541	0.343058
107	0.142145	0.0199444	0.150966	0.573
108	0.0482613	0.0401643	0.0146603	0.41668
109	0.103883	0.162966	0.112728	0.205643

APÊNDICE C. Volume dos *spots* encontrados em todos os géis analisados de pacientes com diagnóstico de esquizofrenia

Tabela 8. Volume dos *spots* encontrados em todos os géis analisados de pacientes com diagnóstico de esquizofrenia (continua).

Match ID	Gel 1	Gel 2	Gel 3	Coeficiente de variação
0	0.336674	0.265103	0.237188	0.149821
1	0.17069	0.137448	0.201776	0.154536
2	0.198518	0.27171	0.129744	0.289847
3	0.265389	0.0700656	0.134489	0.518777
4	0.439785	0.357102	0.266845	0.199181
5	232.742	160.568	391.379	0.36858
6	378.565	451.227	599.103	0.192659
7	0.59602	0.239156	0.434573	0.344735
8	0.273359	0.275313	0.20676	0.126547
9	0.586308	0.235757	0.294291	0.412041
10	0.340351	0.27114	0.347101	0.107433
11	0.83717	0.4206	0.632152	0.269965
12	0.738479	15.695	0.80168	0.364414
13	20.297	153.226	157.256	0.131811
14	27.973	247.506	186.221	0.163085
15	0.103304	0.389794	0.536261	0.52404
16	454.438	134.396	437.676	0.429837
17	0.959101	0.162432	0.560574	0.580056
18		0.154291	0.161879	0.707717
19	0.194452	0.104809	0.242948	0.316609
20	0.733232	0.447314	0.740601	0.213237
21	0.290841	0.337543	0.34164	0.0712629
22	0.109825	0.157308	0.114683	0.167604
23	0.378716	0.208242	0.327919	0.234341
24	0.151948	0.0794465	0.117649	0.254519
25	127.234	252.159	179.982	0.274622
26	0.386238	0.551058	0.479682	0.142885
27	0.346019	0.630142	0.447834	0.247615
28	0.454844	0.335436	0.384639	0.125112
29	0.134182	0.0945809	0.112248	0.142502
30	0.478527	0.374412	0.413062	0.10183
31	0.193382	0.279421	0.223211	0.153753
32	0.387458	0.270896	0.106492	0.452079
33	0.162737	0.132077	0.416588	0.537708
34	309.146	102.526	309.611	0.405575
35	0.160052	0.234344	0.224712	0.159842
36	0.820781	0.525878	0.639893	0.183364
37	0.213223	0.117813	0.150512	0.246629
38	0.345473	0.0746414	0.139175	0.619565
39	0.0146389	0.0414254	0.0495494	0.423682
40	0.0322889	0.0607675	0.0630141	0.268812

Tabela 8. Volume dos *spots* encontrados em todos os géis analisados de pacientes com diagnóstico de psicose esquizofrenia (conclusão).

Match ID	Gel 1	Gel 2	Gel 3	Coeficiente de variação
41	0.0416903	0.0506359	0.0830245	0.303784
42	0.0466279	0.0877083	0.112973	0.331657
43	0.0577137	0.0749005	0.126673	0.339111
44	0.0229489	0.0433782	0.0327843	0.252508
45	0.0299679	0.0377981	0.0436996	0.151374
46	0.0266186	0.0378677	0.0339589	0.142103
47	0.0208446	0.0414284	0.032685	0.266485
48	0.210056	0.11768	0.219397	0.251713
49	0.360587	0.209009	0.279334	0.21887
50	0.349911	0.257911	0.332442	0.127287
51	0.405615	0.296658	0.307285	0.145757
52	0.395291	0.324329	0.265537	0.161545
53	0.521379	0.451276	0.358469	0.150376
54	108.332	0.61051	0.51448	0.337766
55	0.227214	0.0816088	0.250761	0.401062
56	0.0549893	0.0234703	0.029829	0.377028
57	0.0408471	0.0175945	0.0367261	0.319354
58	0.0530039	0.0352117	0.0649999	0.239613
59	0.0619864	0.0540815	0.102139	0.289272
60	0.139887	0.194128	0.400596	0.458688
61	0.0386586	0.0318393	0.0588464	0.265965
62	0.284199	0.197143	0.205934	0.17081
63	188.527	116.331	247.702	0.29166
64	0.0703087	0.0882004	0.106732	0.168192
65	0.291862	0.171385	0.295898	0.228289
66	0.220737	0.0673729	0.190145	0.415719
67	0.224326	0.228977	0.154625	0.167816
68	0.227175	0.160461	0.170385	0.158009
69	0.0234412	0.0344893	0.0225862	0.201979
70	0.50159	0.741367	0.39743	0.26336
71	0.171773	0.165378	0.156144	0.0390155
72	0.304529	0.185677	0.262373	0.196123
73	0.0780713	0.0835655	0.0527367	0.187894
74	0.104069	0.239733	0.243476	0.331288
75	0.193023	0.0466128	0.21608	0.49403
76	0.0441626	0.0281269	0.0372496	0.179861
77	0.0541655	0.116676	0.170205	0.41713
78	409.674	677.078	8.368	0.274822
79	0.243373	0.228846	0.2236	0.0360582
80	0.127253	0.402151	0.129357	0.5879
81	0.0530039	0.0352117	0.0649999	0.239613
82	0.171991	0.21445	0.268892	0.181558

