

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Faculdade de Medicina
Programa de pós graduação em Medicina Molecular

REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS À MATRIZ
EXTRACELULAR EM FIBROBLASTOS DÉRMICOS DE PACIENTES
COM ESQUIZOFRENIA E TRANSTORNO BIPOLAR

Luíza da Conceição Amorim Martins

Belo Horizonte
2015

Luíza da Conceição Amorim Martins

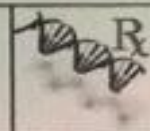
REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS À MATRIZ
EXTRACELULAR EM FIBROBLASTOS DÉRMICOS DE PACIENTES
COM ESQUIZOFRENIA

Tese apresentada ao programa
de pós graduação em Medicina
Molecular da Universidade
Federal de Minas Gerais como
requisito parcial à obtenção do
Título de Doutor em Medicina
Molecular.

Orientador: Marco Aurélio
Romano Silva

Co-orientador: Rodrigo Nicolato

Belo Horizonte
2015



ATA DA DEFESA DE TESE DA ALUNA LUIZA DA CONCEIÇÃO AMORIM MARTINS - 2011682465

Realizou-se, no dia 10 de fevereiro de 2015, às 09:30 horas, Faculdade de Medicina, sala 029, da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de tese, intitulada *REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS À MATRIZ EXTRACELULAR EM FIBROBLASTOS DÉRMICOS DE PACIENTES COM ESQUIZOFRENIA E TRANSTORNO BIPOLAR*, apresentada por LUIZA DA CONCEIÇÃO AMORIM MARTINS, número de registro 2011682465, graduada no curso de BIOMEDICINA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em MEDICINA MOLECULAR, à seguinte Comissão Examinadora: Prof. Marco Aurelio Romano Silva - Orientador (UFMG), Prof. Rodrigo Nicolato (UFMG), Prof.^a Tatiana Tscherbakowski de Guimarães Mourão Valentim Lourenço (UFMG), Prof. Bruno Rezende de Souza (UFMG), Prof. Célio José de Castro Júnior (Instituto de Ensino e Pesquisa da Santa Casa de BH), Prof(a). Nancy Scardua Binda (Instituto de Ensino e Pesquisa da Santa Casa de BH).

A Comissão considerou a tese:

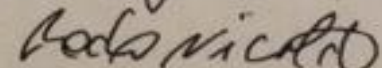
☒ Aprovada

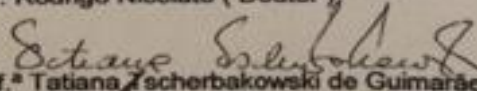
☐ Reprovada

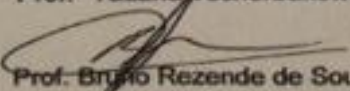
Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada pelos membros da Comissão.

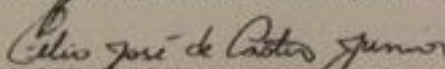
Belo Horizonte, 10 de fevereiro de 2015.

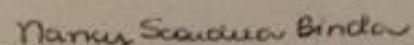

Prof. Marco Aurelio Romano Silva (Doutor)

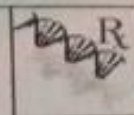

Prof. Rodrigo Nicolato (Doutor)


Prof.^a Tatiana Tscherbakowski de Guimarães Mourão Valentim Lourenço (Doutora)


Prof. Bruno Rezende de Souza (Doutor)


Prof. Célio José de Castro Júnior (Doutor)


Prof(a). Nancy Scardua Binda (Doutora)



Declaração

Declaramos, para os devidos fins, que os professores: Prof. Marco Aurelio Romano Silva - Orientador (UFMG), Prof. Rodrigo Nicolato (UFMG), Prof. Bruno Rezende de Souza (UFMG), Prof.^a Tatiana Tscherbakowski de Guimarães Mourão Valentim Lourenço, Prof. Célio José de Castro Júnior (Instituto de Ensino e Pesquisa da Santa Casa de BH), Prof(a). Nancy Scardua Binda (Instituto de Ensino e Pesquisa da Santa Casa de BH) – membros titulares e Prof. Humberto Correa da Silva Filho (UFMG) e Katia Daniela da Silveira – membros suplentes, participaram da banca de defesa da tese de **LUIZA DA CONCEIÇÃO AMORIM MARTINS**, número de registro 2011682465, aluna do Programa de Pós-Graduação em MEDICINA MOLECULAR da Universidade Federal de Minas Gerais, intitulada *REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS À MATRIZ EXTRACELULAR EM FIBROBLASTOS DÉRMICOS DE PACIENTES COM ESQUIZOFRENIA E TRANSTORNO BIPOLAR*, defendida em 10/02/2015.

Belo Horizonte, 10 de fevereiro de 2015.

Prof. Luiz Armando Cunha De Marco
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em
Medicina Molecular - Faculdade de Medicina UFMG

Prof(a). Luiz Armando Cunha De Marco
Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação
em MEDICINA MOLECULAR

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação aos meus queridos pais e à minha irmã: meus verdadeiros mestres, modelos reais de perseverança, parceria, dedicação, amor, paciência e ética.

AGRADECIMENTOS

Muitas pessoas contribuíram para a realização deste trabalho. Agradeço imensamente a todos!

Agradeço ao Pai, pela PRESENÇA!

Agradeço aos meus familiares, pai, mãe, irmã e ao meu cunhado Renan pela paciência, força e amor incondicional.

Agradeço a minha tinha do coração, São. Por todas as orientações e pelo carinho sempre! Meu norteador acadêmico!

Agradeço aos meus queridos colegas do laboratório de Neurociência. Dani, Erika, Vitor, Magno, Patricia, Antônio, Cinthia, Danielle, Isabela, Jonas, Paulo, Débora, Flávia, Taynná, Nathalia, Monique pelo apoio e companheirismo.

Agradeço a minha querida Elizete e Soraia, pela amizade verdadeira, pelo carinho e por facilitar a caminhada nos dias duros de trabalho.

Agradeço aos meus colegas do laboratório LUNEP - Lausanne. Margot, pelo total apoio, Aline, Dominique, Daniella, Basilio, Hélène, Carina, Adeline, Pascal, e Jan. O apoio, a amizade e o carinho de vocês foi fundamental para a realização deste trabalho. Vocês foram minha família e meu suporte enquanto estive longe do Brasil.

Agradeço a profª Debora, pelo carinho.

Agradeço a Kim e ao Michel pela receptividade e apoio científico.

Agradeço ao Rodrigo Nicolato, meu co-amigo! Sorte a minha de ter um co-orientador tão querido e sempre presente!

Agradeço ao meu orientador Marquinho, pela confiança e total suporte na realização deste trabalho.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADAMTS1 – a disintegrin metalloproteinase thrombospondin type 1