APÊNDICE D. Volume dos *spots* encontrados em todos os géis analisados de pacientes com diagnóstico de transtornos do humor

Tabela 9. Volume dos *spots* encontrados em todos os géis analisados de pacientes com diagnóstico de transtornos do humor (continua).

Match ID	Gel 1	Gel 2	Gel 3	Coeficiente de variação
0	0.404458	0.340873	0.355	0.0743268
1	0.407768	0.348812	0.220197	0.240534
2	0.443378	0.32193	0.293944	0.183699
3	0.0709391	0.249019	0.0463483	0.739575
4	0.20158	0.339155	0.303875	0.207233
5	219.995	245.341	208.381	0.0687169
6	213.233	196.748	244.468	0.090716
7	0.447365	0.404267	0.51605	0.100971
8	0.223116	0.111577	0.146388	0.290566
9	0.338062	0.253475	0.183539	0.244536
10	233.979	0.301106	215.652	0.575867
11	0.181993	0.166353	0.16025	0.054013
12	0.712392	0.86729	0.877067	0.0921091
13	681.901	757.333	860.433	0.0954614
14	0.164685	0.764868	0.0966367	0.87778
15	482.787	488.237	370.184	0.121707
16	0.817509	144.684	0.797663	0.295352
17	0.186812	0.175824	0.128916	0.153226
18	0.201739	0.180383	0.133278	0.166476
19	0.242892	0.370895	0.428603	0.223349
20	114.957	0.391607	0.566337	0.461307
21	0.0501764	0.0563627	0.0982521	0.312828
22	0.372634	0.175756	0.204763	0.345683
23	0.625282	0.0746375	0.529804	0.586119
24	10.984	440.322	263.632	0.59786
25	0.965912	0.236892	0.437589	0.562322
26	418.069	152.204	448.758	0.392003
27	0.438893	0.506316	0.395995	0.101568
28	0.321874	0.336169	0.316628	0.0254177
29	0.809139	0.634998	0.945061	0.159346
30	0.71528	0.520276	0.621283	0.12865
31	0.404818	0.160768	0.109723	0.57207
32	0.171991	0.21445	0.268892	0.181558
33	238.771	10.068	124.461	0.389806
34	0.0931567	0.262963	0.168943	0.396846
35	0.371778	116.382	0.390426	0.574844
36	0.163412	0.372051	0.162834	0.423128
37	0.152389	0.560414	0.296959	0.50185
38	0.0700152	0.281647	0.0870193	0.656565
39	0.0587576	0.219182	0.0854288	0.579477
40	0.0594752	0.217973	0.130584	0.47658

Tabela 9. Volume dos *spots* encontrados em todos os géis analisados de pacientes com diagnóstico de transtornos do humor (conclusão).

Match ID	Gel 1	Gel 2	Gel 3	Coeficiente de variação
41	0.0640348	0.17083	0.0837805	0.436806
42	0.0328247	0.26687	0.0464587	0.929596
43	0.0188495	0.0699843	0.0421778	0.478637
44	0.0328094	0.104348	0.0669235	0.429476
45	0.0296812	0.0948036	0.0487944	0.473192
46	0.0253796	0.0179844	0.0306899	0.21107
47	0.0844329	0.189912	0.108002	0.354684
48	0.200958	0.411596	0.260835	0.304402
49	0.292164	0.522145	0.357199	0.247879
50	0.40271	0.40555	0.300106	0.132765
51	0.899373	0.481809	0.672331	0.249359
52	0.984363	0.900826	112.341	0.0915457
53	0.975473	0.649427	135.689	0.290882
54	0.533867	0.32284	0.617531	0.252326
55	0.0776816	0.0654037	0.0696886	0.071739
56	0.102497	0.0382447	0.0902421	0.361758
57	0.0483676	0.0786117	0.0887842	0.238662
58	0.0858643	0.032012	0.0283398	0.5395
59	0.345498	0.050031	0.246305	0.573864
60	0.47551	0.0970475	0.239156	0.576911
61	0.244095	0.192502	0.195136	0.112665
62	179.569	106.927	194.397	0.238438
63	0.140949	0.180715	0.291766	0.312125
64	0.443096	0.539259	0.481274	0.0810349
65	0.107887	0.12877	0.152687	0.141034
66	0.346649	0.051088	0.081406	0.831241
67	0.107378	0.0527283	0.0844288	0.274879
68	0.391755	0.244661	0.0535115	0.602138
69	0.0203688	0.03051	0.0217481	0.185508
70	0.154177	0.114621	0.301406	0.422832
71	0.290286	0.158953	0.270883	0.241135
72	0.37117	0.250732	0.233879	0.214314
73	0.0277939	0.0926484	0.0362434	0.551203
74	0.622317	0.158452	0.444925	0.467758
75	0.0897227	0.0899856	0.0845454	0.0284369
76	185.377	756.977	169.682	0.737105
77	0.125495	0.0662614	0.396437	0.733092
78	0.464401	0.483888	0.477908	0.017146
79	0.381471	0.0505413	0.348784	0.572095

APÊNDICE E. Volume dos spots que tiveram *matching* em cada grupo diagnóstico

Tabela 10. Volume dos spots que tiveram *matching* em cada grupo diagnóstico (continua).

Controle (volume do spot)	Esquizofrenia (volume do spot)	Transtornos do humor (volume do spot)	<i>p</i>
252.981	237.819	127.009	0.476794
189.216	186.458	600.785	0.0334427*
388.845	171.151	766.556	2,02E+01*
491.154	641.184	370.679	0.442891
489.459	34.217	447.069	0.328625
355.647	476.299	21.815	0.0371146*
150.636	0.474665	339.677	0.0278008*
295.608	184.187	160.298	0.355158
0.874095	261.563	224.573	0.0741106
20.175	240.428	154.637	0.536838
0.214704	0.31953	159.914	0.0730131
136.806	103.655	0.818916	0.229746
130.233	0.443708	100.287	0.00168658*
129.864	0.560702	102.067	0.435125
106.124	0.328386	0.684504	0.00599293*
0.487048	0.736105	0.993931	0.223418
0.850559	0.282977	0.29113	0.152951
0.848595	0.304959	0.251051	0.312518
0.823634	0.472326	0.546798	0.218114
0.512895	0.422	0.796399	0.00817653*
0.704128	0.180736	0.1718	0.00320813*
0.703832	0.251811	0.16036	7,63E-01*
0.438993	0.323341	0.702503	0.300407
0.688043	0.629974	0.169532	0.209648
0.605933	0.662184	0.642007	0.980335
0.404803	0.640383	0.347463	0.189851
0.633797	0.34312	0.342063	0.404649
0.248865	0.232004	0.618946	0.00108488*
0.580412	0.39164	0.447068	0.101013
0.576508	0.279655	0.366777	0.0934354
0.149656	0.546796	0.190068	0.0126472*
0.495299	0.253048	0.487877	0.0709981
0.0945791	0.186528	0.491413	0.00933257*
0.45745	0.186007	0.229976	0.140413
0.20647	0.42325	0.455894	0.128621
0.446207	0.159418	0.129781	0.00110454*
0.110471	0.116348	0.409908	0.126497

Tabela 10. Volume dos spots que tiveram *matching* em cada grupo diagnóstico (continua).