APS – persulfato de amônia

ATP - adenosina trifosfato

BCA - biculina

BDNF – fator de transcrição derivado do cérebro

CSPG – chondroitin sulfate proteoglycans

cDNA – ácido desoxirribonucleico complementar

COEP – comitê de ética e pesquisa

DEPC – dietil pirocarbonato

DMEM – Dulbecco's modified eagle's medium

DMSO – dimetil sulfoxido

DNA – ácido desoxirribonucleico

dNTP – desoxirribonucleotídeo fosfatado

DSM-IV – diagnostic and statistical manual of mental disorders IV

DTT - ditioneitol

ECM – matriz extracelular

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

EROs– espécies reativas de oxigênio

ERNS- espécies reativas de nitrogênio

FC – fold change

GAG – guanina – adenosina – guanina

GALNAC – N- acetil- galactosamina

GCL – glutamato cisteína ligase

GCLC – glutamato cisteína ligase – subunidade catalítica

GCLM – glutamato cisteína ligase – subunidade modulatória

GLCA – ácido glucorônico

GS – glutathione sintetase

GSH – glutathione

GSSH – glutathione dissulfeto

HDRS – Hamilton depression rating scale

H₂O₂ – peróxido de hidrogênio

HSPG – heparan sulfate proteoglycans

Ig - imunoglobulina

MgCl₂ – cloreto de magnésio

MMPs – metaloproteinases de matriz

MT3-MMP – metaloproteinase de matriz transmembrana tipo 3

NaCl – cloreto de sódio

NaF – fluoreto de sódio

NO – óxido nítrico

(NTC-) - no template control

O₂ –superóxido

OH – radical hidroxila

ONOO –peroxinitrito

PANSS – positive and negative syndrome scale

PBS – phosphate buffer solution

PCR – polimerase chain reaction

PMSF – fluoreto fenilmetilsulfonil

PNN – rede perineuronal

PV – parvalbumin interneurons

PVDV - Polivinidileno

qPCR – polymerase chain reaction quantitative

RNA_m – ácido ribonucleico mensageiro

(RT-) – no reverse transcriptase

RTPCR – reverse transcription polymerase chain reaction

SDS – sódio dodecil sulfato

SEM – erro padrão da média

SFB – soro fetal bovino

SNC –Sistema nervoso central

SULF – sulfatase

TA – temperatura ambiente

tBHQ – tert butilhidroquinona

TBS – tween buffer solution

TEMED - tetrametiletilenediamina

TNR - trinucleotide repeat

TRIS-HCL – hidroximetil aminometano clorídrico

UNG – uracil N-glicosilase

Wnt – wingless related integration

YMRS – Young Mania rating scale

18S – subunidade 18

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Localização subcelular das proteínas codificadas por genes que estão diferentemente regulados entre pacientes e controles. ..	43
Tabela 2: Lista de genes selecionados para validação.....	44
Tabela 3: Lista de sondas TaqMan® utilizadas para a validação dos genes selecionados.....	55
Tabela 4: Dados sócio-demográficos (esquizofrenia)	62
Tabela 5: Dados sócio-demográficos (transtorno bipolar)	72

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Síntese de GSH.....	23
Figura 2: Hipótese do estresse oxidativo na fisiopatologia da esquizofrenia.	26
Figura 3: Estrutura e componentes da matriz extracelular	30
Figura 4: Desenho esquemático da estrutura do CSPG.....	31
Figura 5: Desenho esquemático da construção do experimento de microarranjo.....	40
Figura 6: Esquema ilustrativo da seleção de genes a partir do total de sondas do microarray.	42
Figura 7: Níveis de expressão relativa de MMP16 e GALNT6 em pacientes com esquizofrenia e controles saudáveis.....	64
Figura 8: Níveis de expressão relativa de SULF1, ADAMTS1 e ACSL1 em pacientes com esquizofrenia e controles saudáveis.....	66
Figura 9: Níveis de MT3-MMP inativa ligada à membrana e MT3-MMP solúvel em amostras de fibroblastos de pacientes com esquizofrenia e controles saudáveis.	68
Figura 10: Níveis de Galnac T6 em amostras de fibroblastos de pacientes com esquizofrenia e controles saudáveis.....	70
Figura 11: Níveis de expressão relativa de MMP16 e GALNT6 em amostras de fibroblastos de pacientes bipolares e controles saudáveis.....	74
Figura 12: Níveis de expressão relativa de SULF1, ADAMTS1 e ACSL1 em pacientes com esquizofrenia e controles saudáveis.....	76

RESUMO

Transtornos psiquiátricos como a esquizofrenia e o transtorno afetivo bipolar compartilham várias características em comum, como genes de risco, alterações neurofisiológicas, desregulação do sistema de defesa antioxidante e déficit de glutathione (GSH) no córtex pré-frontal. Alterações nos componentes da matriz extracelular (ECM) do sistema nervoso central (SNC) também são relatadas nas doenças neurológicas e vem sendo frequentemente discutidas nos transtornos psiquiátricos. A ECM do SNC possui importantes funções como manutenção das sinapses e controle da plasticidade neuronal, proteção dos neurônios contra estresse oxidativo, sinalização celular e reservatório de fatores de crescimento. No entanto, após sucessivas lesões, estresse ou doença, a capacidade de remodelação exercida pela ECM torna-se comprometida prejudicando a comunicação neuronal e a capacidade regenerativa da própria ECM. O estresse oxidativo vem sendo apontado como um possível causador das anomalias observadas na ECM na esquizofrenia. A proposta do presente estudo foi validar alguns genes relacionados à matriz extracelular que estavam diferentemente expressos entre pacientes com esquizofrenia e controles observados no estudo de microarranjo, previamente realizado pelo nosso grupo. Além disso, perguntamos como o estresse oxidativo pode regular alguns genes na esquizofrenia e se há alguma similaridade na regulação desses genes no transtorno bipolar. Para isto, utilizamos cultura de fibroblastos dérmicos de pacientes com esquizofrenia residual e transtorno afetivo bipolar eutímicos. As culturas foram tratadas com pró-oxidante tBHQ para simular um estresse oxidativo e após o tratamento extraímos o RNAm para avaliarmos a expressão gênica de cinco genes:

MMP16, GALNT6, SULF1, ADAMTS1 e ACSL1. Não foi possível validar a diferença de expressão dos níveis dos cinco genes selecionados em pacientes com esquizofrenia comparados aos controles e pacientes bipolares comparados com seus respectivos controles. Porém, observou-se que o estresse oxidativo foi capaz de regular os níveis de expressão dos cinco genes selecionados em pacientes com esquizofrenia ou transtorno bipolar. A análise protéica revelou que os níveis da enzima Galnac transferase 6 estão diminuídos em pacientes com esquizofrenia, sugerindo uma diminuição da glicosilação dos componentes da ECM, o que pode conferir perda da estabilidade da matriz. Já os níveis do gene ADAMTS1 possuem uma tendência de aumento nos pacientes bipolares, sugerindo também um comprometimento da integridade dos componentes da ECM. Em geral, os resultados da expressão gênica nas amostras dos pacientes com esquizofrenia se assemelham com os resultados obtidos das amostras de pacientes bipolares. O estresse oxidativo altera a regulação de genes associados à matriz extracelular na esquizofrenia e no transtorno bipolar. Estudos funcionais relacionados as enzimas codificadas pelos genes GALNT6 e ADAMTS1 são necessários para o melhor entendimento da relação de ambas na fisiopatologia dos transtornos psiquiátricos.

ABSTRACT

Psychiatric disorders such schizophrenia and bipolar disorder share important aspects like common gene risk, neurophysiologic deficit, defense antioxidant system deregulation and prefrontal cortex glutathione deficit. Extracellular matrix (ECM) components anomalies from central nervous system (CNS) are observed in neurological disorders and have been discussed in psychiatric disorders. The ECM from SNC has important functions such synaptic maintenance, control of neuronal plasticity, protection of neurons against oxidative stress, cellular signaling and growth factors reservoir. However, after multiple injuries, stress or disease, the remodeling capacity exerted by ECM becomes compromised, leading to failures in the neuron communication and ECM regenerative capacity. Oxidative stress have been suggested as causes for anomalies seen in schizophrenia ECM. The purpose of this study was validate some genes related to extracellular matrix which were differentially expressed between schizophrenic patients and controls observed in our previous study using microarray. Furthermore, we asked how oxidative stress can regulate these genes in schizophrenia and if this regulation is it similar with bipolar disorder. For this, we used skin fibroblasts culture from residual schizophrenic and bipolar euthymic patients. The culture were treated with tBHQ, a compound which induces oxidative stress, and after the treatment we extracted the mRNA for genetic expression of MMP16, GALNT6, SULF1, ADAMTS1 and ACSL1. We can not validate the expression differences of five genes selected between schizophrenic patients and controls and bipolar patients compared to respective controls. But, it was observed that the five

genes selected are regulated by oxidative stress in schizophrenic and bipolar patients. Besides, the protein analysis revealed galnac transferase 6 levels are decreased in schizophrenic patients, suggesting a glycosylation reduced of ECM components, which can be compromise the matrix stability. ADAMTS1 gene levels have a tendency of increase in bipolar patients, also suggesting a impairment in integrity ECM componentes. In general, the data from gene expression of schizophrenic and bipolar patients are similar. Oxidative stress alter the regulation of gene extracelular matrix associated in schizophrenia and bipolar disorder. Functional studies related to enzymes codified by GALNT6 and ADAMTS1 are necessary to better understand the relation of both in schizophrenia and bipolar disorder pathophysiology.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1. Esquizofrenia	19
1.2. Transtorno afetivo bipolar	20
1.3. Regulação redox	21
1.4. Estresse oxidativo na esquizofrenia e no transtorno bipolar	23
1.5. Componentes afetados pelo estresse oxidativo	27
1.5.1. Interneurônios gabaérgicos parvalbumina-positivos (PV)	27
1.5.2. PNN e matriz extracelular	27
1.6. Cultura de fibroblastos – modelo <i>in vitro</i> para pesquisa de transtornos psiquiátricos	33
1.7. Justificativa	34
2. OBJETIVOS	35
3. MATERIAIS E MÉTODOS	37
3.1. Descrição da população estudada	38
3.1.1. Critérios de inclusão e exclusão	38
3.2. Experimento de microarranjo	39
3.4. Cultura de fibroblastos	46
3.4.1. Cultivo a partir da biópsia (amostras de pacientes bipolares e controles)	46
3.4.2. Congelamento das amostras	47
3.4.3. Descongelamento das amostras de pacientes esquizofrênicos e controles	48
3.4.4. Subcultivo	48
3.4.5. Tratamento com pró-oxidante ou veículo	49
3.4.6. Congelamento do pellet seco	50
3.5. Análise da expressão genética	50
3.5.1. Extração de RNA	51
3.5.2. Quantificação de RNA total	52
3.5.3. Reação da transcriptase reversa (síntese de cDNA)	52
3.5.4. qPCR	54
3.6. Western blot	55
3.6.1. Extração de proteínas totais de células	55
3.6.2. Quantificação de proteínas totais	56
3.6.3. SDS PAGE	57
3.6.4. Imunodeteção	57
3.7. Análise estatística	59

4. RESULTADOS	60
4.1. Parte I.....	61
4.1.1. Dados sócio-demográficos.....	62
4.1.2. Níveis de expressão de MMP16 e GALNT6 não está alterada em pacientes comparado aos controles em ambas condições de tratamento.	63
4.1.3. Níveis de expressão de SULF1, ADAMTS1 e ACSL1 não estão alterados em pacientes comparados aos controles em ambas condições de tratamento.....	65
4.1.4. Níveis de expressão da proteína MT3-MMP inativa e solúvel não estão alteradas em pacientes com esquizofrenia comparados aos controles saudáveis.....	67
4.1.5. Níveis de Galnac T6 estão alterados em pacientes com esquizofrenia comparados aos controles saudáveis.....	69
4.2. Parte II	71
4.2.1. Dados sócio-demográficos.....	72
4.2.2. Níveis de MMP16 e GALNT6 não estão alterados em pacientes comparados aos controles em ambas condições de tratamento.	73
4.2.3. Níveis de expressão de SULF1, ADAMTS1 e ACSL1 não estão alterados em pacientes bipolares comparados aos controles em ambas condições de tratamento.....	75
5. DISCUSSÃO	77
5.1. Fibroblastos de pacientes com esquizofrenia.	78
5.2. Fibroblastos de pacientes com transtorno bipolar.	85
6. CONCLUSÃO	90
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92

1. INTRODUÇÃO

1.1. Esquizofrenia

A esquizofrenia é um transtorno psicótico grave (ou um grupo de transtornos) cujo desenvolvimento da doença é progressivo e ocorre frequentemente na fase mais tardia da adolescência e no início da fase adulta (TAMMINGA and HOLCOMB, 2005). Sua prevalência é de 1% na população geral, mas essa estimativa pode variar de acordo com a metodologia utilizada nos diferentes estudos (FREEDMAN, 2003). A etiologia da esquizofrenia permanece desconhecida. Embora tenha ocorrido inúmeras tentativas nos anos recentes de identificar teste de laboratório ou marcadores biológicos de utilidade clínica que pudessem confirmar a presença do transtorno, o diagnóstico continua a se basear em critérios essencialmente clínicos (Nardi, Quevedo, & Silva, 2015). O atual tratamento antipsicótico é efetivo para os sintomas positivos (delírios, alucinações e pensamento desorganizado), porém possuem efeitos colaterais significantes e são, na sua maioria, ineficazes para os sintomas negativos (habilidades sociais, fala e embotamento afetivo), sintomas cognitivos (atenção, memória e função executiva), e sintomas gerais inespecíficos (ansiedade, culpa, tensão) (DO et al., 2009). Torna-se, portanto, necessário o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas que sejam efetivas para os sintomas negativos e cognitivos e com o mínimo de sintomas colaterais. A compreensão da fisiopatologia da esquizofrenia poderá auxiliar na identificação de novos alvos de tratamento ou ainda, possibilitar o diagnóstico precoce (DO et al., 2009).

1.2. Transtorno afetivo bipolar

O transtorno afetivo bipolar é uma doença crônica que afeta cerca de 1 - 3% da população mundial (BELMAKER; BERSUDSKY, 2004; KUPFER, 2005; MERIKANGAS et al., 2007). A principal característica desse transtorno é a instabilidade de diversas funções psíquicas e físicas, com destaque para o humor, variando do polo depressivo ao eufórico (maníaco). Os ritmos biológicos também podem ser afetados, causando alterações do ciclo de sono-vigília e do metabolismo, com importantes alterações de peso, psicomotricidade, velocidade de pensamento, cognição e impulsividade (GHAEMI and DALLEY, 2014). O transtorno afetivo bipolar em geral, se manifesta inicialmente em adolescentes e adultos jovens, assumindo um padrão de alterações episódicas e recorrentes do humor com períodos assintomáticos ao longo de toda a vida (GHAEMI and DALLEY, 2014). O tratamento para o transtorno bipolar inclui estabilizadores do humor, como lítio (padrão ouro) e valproato. Porém, pacientes bipolares fazem uso constante de outras medicações como antidepressivos, ansiolíticos e antipsicóticos (MUZINA and CALABRESE, 2005).

A hipótese atual para a etiologia do transtorno afetivo bipolar e também da esquizofrenia consiste em variações em múltiplos genes combinados a estressores ambientais podem influenciar, de forma precoce ou tardia, o desenvolvimento cerebral (BRIETZKE et al., 2012; HARRISON; WEINBERGER, 2005; LIN et al., 2012). Vários estudos sugerem que o estresse oxidativo pode ser uma hipótese bastante atrativa para explicar, pelo menos em partes, a fisiopatologia desses transtornos (ANDREAZZA et al.,

2007; DO et al., 2009; KRAFTSIK et al., 2007, 2011; KULOGLU et al., 2002; RAFFA et al., 2012; TOSIC et al., 2006; YAO; LEONARD; REDDY, 2006).

1.3. Regulação redox

O estresse oxidativo ocorre quando os mecanismos de defesa antioxidantes celulares falham em controlar a produção endógena de EROs (espécies reativas de oxigênio) e ERNs (espécies reativas de nitrogênio) geradas através do metabolismo normal ou da exposição a pró-oxidantes ambientais (KOHEN et al., 2002; BERG et al., 2004). Os radicais livres mais importantes nos humanos são: peróxido de hidrogênio (H_2O_2), superóxido (O_2^-) e radical hidroxila (OH), espécies reativas de nitrogênio incluem óxido nítrico (NO) e peroxinitrito ($ONOO^-$). O estado redox celular está envolvido na regulação de vários fatores de transcrição e níveis apropriados de EROs e ERNs são necessários para o correto funcionamento fisiológico dos organismos (KEMP et al., 2008; JONES e GO, 2010). No entanto, quantidades excessivas de EROs pode ter efeitos deletérios incluindo modificações em macromoléculas como ácidos nucleicos, proteínas e lipídios (KOHEN; NYSKA, 2002). Para equilibrar a produção excessiva de EROs, o organismo possui sistemas de defesa antioxidantes que consistem de enzimas como a superóxido dismutase, glutathione peroxidase e catalase. Além desses sistemas enzimáticos, o organismo conta com antioxidantes não enzimáticos, incluindo a glutathione (GSH), ácido ascórbico (vitamina C), α -tocoferol (vitamina E), carotenóides e flavonóides (NORDBERG e ARNÉR, 2001). Os sistemas antioxidantes podem agir de várias formas, incluindo a remoção de EROs/ERNs (OZTURK et al., 2005), inibição da formação de /ERNs e inibição

da ligação de íons metálicos, como cobre, necessários para catalisar a formação de ROS/RNS (MEISTER, 1988). Já a enzima glutathione peroxidase converte peróxidos e radicais hidroxilas em formas não-tóxicas, frequentemente acompanhada da oxidação da glutathione reduzida (GSH) a sua forma oxidada, glutathione disulfeto (GSSH) (LU, 2009). A glutathione redutase, por sua vez, recicla GSSH em GSH. A enzima catalase e a superóxido dismutase agem em conjunto com a glutathione peroxidase constituindo a principal defesa antioxidante enzimática contra radicais superóxidos (DEKOSKY et al., 2004; DRINGEN et al., 2005).