Controle (volume do spot)	Esquizofrenia (volume do spot)	Transtornos do humor (volume do spot)	<i>p</i>
0.205413	0.113682	0.408565	0.121541
0.281428	0.313422	0.390503	0.441897
0.380296	0.0373972	0.054283	0.0339599*
0.256315	0.372119	0.258359	0.472138
0.303661	0.336519	0.369455	0.420862
0.199564	0.354577	0.281537	0.108121
0.297813	0.199991	0.353084	0.599191
0.174325	0.18643	0.336587	0.385114
0.296146	0.169971	0.325592	0.143615
0.0725689	0.11367	0.32489	1,92E-01*
0.323355	0.0431148	0.270571	0.194823
0.321726	0.182378	0.127449	0.364812
0.277783	0.25086	0.28526	0.761819
0.280204	0.0864291	0.115384	0.166679
0.271245	0.229092	0.210578	0.708617
0.261874	0.254949	0.225103	0.954564
0.253997	0.10539	0.163851	0.0680839
0.101591	0.24487	0.213945	0.390537
0.202999	0.164432	0.240041	0.184108
0.16318	0.237134	0.218444	0.635632
0.219078	0.160516	0.232766	0.524855
0.209283	0.20637	0.175021	0.752389
0.20596	0.0584503	0.136011	0.0820531
0.193327	0.0884137	0.204477	0.0707073
0.0728928	0.202643	0.0815118	0.0167852*
0.0462907	0.0674394	0.159714	0.397252
0.0942825	0.156648	0.122102	0.712921
0.0550818	0.0352046	0.146227	0.21018
0.117221	0.127272	0.0682638	0.115435
0.119835	0.0520235	0.121123	0.282946
0.108406	0.0330372	0.0436706	0.0928629
0.107413	0.0714578	0.0522285	0.652627
0.105364	0.0824364	0.106215	0.773992
0.0924198	0.0727357	0.0487387	0.343754
0.0923889	0.0371552	0.068027	0.518618
0.0620101	0.0317226	0.0769948	0.0979874
0.0753524	0.0328151	0.0577597	0.301323
0.0749585	0.0510718	0.0719211	0.459391

Tabela 10. volume dos spots que tiveram *matching* em cada grupo diagnóstico (conclusão).

Controle (volume do spot)	Esquizofrenia (volume do spot)	Transtornos do humor (volume do spot)	<i>p</i>
0.074629	0.0268389	0.024209	0.0441707*
0.0550018	0.0360962	0.0709247	0.0209444*
0.0298834	0.0316527	0.0246846	0.659485
0.289085	0.0618452	-	0.0117734*
0.159872	-	0.196065	0.124187
0.15112	0.195759	-	0.0108386*
0.171258	-	0.0880846	1,08E-01*
0.0244469	0.151905	-	0.0389919*
0.128799	0.036513	-	7,63E+00*
0.0652991	0.0690364	-	0.132795
0.683195	-	-	0.157993
0.590405	-	-	7,76E+01*
0.589452	-	-	0.00337806*
	-	0.475399	8,56E-06*
0.371648	-	-	0.0323654*
0.29659	-	-	9,02E+00*
0.289885	-	-	0.00129303*
-	-	0.260265	0.0357028*
0.253023	-	-	0.0213623*
0.231939	-	-	7,37E-04*
0.219587	-	-	0.0398017*
0.188964	-	-	0.0330182*
0.130476	-	-	5,00E+00*
0.126525	-	-	2,12E+00*
0.122828	-	-	1,54E+01*
0.104352	-	-	0.0359307*
0.0901727	-	-	0.00999368*
0.0812413	-	-	0.00659564*
0.0802055	-	-	0.0031003*
0.0727418	-	-	0.00159082*
0.0676767	-	-	2,16E+01*
0.0634002	-	-	0.0012605*
0.062888	-	-	0.00212106*
0.0586888	-	-	1,38E+01*
0.0505518	-	-	7,57E-01*
0.0470328	-	-	0.00405593*
0.034362	-	-	0.0088213*
0.0250695	-	-	0.00116803*
0.0247769	-	-	8,75E+01*

APÊNDICE F. Lista das proteínas identificadas por *shotgun* diferentemente expressas nos 3 grupos diagnósticos

Tabela 11. Lista das proteínas identificadas por *shotgun* diferentemente expressas nos 3 grupos diagnósticos