As células do cérebro consomem cerca de 20% do oxigênio do corpo (DRINGEN et al., 2000). Essa característica indica o enorme potencial do tecido nervoso na geração de EROs em grande quantidade, o que o torna particularmente vulnerável a danos oxidativos (Do et al., 2009). Para controlar o excesso de EROs produzido, as células nervosas contam com o sistema antioxidante da glutathione (LU, 2013). A síntese da glutathione no cérebro ocorre da mesma forma como nos demais tecidos (figura 1). A glutathione é sintetizada no interior das células em duas etapas consecutivas. A γ -glutamylcysteine sintetase, também designada glutamato cisteína ligase (GCL) é composta por duas subunidades, uma catalítica (GCLC) e uma modulatória (GCLM). A GCL utiliza o glutamato e a cisteína como substratos para formar o dipeptídeo γ -GluCys (1) o qual se combina com a glicina numa reação catalisada pela glutathione sintetase (GS) formando GSH (2). A adenosina trifosfato (ATP) é co-substrato para ambas as enzimas (MISRA; GRIFFITH, 1998) e a GCL é considerada um fator limitante para a síntese de GSH (LU, 2013).

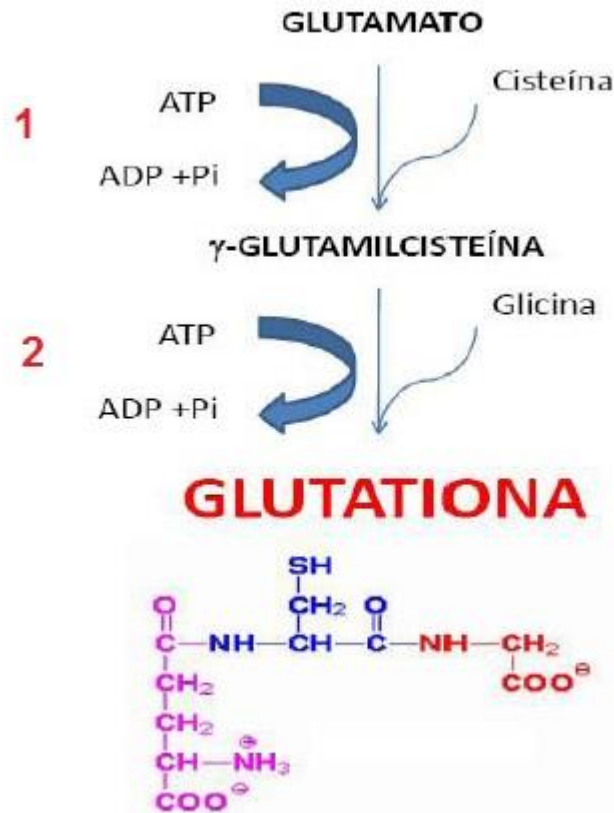


Figura 1: Síntese de GSH.

Adaptado de: (MISRA; GRIFFITH, 1998). (1) Cisteína é adicionado ao glutamato formando γ-glutamylcisteína. (2) Glicina é adicionado à γ-glutamylcisteína para formar glutathione.

1.4. Estresse oxidativo na esquizofrenia e no transtorno bipolar

O estresse oxidativo no cérebro está associado com a perda de neurônios durante a progressão de doenças neurológicas, tais como, doença de Parkinson, doença de Alzheimer, doença de Huntington (BAINS; SHAW, 1997; BHARATH et al., 2002; DRINGEN, 2000). Vários estudos tem documentado o impacto que o estresse oxidativo poderia exercer no desenvolvimento e curso de alguns transtornos psiquiátricos, como a

esquizofrenia, depressão e transtorno bipolar (MAES et al., 2011; MARAZZITI et al., 2012; YAO et al., 2006).

Estudos relataram comprometimento no sistema de defesa antioxidante e aumento da peroxidação lipídica em tecido periféricos e cerebrais (análises *post-mortem*) de pacientes com esquizofrenia e transtorno bipolar (FOURNIER et al., 2014; FREY et al., 2013; FULLERTON et al., 2010; J-F et al., 2009; KHAN et al., 2002; MATTHEWS et al., 2002; PRABAKARAN et al., 2004; RAFFA et al., 2012; RANJEKAR et al., 2003; YAO; LEONARD; REDDY, 2006). Aumento de marcadores de estresse oxidativo foram relatados em pacientes bipolares (ANDREAZZA et al., 2008; GUBERT et al., 2013). Em estudos recentes, uma possível teoria da fisiopatologia da esquizofrenia e do transtorno bipolar vem sendo desenvolvida e sustentada por uma série de robustas evidências. Essa teoria baseia-se em uma susceptibilidade genética para um comprometimento do sistema antioxidante da glutathione combinada a fatores estressores ambientais formando assim um “elo central” responsável por desencadear os danos na conectividade estrutural e a sincronização neuronal, observados na esquizofrenia (figura 2) (DO et al., 2009). Gysin e colaboradores (2007) demonstrou uma associação entre esquizofrenia e o polimorfismo TNR (*trinucleotide repeat*) GAG na subunidade catalítica da GCL (GCLC), enzima chave na síntese de GSH. Já no trabalho de Tosic e colaboradores (2006) foi observado em dois estudos caso-controles uma forte associação entre o gene da subunidade modulatória da GCL (GCLM) e a esquizofrenia. Em ambos estudos foram observados níveis reduzidos de GSH em fibroblastos de pacientes com esquizofrenia. Em pacientes bipolares foram detectados níveis alterados de GSH e da enzima GCL (GAWRYLUK et al., 2011). As evidências

do efeito do comprometimento do sistema antioxidante também podem ser vistas em estudos realizados com modelo animal. Ao utilizar como modelo camundongos knockout para GCLM¹, observou-se níveis aumentados de marcadores de estresse oxidativo (STEULLET et al., 2010), comprometimento de interneurônios parvalbumina-positivos (PV) (CABUNGICAL et al., 2013b), redução da atividade de sincronização da rede neural no hipocampo ventral e no córtex cingulado anterior (STEULLET et al., 2010) e mielinização anormal (MONIN et al., 2014).

¹ Camundongos knockout para GCLM apresentam anomalias fenotípicas que se assemelham a aspectos tanto da esquizofrenia quanto do transtorno bipolar.

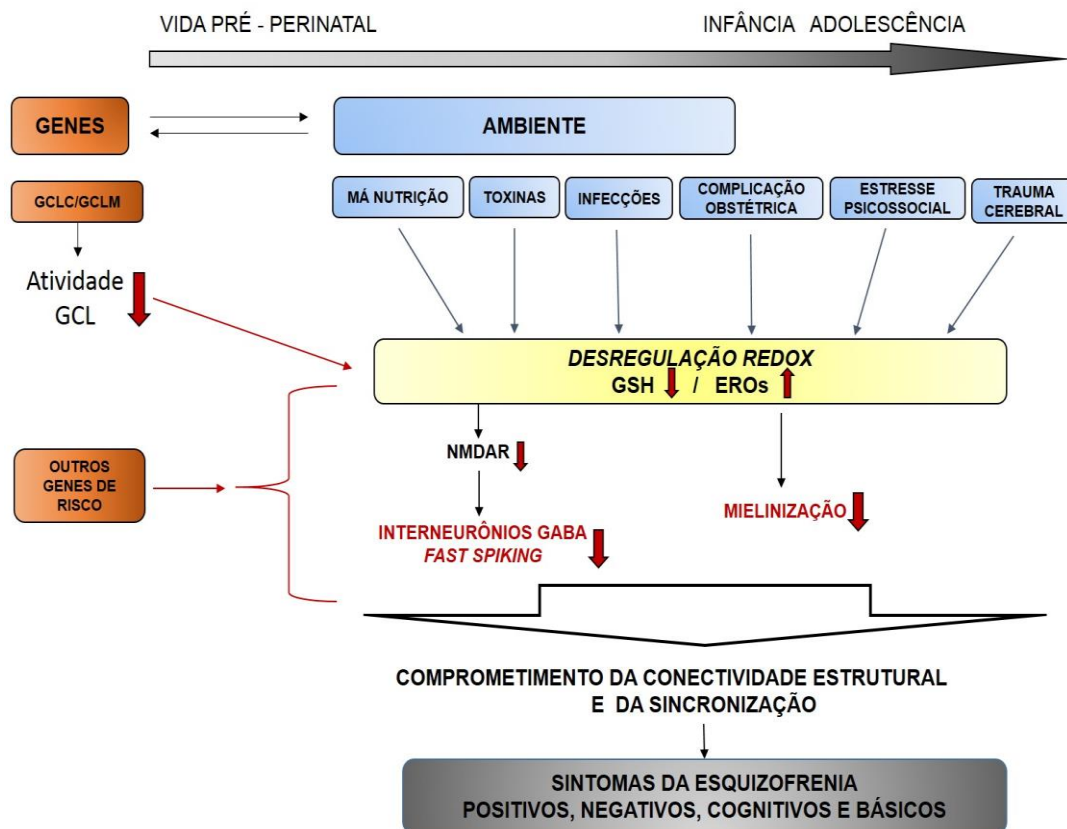


Figura 2: Hipótese do estresse oxidativo na fisiopatologia da esquizofrenia.

Figura adaptada de Do et al., 2000. Susceptibilidade genética (A), resultando no déficit da atividade da GCL combinada a estressores ambientais poderiam levar ao impedimento do desenvolvimento e maturação cerebral normal. Por exemplo, a desregulação redox (aumento de ROS e redução de GSH) poderia comprometer o desenvolvimento de interneurônios parvalbumina-positivos e oligodendrócitos. Essa desregulação redox induz à hipofunção do receptor NMDA (B) comprometendo a viabilidade dos interneurônios GABA fast-spiking. A desregulação redox também prejudica a correta mielinização (C). Combinados (B e C) promovem o déficit da conectividade estrutural e a sincronização neuronal resultando nos sintomas da esquizofrenia.

1.5. Componentes afetados pelo estresse oxidativo

1.5.1. Interneurônios gabaérgicos parvalbumina-positivos (PV)

Vários são os componentes do tecido neuronal afetados pelo estresse oxidativo, dentre os quais destacam-se os interneurônios gabaérgicos parvalbumina-positivos (PV). Os interneurônios PV constituem uma subpopulação de neurônios gabaérgicos que controlam a comunicação de neurônios principais e são necessários para a rápida sincronização neuronal rítmica, facilitando o processamento de informação durante as tarefas cognitivas (SOHAL et al., 2009; WHITTINGTON et al., 2011). As características desses interneurônios impõem uma demanda metabólica muito alta e aumento da densidade mitocondrial, tornando-os sensíveis ao estresse oxidativo (CABUNGICAL et al., 2013). Além disso, fatores estressores ambientais graves produzem estresse oxidativo no cérebro e causam danos nos interneurônios PV (GRILLO et al., 2003; HU et al., 2010; SCHIAVONE et al., 2009). Estudos post-mortem revelaram anomalias nos interneurônios PV em indivíduos com esquizofrenia ou transtorno bipolar (LEWIS et al., 2011; TORREY et al., 2005; ZHANG et al., 2002).

1.5.2. PNN e matriz extracelular

Os interneurônios PV quando maduros, estão envoltos em uma matriz extracelular (ECM) especializada chamada rede perineuronal (PNN) (GIAMANCO et al., 2010). A PNN é composta principalmente por ácido hialurônico, proteínas de ligação, proteoglicanos sulfatados (CSPG, *chondroitin sulfate proteoglycans*) e uma proteína trimérica chamada

tenascina-R (DEEPA et al., 2006; KWOK et al., 2011) (figura 3). A PNN promove a maturação dos interneurônios PV e a estabilidade sináptica e da rede neuronal (KWOK et al., 2011). Além disso, a PNN também funciona como um tampão capaz de proteger os neurônios contra o estresse oxidativo (MORAWSKI et al., 2004; SUTTKUS et al., 2012). Entretanto, a própria PNN é sensível ao excesso de estresse oxidativo (CABUNGICAL et al., 2013). Dessa forma, a proteção seria um reflexo do balanço entre o efeito do estresse oxidativo na degradação da PNN e a capacidade do sistema de mantê-la funcional (CABUNGICAL et al., 2013). Um estudo recente demonstrou uma diminuição significativa da quantidade de PNN em pacientes com esquizofrenia (PANTAZOPOULOS et al., 2014), provavelmente devido ao estresse oxidativo e a diminuição dos níveis de GSH.

Em geral, a matriz extracelular do sistema nervoso central (SNC) é ricamente constituída por glicoproteínas e proteoglicanos ligadas ao ácido hialurônico, o qual funciona como o esqueleto para dar suporte à ECM, além da presença de proteínas de ligação (figura 3). A ECM do SNC ocupa cerca de 20% do volume cerebral total. Durante o neurodesenvolvimento, a ECM influencia a migração celular, o crescimento axonal e a sinaptogênese. Já no cérebro de adultos, a ECM possui um papel importante na manutenção das sinapses e no controle da remodelação sináptica (BURNSIDE and BRADBURY, 2014). Várias enzimas são responsáveis pela integridade e funcionalidade da ECM. Dentre elas, as metaloproteinases de matriz (MMPs) são capazes de clivar todos os componentes da ECM, e tem portanto, função importante na remodelação da matriz e na plasticidade sináptica (MOTT; WERB, 2004). As MMPs fazem parte de uma grande família com 17 membros.

Algumas delas, como a MMP-9 e a MT3-MMP já foram associadas com doença de Alzheimer (WANG et al., 2014) e comprometimento na mielinização (FERRARO et al., 2011). ADAMTS1 (*a disintegrin metalloproteinase trombospondin type 1*) é uma metaloproteinase capaz de clivar CSPG (*chondroitin sulfate proteoglycan*), um proteoglicano e principal componente da ECM no SNC (figura 4). Sugere-se que ADAMTS1 esteja envolvido em doenças neurodegenerativas, como doença de Alzheimer e Parkinson (MIGUEL et al., 2005). Além das metaloproteinases, as sulfatases também desempenham importante papel da manutenção da integridade da ECM. Sulf1 e Sulf2 são duas sulfatases que removem sulfatos do seu principal substrato, o HSPG (*heparan sulfate proteoglycan*). HSPG é outro proteoglicano presente no cérebro e possui a função de modular a formação sináptica após alguma lesão e também modular vias de sinalização incluindo a via wnt (FARHY et al., 2014). HSPG também tem sido associado à doenças neurodegenerativas (CUI et al., 2013). Além das sulfatases e das metaloproteinases, um outro grupo de enzimas, as Galnac transferases são responsáveis pela primeira etapa da glicosilação das cadeias GAGs dos proteoglicanos (BENNETT et al., 2012). Outros componentes da ECM, as fibronectinas são alvos das galnac transferases (PARK et al., 2011). A função geral das galnac transferases é estabilizar os componentes da ECM evitando a degradação dos mesmos pelas metaloproteinases (BENNETT et al., 2012). Um estudo genético mostrou uma associação entre o subtipo galnac T7 e Doença de Alzheimer (BEECHAM et al., 2014).