Sigla	Nome da proteína
ABHD16A	<i>abhydrolase domain containing 16A</i>
ACLY	<i>ATP citrate lyase</i>
ACO1	<i>aconitase 1</i>
ACP1	<i>acid phosphatase 1, soluble</i>
ACTC1	<i>actin, alpha, cardiac muscle 1</i>
ACTR1A	<i>ARP1 actin-related protein 1 homolog A, centractin alpha (yeast)</i>
ACTR3	<i>ARP3 actin-related protein 3 homolog (yeast)</i>
AK1	<i>adenylate kinase 1</i>
AKR7A2	<i>aldo-keto reductase family 7, member A2 (aflatoxin aldehyde reductase)</i>
APEH	<i>N-acylaminoacyl-peptide hydrolase</i>
APOA4	<i>apolipoprotein A-IV</i>
ARF1	<i>ADP-ribosylation factor 1</i>
ARHGDIB	<i>Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) beta</i>
ARPC1B	<i>actin related protein 2/3 complex, subunit 1B, 41kDa</i>
ARPC2	<i>actin related protein 2/3 complex, subunit 2, 34kDa</i>
ASAP2	<i>ArfGAP with SH3 domain, ankyrin repeat and PH domain 2</i>
ATP6V1A	<i>ATPase, H⁺ transporting, lysosomal 70kDa, V1 subunit A</i>
C2orf88	<i>chromosome 2 open reading frame 88</i>
CDC37	<i>cell division cycle 37 homolog (S. cerevisiae)</i>
CLDN5	<i>claudin 5</i>
CNDP2	<i>CNDP dipeptidase 2 (metallopeptidase M20 family)</i>
CNST	<i>consortin, connexin sorting protein</i>
COPG1	<i>coatamer protein complex, subunit gamma 1</i>
CORO1C	<i>coronin, actin binding protein, 1C</i>
DARS	<i>aspartyl-tRNA synthetase</i>
DBI	<i>diazepam binding inhibitor</i>
DENR	<i>density-regulated protein</i>
DNAJA2	<i>DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily A, member 2</i>
ECH1	<i>enoyl CoA hydratase 1, peroxisomal</i>
EEF1B	<i>eukaryotic translation elongation factor 1 beta 2;</i>
EEF2	<i>eukaryotic translation elongation factor 2</i>
EHBP1L1	<i>EH domain binding protein 1-like 1</i>
EIF2S1	<i>eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 1 alpha, 35kDa</i>
EMD	<i>emerin</i>
ERAP1	<i>endoplasmic reticulum aminopeptidase 1</i>
FGB	<i>fibrinogen beta chain</i>
FHOD1	<i>formin homology 2 domain containing 1</i>
FKBP2	<i>FK506 binding protein 2, 13kDa</i>
FLOT1	<i>flotillin 1 (427 aa)</i>