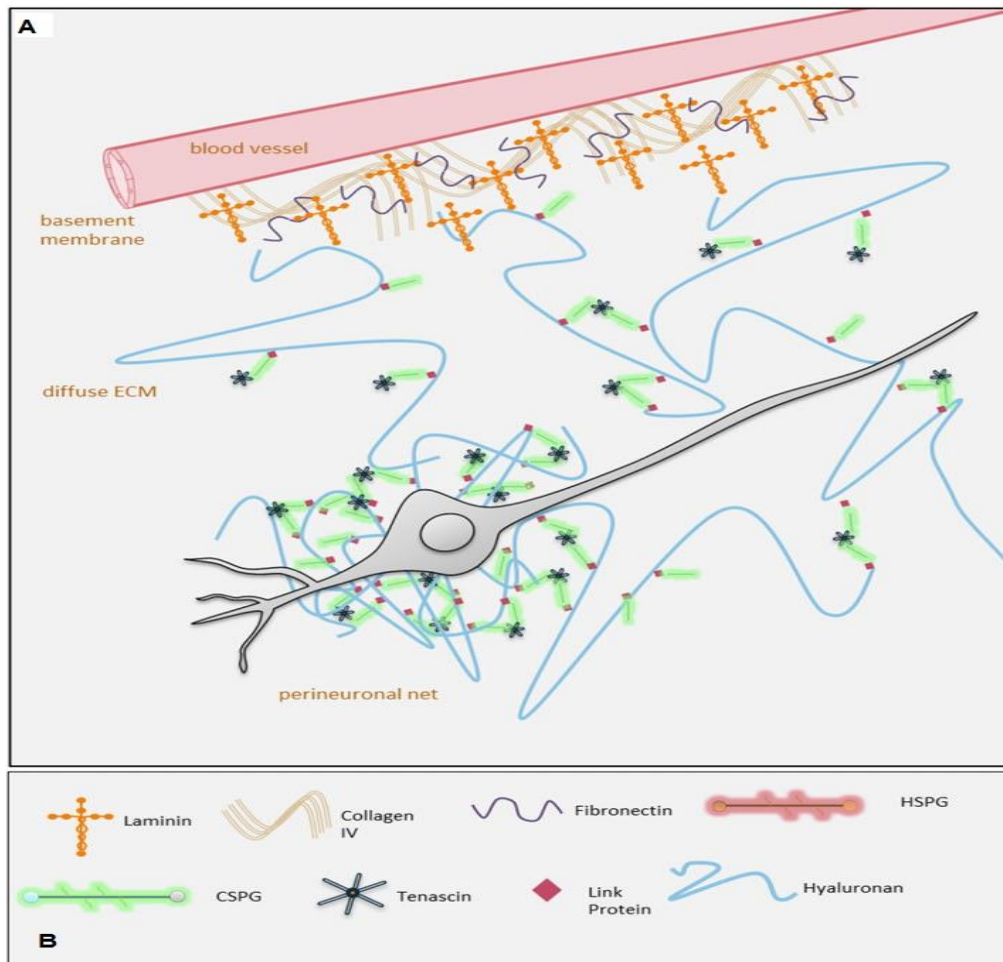


Figura 3: Estrutura e componentes da matriz extracelular.

Figura adaptada de (BURNSIDE and BRADBURY, 2014). (A) Arranjo da ECM, nota-se que próximo aos vasos sanguíneos há presença de componentes da ECM encontrados tipicamente em outros tecidos, como a fibronectina e colágeno. Já distante dos capilares, a ECM se torna mais difusa. Próxima aos corpos neuronais, a ECM se torna densa dando origem a PNN. (B) Componentes da ECM do SNC.

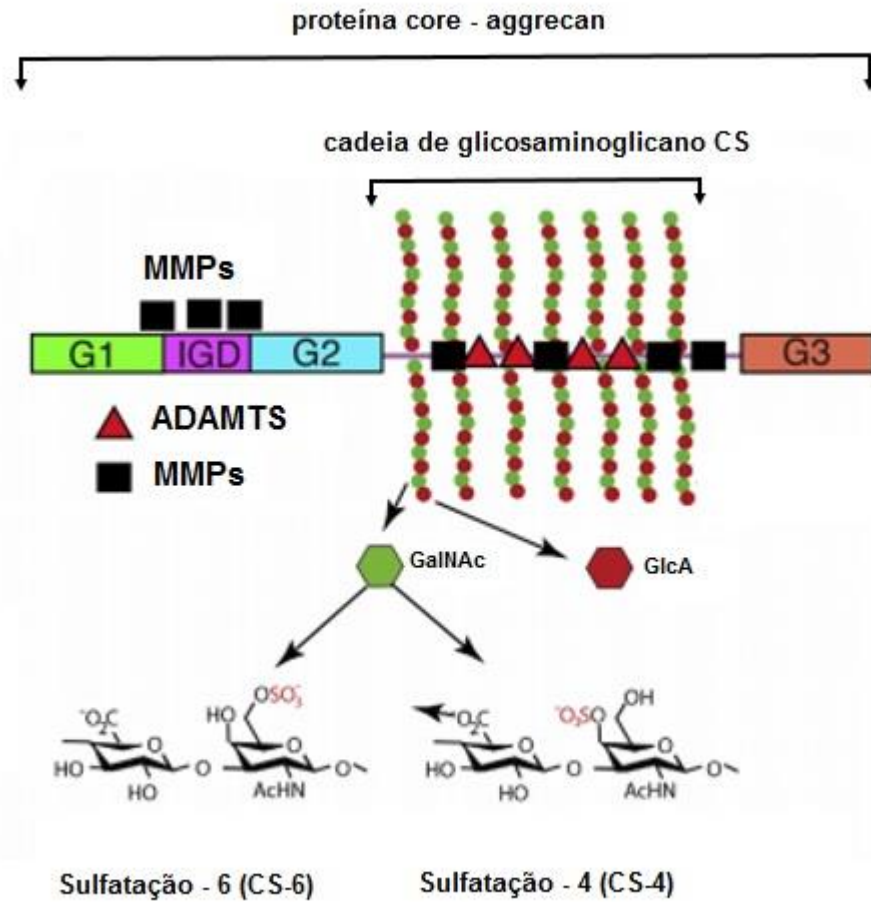


Figura 4: Desenho esquemático da estrutura do CSPG e sítios de clivagem.

Figura adaptada de (BERRETTA et al., 2015). Diagrama esquemático na estrutura do CSPG, aggreacan. O CSPG é composto por uma proteína core com domínios distintos (ex. G1 e G2). Aderidas lateralmente à proteína core estão as cadeias de glicosaminoglicanos *chondroitin sulfate*. Cada cadeia de glicosaminoglicano é composta por pares de repetição de ácido glucorônico (GlcA) e N-acetil-galactosamina (GalNAc). Essas cadeias laterais podem ser sulfatadas em duas posições (CS-6 ou CS-4). CSPG podem ser clivados por uma série de metaloproteinases incluindo ADAMTS (triângulos) e MMPs (quadrados) em vários locais da proteína core.

No entanto, a ECM pode sofrer alterações na sua estrutura e função quando ocorre alguma lesão ou acometimento do SNC, o que pode prejudicar a reparação neuronal (BURNSIDE and BRADBURY, 2014). Alguns estudos demonstraram uma associação entre o comprometimento na (ECM) e a esquizofrenia. Guidotti e colaboradores (2000) observaram uma diminuição da expressão da glicoproteína reelina (uma das principais glicoproteínas que constituem a ECM). Além disso, alterações em alguns componentes da ECM foram descritas na esquizofrenia (BUXBAUM et al., 2008; CORFAS et al., 2004). Foi observado também, em um estudo recente, anormalidades na CSPG (componente chave na ECM do SNC) em pacientes com esquizofrenia, mas sem alterações em pacientes bipolares (PANTAZOPOULOS et al., 2014). Porém, em um estudo genético, um dos subtipos de CSPG, neurocan, foi associado à esquizofrenia e ao transtorno bipolar (MÜHLEISEN et al., 2014). Na literatura vários estudos apontam para uma vulnerabilidade genética relacionada às moléculas da matriz extracelular e anormalidades afetando a integridade e função da ECM, alterações observadas em esquizofrenia e também ao transtorno bipolar (BUXBAUM et al., 2008; DOW et al., 2011; EASTWOOD and HARRISON, 2003; KÄHLER et al., 2011; LIU et al., 2010; PISANTÉ et al., 2009; SHIFMAN et al., 2008; VAWTER et al., 2000, 2001; ZAHARIEVA et al., 2008).

1.6. Cultura de fibroblastos – modelo *in vitro* para pesquisa de transtornos psiquiátricos.

A cultura de fibroblastos dérmicos tem sido proposta como uma boa ferramenta para estudos *in vitro* de transtorno psiquiátricos, como a esquizofrenia, o transtorno bipolar e autismo (FOURNIER et al., 2014). Os fibroblastos são células não diferenciadas e compartilham cerca de 70% de semelhança com neurônios. Possuem toda a maquinaria enzimática para síntese de neurotransmissores, e receptores em geral (MAHADIK et al., 1994). Estudos com estresse oxidativo associado à esquizofrenia tem frequentemente utilizado a cultura de fibroblastos como meio investigativo (DO et al., 2009; FOURNIER et al., 2014; KRAFTSIK et al., 2007, 2011). O motivo se faz devido a algumas características descritas a seguir. A) as células podem ser desafiadas por um agente estressor, que induz potencialmente um fenótipo que é expressado somente na condição de estresse oxidativo; B) a cultura cresce em um meio definido, o que pode minimizar a heterogeneidade entre as amostras devido ao estilo de vida, ambiente, medicação e alimentação dos doadores; C) os fibroblastos têm sido usados com sucesso para revelar anomalias que são relevantes para a fisiopatologia cerebral em outras doenças neurológicas (FOURNIER et al., 2014). Um exemplo, disfunções na atividade bioenergética e mitocondrial, os quais consistem em elementos chaves no processo patológico da doença de Parkinson, foram demonstrados primeiramente em fibroblastos de pacientes (AUBURGER et al., 2012; MYTILINEOU et al., 1994).

1.7. Justificativa

É necessária a identificação de alvos moleculares chaves na fisiopatologia da esquizofrenia e do transtorno bipolar que auxilie no diagnóstico precoce, além do acompanhamento da eficácia das drogas bem como o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para ambas doenças. Através de inúmeras evidências, o estresse oxidativo mostra ter um papel importante na fisiopatologia tanto da esquizofrenia como no transtorno bipolar. Sabe-se também que um dos componentes comprometidos em ambos transtornos é a ECM, e sua capacidade de proteger os interneurônios.

Portanto, a investigação do possível papel do estresse oxidativo sob a estrutura e função da ECM permitiria a identificação de novos alvos moleculares para possíveis terapias, além do melhor entendimento da relação entre estresse oxidativo, ECM e transtornos psiquiátricos.

O grupo da prof^a Kim Do (Universidade de Lausanne, Suíça) realizou um estudo em 2010 utilizando a técnica de microarranjo (dados ainda não publicados) e amostras de fibroblastos dérmicos de pacientes com esquizofrenia crônica. A presente tese foi desenvolvida com base nos resultados obtidos das análises do microarranjo. Os detalhes da técnica, bem como a seleção dos genes escolhidos estão descritos da seção Material e Métodos.

2. OBJETIVOS

- Validar da técnica de microarranjo os dados da expressão de cinco genes selecionados (MMP16, GALNT6, SULF1, ADAMTS1 e ACSL1) pela técnica de PCR em tempo real em fibroblastos de pacientes esquizofrenia crônica.
- Analisar os níveis das proteínas codificadas pelos genes selecionados nas amostras de fibroblastos de pacientes com esquizofrenia crônica.
- Verificar os níveis de expressão dos cinco genes selecionados em amostras de pacientes com transtorno afetivo bipolar.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Descrição da população estudada

Os pacientes com esquizofrenia avaliados na pesquisa de microarranjo e PCR quantitativo foram recrutados no Centro Hospitalar Universitário de Vaud (CHUV) pertencente à Universidade de Lausanne (Suíça) após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido. Já os pacientes com transtorno bipolar eutímicos foram recrutados no ambulatório de transtorno bipolar do serviço de psiquiatria do Hospital das Clínicas pertencente à Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Os pacientes cumpriram os critérios para esquizofrenia avaliados por um psiquiatra por meio da aplicação das escalas DSM-IV e PANSS. Os pacientes com transtorno afetivo bipolar foram avaliados por um psiquiatra usando as escalas Young de mania (YMRS) e Hamilton de depressão (HDRS) (MARTÍNEZ-ARÁN et al., 2004).

O número amostral para o projeto foi de 19 controles para 17 pacientes esquizofrênicos e 7 controles para 11 pacientes bipolares.

Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética COEP: nº ETIC 0434.0.203.000.10

3.1.1. Critérios de inclusão e exclusão

Critérios de inclusão (para os pacientes com esquizofrenia): homens e mulheres com idade entre 18 e 35 anos, com diagnóstico de esquizofrenia e capaz de fornecer consentimento para participar da pesquisa.

Critérios de inclusão (para os pacientes com transtorno afetivo bipolar): homens e mulheres com idade entre 18 e 55 anos, com diagnóstico de

transtorno afetivo bipolar, eutímicos, capaz de fornecer consentimento para participar da pesquisa.

Critérios de exclusão: intoxicação ou doença cerebral associada a psicose, incapacidade de fornecer o consentimento para participar da pesquisa.

Critérios de inclusão (para controles): homens e mulheres com idade entre 18 e 55 anos, capaz de fornecer consentimento para participar da pesquisa.

Critérios de exclusão (para controles): possuir parentes até 2º grau com histórico de psicose e incapacidade de fornecer consentimento para participar da pesquisa.

3.2. Experimento de microarranjo

Microarranjo é uma técnica de possibilita a mensuração simultânea de RNAm transcritos de milhares de genes em um estudo de uma célula particular ou um tecido amostral de interesse (KERR & CHURCHILL, 2001). Consiste em duas etapas. (Ver figura 4). Primeiramente é realizado o preparo das amostras (célula ou tecido de interesse) através da extração do RNAm e síntese do cDNA correspondente. Em seguida, as amostras de cDNA são “identificadas” por um procedimento de coloração com fluorocromos (em geral, cianina 3 e cianina 5 [Cy3] e [Cy5]). Na segunda etapa é feita a hibridização das amostras com as sondas, sequências complementares ao DNA. Essas sondas são fixadas nos *spots*, cavidades físicas presentes na superfície da placa de arranjo (em geral uma lâmina de vidro). Cada *spot* corresponde a uma sonda específica. Para a hibridização, adiciona-se as amostras de cDNA previamente

marcadas com fluorocromos aos *spots* contendo as sondas. A leitura é realizada por meio de um *scanner* de alta resolução, o qual se desloca por toda a superfície do arranjo identificando as diferentes intensidades de coloração presentes em cada *spot*. Como resultado, para cada *spot* do arranjo, o scanner fornece uma imagem composta por milhares de pixels. A quantificação é feita pela representação numérica associada a intensidade luminosa de cada *spot*. Dessa forma, a quantificação luminosa está associada a quantidade de mRNA transcritos e seus valores representam os níveis de expressão gênica.

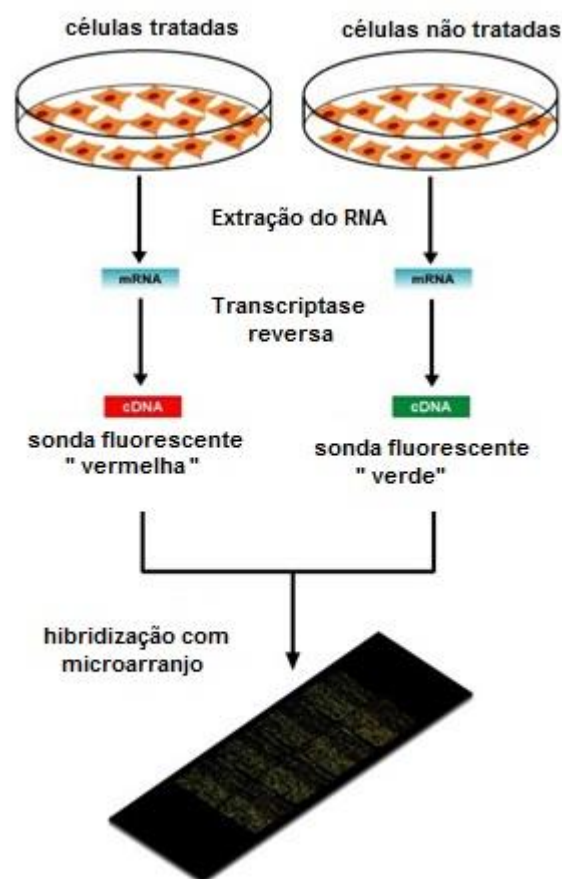


Figura 5: Desenho esquemático da construção do experimento de microarranjo.

Disponível em wikipedia.

O grupo suíço da Profa. Kim Do realizou um estudo em 2010 utilizando a técnica de microarranjo com amostras de cDNA provenientes de fibroblastos dérmicos de pacientes com esquizofrenia crônica. Para a obtenção das amostras, foram selecionados 18 pacientes com diagnóstico de esquizofrenia e 21 indivíduos saudáveis para compor o grupo controle (tabela 1). Para a obtenção dos fibroblastos coletou-se amostras de pele (3 mm). As amostras foram divididas em dois grupos de acordo com o tratamento realizado durante a cultura celular (tBHQ² – induz estresse oxidativo e DMSO – veículo) (PRESTERA et al., 1993; SCHILDERMAN et al., 1993). Todo o manejo da cultura de fibroblastos incluindo o tratamento com o pró-oxidante foi realizado de acordo com o estudo de Gysin et al (2008). A extração do RNA a partir das amostras de fibroblastos foi realizada utilizando o kit (Rneasy Mini, Qiagen – Suíça) prosseguida pela síntese do cDNA utilizando o kit High capacity cDNA reverse transcription (Applied biosystems by Life Technologies, Carlsbad – EUA). Em seguida, as amostras de cDNA foram submetidas à técnica de microarranjo utilizando um chip com 28.542 sondas (Affymetrix 1.0 ST GeneChip). Após extensa análise estatística, iniciou-se a seleção dos genes. Primeiramente, das 28.542 sondas foram selecionadas aquelas com o valor de $p < 0,1$, correspondendo a um total de 1500 sondas. Desse montante, selecionou-se as sondas com o FC³ (fold change) $> 1,2$ ou $< -1,2$ contabilizando 250 sondas. Verificou-se se havia proteínas descritas codificadas a partir dos

² tBHQ: tert-butylhidroquinone, composto conhecido por produzir espécies reativas de oxigênio e consequentemente aumentar os níveis de expressão de genes antioxidantes.