Sigla	Nome da proteína
GIPC3	<i>GIPC PDZ domain containing family, member 3</i>
GLOD4	<i>glyoxalase domain containing 4</i>
GMFG	<i>glia maturation factor, gamma</i>
GNA12	<i>guanine nucleotide binding protein alpha 12</i>
GNA14	<i>guanine nucleotide binding protein alpha 14</i>
GNAI3	<i>guanine nucleotide binding protein alpha inhibiting activity polypeptide 3</i>
GP1BB	<i>glycoprotein Ib (platelet), beta polypeptide</i>
HIST1H2AH	<i>histone cluster 1, H2ah;</i>
HIST1H4H	<i>histone cluster 1, H4h</i>
ILK	<i>integrin-linked kinase</i>
ISOC1	<i>isochorismatase domain containing 1</i>
ITGB1	<i>integrin, beta 1</i>
LCP1	<i>lymphocyte cytosolic protein 1 (L-plastin)</i>
LGALS1	<i>lectin, galactoside-binding, soluble, 1</i>
LRRC59	<i>leucine rich repeat containing 59</i>
LY6G6F	<i>lymphocyte antigen 6 complex, locus G6F</i>
MANF	<i>mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor</i>
MAP4K4	<i>mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4</i>
MAPK11	<i>mitogen-activated protein kinase 11</i>
MOB1B	<i>MOB kinase activator 1B</i>
MSN	<i>moesin</i>
MYH14	<i>myosin, heavy chain 14, non-muscle</i>
MYH9	<i>myosin, heavy chain 9, non-muscle;</i>
NAPRT1	<i>nicotinate phosphoribosyltransferase domain containing 1</i>
NCALD	<i>neurocalcin delta</i>
NCK2	<i>NCK adaptor protein 2</i>
NCKAP1	<i>NCK-associated protein 1</i>
NSFL1C	<i>NSFL1 (p97) cofactor (p47)</i>
PA2G4	<i>proliferation-associated 2G4, 38kDa</i>
PCBP1	<i>poly(rC) binding protein 1</i>
PCYOX1L	<i>prenylcysteine oxidase 1 like</i>
PDCD10	<i>programmed cell death 10</i>
PDIA3	<i>protein disulfide isomerase family A, member 3</i>
PEA15	<i>phosphoprotein enriched in astrocytes 15</i>
PEBP1	<i>phosphatidylethanolamine binding protein 1</i>
PGK2	<i>phosphoglycerate kinase 2</i>
PLEK	<i>pleckstrin; Major protein kinase C substrate of platelets</i>
PLG	<i>plasminogen</i>
PLS3	<i>plastin 3</i>
PPP1R14A	<i>protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 14A</i>
PRDX2	<i>peroxiredoxin 2</i>
PRDX4	<i>peroxiredoxin 4</i>
PRDX5	<i>peroxiredoxin 5</i>
PROTEE	<i>POTE ankyrin domain family member E</i>

Sigla	Nome da proteína
POTEJ	<i>POTE ankyrin domain family member J</i>
PSMA5	<i>proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type, 5</i>
PSMA7	<i>proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type, 7</i>
PSMB2	<i>proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 2</i>
RAB6A	<i>RAB6A, member RAS oncogene family</i>
RAB6B	<i>RAB6B, member RAS oncogene family</i>
RAB8G	<i>Rab-family small GTPase Rab8G</i>
RALA	<i>v-ral simian leukemia viral oncogene homolog A (ras related)</i>
RALB	<i>v-ral simian leukemia viral oncogene homolog B (ras related)</i>
RDX	<i>radixin</i>
RHOB	<i>ras homolog family member B</i>
RPN1	<i>ribophorin I</i>
RUFY1	<i>RUN and FYVE domain containing 1</i>
SCCPDH	<i>saccharopine dehydrogenase (putative)</i>
SERPINA1	<i>serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 1</i>
SFXN1	<i>sideroflexin 1</i>
SH3BGRL2	<i>SH3 domain binding glutamic acid-rich protein like 2</i>
SH3BGRL3	<i>SH3 domain binding glutamic acid-rich protein like 3</i>
SKP2	<i>S-phase kinase-associated protein 2, E3 ubiquitin protein ligase</i>
SNAP29	<i>synaptosomal-associated protein, 29kDa</i>
STAT5B	<i>signal transducer and activator of transcription 5B</i>
SYNE1	<i>spectrin repeat containing, nuclear envelope 1</i>
THBS2	<i>thrombospondin 2;</i>
TLN1	<i>talin 1</i>
TOLLIP	<i>toll interacting protein</i>
TUBB1	<i>tubulin, beta 1 class VI</i>
TUBB4A	<i>tubulin, beta 4A class Iva</i>
TUFM	<i>Tu translation elongation factor, mitochondrial</i>
UBA7	<i>ubiquitin-like modifier activating enzyme 7</i>
UBE2K	<i>ubiquitin-conjugating enzyme E2K</i>
UQCRFS1	<i>ubiquinol-cytochrome c reductase, Rieske iron-sulfur polypeptide 1</i>
UROD	<i>uroporphyrinogen decarboxylase</i>
VAPB	<i>VAMP (vesicle-associated membrane protein)-associated protein B and C</i>
VPS37B	<i>vacuolar protein sorting 37 homolog B (S. cerevisiae)</i>
VTN	<i>vitronectin</i>
WARS	<i>tryptophanyl-tRNA synthetase</i>

APÊNDICE G. Proteínas identificadas por *shotgun* já relacionadas às vias celulares da ANXA3.

Tabela 12. Proteínas identificadas por *shotgun* já relacionadas às vias celulares da ANXA3.

Número de identificação Uniprot	Descrição	PM (kDa)	Área Controles	Área psicóticos não afetivos	Área psicóticos afetivos
P12429	<i>Annexin A3</i>	36,4	$1,69 \times 10^7$	$9,68 \times 10^6$	$1,36 \times 10^7$
P08758	<i>Annexin A5</i>	35,9	$3,22 \times 10^7$	$2,48 \times 10^7$	$4,50 \times 10^7$
B3KRQ1	<i>Annexin</i>	20,9	$7,51 \times 10^5$	$4,70 \times 10^5$	
B4DPJ2	<i>Annexin</i>	45,6	$2,14 \times 10^7$	$1,76 \times 10^7$	$2,44 \times 10^7$
B4DT77	<i>Annexin</i>	37,8	$2,31 \times 10^7$	$1,85 \times 10^7$	$3,38 \times 10^7$
Q9Y263	<i>Phospholipase A-2-activating protein</i>	87,1	$1,63 \times 10^6$	$1,07 \times 10^6$	$1,20 \times 10^6$
B4E3H3	<i>Phosphoinositide phospholipase C</i>	132,7	$3,54 \times 10^5$		$6,11 \times 10^5$
Q86XP0-2	<i>Isoform 2 of Cytosolic phospholipase A2 delta O</i>	80,9	$7,55 \times 10^5$		
P17252	<i>Protein kinase C alpha type</i>	76,7	$1,45 \times 10^7$	$1,65 \times 10^7$	
Q05655	<i>Protein kinase C delta type</i>	77,5	$1,09 \times 10^7$		$7,10 \times 10^6$
Q8WYJ5	<i>Protein kinase C inhibitor-2</i>	13,9	$2,08 \times 10^7$	$2,10 \times 10^7$	$1,92 \times 10^7$
F2Z2H9	<i>Protein kinase C zeta type (Fragment)</i>	11,7	$1,18 \times 10^7$		
B4DFV1	<i>Protein kinase C</i>	69,1		$8,09 \times 10^6$	
F8W1I8	<i>Protein kinase C-binding protein NELL2 (Fragment)</i>	2,5		$9,54 \times 10^5$	
Q5T3N0	<i>Annexin (Fragment)</i>	12,6			$3,54 \times 10^5$
Q59FI5	<i>Protein kinase C, alpha variant (Fragment)</i>	52,9			$2,66 \times 10^7$

Legenda: PM = peso molecular; kDa: quilo Daltons.

ANEXOS

ANEXO A. Modelo do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME: _____

DOCUMENTO DE IDENTIDADE: _____ SEXO: M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO: ____/____/____

ENDEREÇO: _____ Nº: _____ APTO: _____

BAIRRO: _____ CIDADE: _____

CEP: _____ TELEFONE: DDD (____) _____

2. RESPONSÁVEL LEGAL: _____

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.): _____

DOCUMENTO DE IDENTIDADE: _____

SEXO: M ☐ F ☐ DATA NASCIMENTO: ____/____/____

ENDEREÇO: _____ Nº: _____

APTO: _____ BAIRRO: _____

CIDADE: _____ CEP: _____

TELEFONE: DDD (____) _____ CEL: _____

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: **Proteomica da esquizofrenia: busca por biomarcadores em plaquetas**

PESQUISADOR: Prof. Dr. Wagner Farid Gattaz

CARGO/FUNÇÃO: Professor Titular/Psiquiatria

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 25956

UNIDADE DO HCFMUSP: Laboratório de Neurociências (LIM-27), Departamento de Psiquiatria.

2. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO ☒ RISCO MÉDIO ☐
 RISCO BAIXO ☐ RISCO MAIOR ☐

3. DURAÇÃO DA PESQUISA: 48 meses

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

1- Desenho e objetivos do estudo: O objetivo deste estudo é caracterizar o perfil fosfolipídico de pacientes com doenças neuropsiquiátricas (esquizofrenia, doença de Alzheimer e transtorno bipolar) e controles saudáveis. Estas informações nos ajudarão a compreender melhor as causas destas doenças e, assim, contribuirão para melhorarmos os cuidados as pessoas portadoras destes transtornos, incluindo o desenvolvimento de novos tratamentos no futuro.

2- Descrição dos procedimentos que serão realizados, com seus propósitos e identificação dos que forem experimentais e não rotineiros: Os participantes da pesquisa realizarão entrevista médica com profissional treinado, visando confirmação diagnóstica e avaliação de gravidade clínica nos pacientes, e a exclusão de sintomas psiquiátricos e outras patologias médicas nos voluntários controles. Além disso, coleta de sangue, para determinação de fosfolípidos plasmáticos. Para isto, serão coletados 10 mL de sangue por profissional treinado.

3- Desconfortos e riscos esperados: As entrevistas serão realizadas por profissionais de saúde treinados para a aplicação das mesmas. A coleta de sangue pode produzir desconforto transitório no local da picada. O risco devido à participação no estudo é mínimo.

4- Potenciais benefícios para o participante: Os participantes poderão receber orientações sobre acesso ao tratamento na rede de saúde, e os resultados dos exames realizados poderão auxiliar seu médico na condução do caso.

5- Garantia de acesso: Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Dr. Wagner Farid Gattaz, que pode ser encontrado no endereço Rua Dr. Ovídio Pires de Campos, 785, Instituto de Psiquiatria, 1º andar, CEP 05403-010, São Paulo (SP), Telefone (11) 2661-7283. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – Prédio da Administração, 5º andar – Tel: 2661-7585 ou 2661-6442 (ramais 16 e 17), e-mail: cappelq.adm@hc.fm.usp.br.

6- É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;

7- Direito de confidencialidade: As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente.

8- Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;

9- Despesas e compensações: Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

10- Compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo "Proteomica da esquizofrenia: busca por biomarcadores em plaquetas".

Eu discuti com o Dr. Wagner Farid Gattaz sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Data: ____/____/____

Assinatura do paciente/representante legal

Data: ____/____/____

Assinatura da testemunha para casos de pacientes menores de 18 anos, anbetabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do estudo)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Data: ____/____/____

Assinatura do responsável pelo estudo

ANEXO B. Aprovacao do comite de etica

Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

Recebido: 27/11/13
Departamento de Psiquiatria da FM

PROJETO DE PESQUISA

Título: PROTEÔMICA DA ESQUIZOFRENIA: BUSCA POR BIOMARCADORES EM PLAQUETAS
Pesquisador Responsável: Wagner Farid Gattaz **Versão:** 1
Pesquisador Executante: Helena Passarelli Giroud Joaquim **CAAE:** 21300213.5.0000.0068
Finalidade Acadêmica: Doutorado
Orientador: Wagner Farid Gattaz
Instituição: HCFMUSP
Departamento: PSIQUIATRIA

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Registro on-line: 11328

Número do Parecer: 469.844

Data da Relatoria: 27/11/2013

Apresentação do Projeto: Este estudo visa traçar um perfil proteico de plaquetas de pacientes "drug-naïve" com diagnóstico de esquizofrenia, comparando-os com pacientes "drug-naïve" com psicose afetiva e controles saudáveis. Para isso, a proteômica é uma boa metodologia considerando que proporciona um perfil completo das proteínas em determinado tempo e condição de determinado organismo.

Objetivo da Pesquisa: Identificar biomarcadores moleculares para esquizofrenia.

Avaliação dos Riscos e Benefícios: A médio prazo, os marcadores moleculares poderão auxiliar tanto no diagnóstico da doença, bem como tratamento e monitorização dos pacientes. Não há riscos para os pacientes.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa: A pesquisa é inédita, tem interesse e tem base na literatura sobre o assunto. O grupo proponente apresenta todas as condições de levar adiante o protocolo proposto.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória: O Termo de Consentimento está adequado e contempla todos os aspectos a serem considerados.

Recomendações: Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações: O protocolo pode ser aprovado pela CAPPesq.

Situação do Parecer: Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP: Não

Considerações Finais a critério do CEP: Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 – cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

São Paulo, 28 de Novembro de 2013

Prof. Dr. Luiz Eugênio Garcez Leme
Coordenador
Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa-CAPPesq

Rua Dr. Ovídio Pires de Campos, 225 - Prédio da Administração - 5º andar
CEP 05403-010 - São Paulo - SP.tnb
55 11 2661-7585 - 55 11 2661-6442 ramais: 16, 17, 18 | marcia.carvalho@hc.fm.usp.br