³ FC: fold change, razão paciente/controle. Valor utilizado para expressão gênica

genes associados as 250 sondas e foram identificadas 200 proteínas (**Figura 1**).

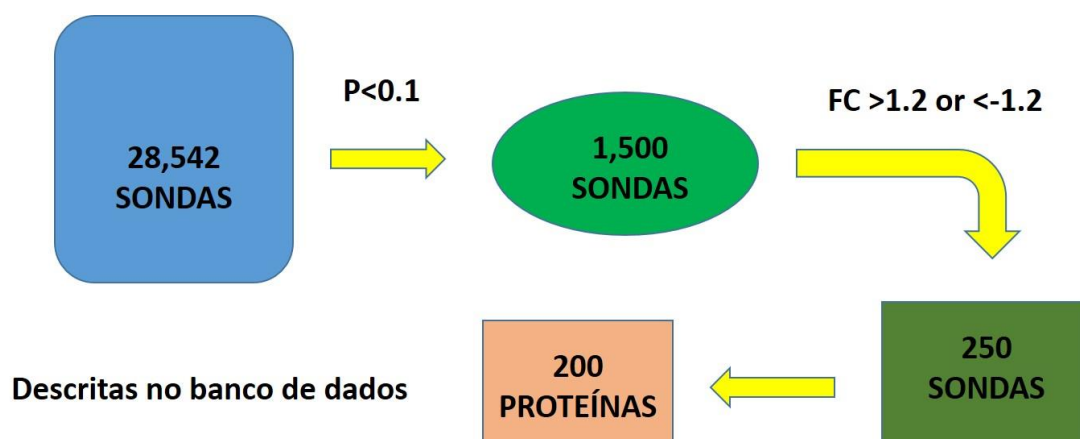


Figura 6: Esquema ilustrativo da seleção de genes a partir do total de sondas do microarranjo.

As 200 proteínas codificadas por esses genes foram analisadas de acordo com a sua localização celular: a.) membrana; b.) matriz extracelular; c.) núcleo; d.) citoplasma; e.) mitocôndria; f.) citoesqueleto. A maioria dos genes que estavam diferentemente expressos em pacientes comparados aos controles codificam proteínas cuja função e localização envolvem a membrana e a matriz extracelular (**Tabela 1**). Com base nessa informação foi selecionado um conjunto de genes cujas proteínas codificadas associam-se com essas duas localizações (membrana e matriz). Foram selecionados cinco genes que estavam diferentemente expressos em pacientes comparados aos controles, com $p < 0,05$ e que possuíam resposta ao tratamento com o pró-oxidante tBHQ (**Tabela 2**).

A partir desse momento, iniciou-se o trabalho de validação dos resultados dos cinco genes através da tecnologia TaqMan feita por PCR quantitativo em tempo real. O processo de validação se deu com a realização de uma nova cultura utilizando células dos mesmos pacientes com esquizofrenia que fizeram parte do estudo do microarranjo. Para isto, as amostras de fibroblastos congeladas destes pacientes foram recultivadas conforme descrito no tópico 1.3.2. Todos os procedimentos do processo de validação foram realizados utilizando amostras de fibroblastos de pacientes com transtorno bipolar, com o intuito de compararmos com os resultados obtidos nas amostras de pacientes com esquizofrenia.

Compartimento celular	Total de sondas	Genes diferentemente regulados no baseline (DMSO)	Genes diferentemente regulados na condição de estresse oxidativo (tBHQ)
Extracelular	10%	23%*	21%*
Membrana	33%	41%	46%*
Núcleo	22%	14%*	13%*
Citoplasma	20%	21%	20%
Mitocôndria	4%	2%	4%
Citoesqueleto	3%	4%	2%

*: valor de p ajustado para 0,05.

Tabela 1: Localização subcelular das proteínas codificadas por genes que estão diferentemente regulados entre pacientes e controles.

GENE	FOLD CHANGE Paciente/controle (Valor de p)		NOME DA PROTEÍNA	FUNÇÃO
	Veículo (DMSO)	tBHQ		
MMP16	-1,3 (0,005)	-1,2 (0,029)	MT3-MMP Metaloproteinase de matriz transmembrana tipo 3	Proteinase que degrada vários componentes da ECM
GALNT6	-1,4 (0,011)	-1,5 (0,001)	Galnac T6 N-acetil galactosamina transferase 6	Glicosila componentes da ECM. Promove estabilização da ECM
SULF1	1,6 (0,001)	n.s	Sulfatase 1	Enzima que remove sulfato na posição 6 de componentes da ECM
ADAMTS1	1,2 (0,045)	n.s	<i>A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 1</i>	Proteinase que cliva CSPG da ECM
ACSL1	1,4 (0,015)	1,3 (0,030)	Ligase de cadeia longa de ácidos graxos	Degrada ácidos graxos via beta oxidação e promove síntese de lipídios

Tabela 2: Lista de genes selecionados para validação.

Fold change dos níveis de expressão gênica entre pacientes e controles estão indicados em ambas condições: veículo (DMSO) ou na condição de estresse oxidativo (tBHQ), como avaliado pelo microarranjo, n.s.: não significativo

3.3. Obtenção da biópsia dermatológica (amostras de pacientes bipolares e controles)

As amostras de pele com aproximadamente 3 mm de tamanho foram obtidas com o auxílio de um instrumento descartável usado para biópsias dermatológicas, denominado *punch* dermatológico. Todo o procedimento foi realizado por um médico participante do estudo. Foi escolhida a parte interna do antebraço como local para realizar a biópsia devido a pequena quantidade de queratina e pelos encontrados nessa região. Após a higienização com álcool iodado em uma pequena região do antebraço, foi aplicado um anestésico local (aprox. uma ampola pequena de lidocaína com adrenalina) e constatado o efeito anestésico, a amostra foi coletada. Imediatamente após a coleta, a biópsia foi mantida em uma solução nutritiva aquecida à 37°C contendo DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium* com alta concentração de glicose –*DMEM-High Glucose*) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), solução antibiótica-antimicótica penicilina/estreptomicina (2%), antimicótico anfotericina B (1%) e piruvato de sódio (1%) até o momento de plaquear e colocar em cultura.

Todos os reagentes citados foram obtidos da Life Technologies (Carlsbad –EUA) ou da Sigma Aldrich Co. (St. Louis –EUA).

3.4. Cultura de fibroblastos

3.4.1. Cultivo a partir da biópsia (amostras de pacientes bipolares e controles)

Cada biópsia coletada foi subdividida em partes menores e esses fragmentos transferidos para duas placas de cultura cell+ de 10 cm de diâmetro (SARSTEDT AG & Co, Nümbrecht Germany). Os fragmentos foram cobertos por lâminas de microscopia previamente esterilizadas para garantir a aderência do material biológico às placas. Foi adicionado 10 mL de meio de cultura DMEM alta glicose suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de antibiótico penicilina/estreptomicina e 1% de piruvato de sódio à 37°C. O meio DMEM alta glicose já contém piruvato de sódio na sua composição. Porém, a adição de uma quantidade extra objetivou fornecer um maior aporte de glicose às células, devido à característica de crescimento rápido dos fibroblastos. As biópsias foram mantidas em incubadora à temperatura controlada de 37°C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ para manutenção do pH próximo ao fisiológico. Durante três dias não houve qualquer tipo de manipulação nas placas, para evitar o deslocamento da biópsia sob a lâmina de microscopia.

O crescimento celular foi monitorado em microscópio invertido de fase Axiovert 25 (Carl Zeiss) e o meio de cultura foi trocado duas vezes na semana. Na primeira semana de cultivo foi observado o crescimento de células epiteliais ao redor dos fragmentos de biópsia. Na segunda semana já foi possível observar poucos fibroblastos próximos à biópsia e uma diminuição da quantidade de células epiteliais. As lâminas de microscopia foram retiradas

assim que fossem visualizadas quantidades significativas de fibroblastos, evidenciadas pela formação de pequenas redes celulares. Assim que a monocamada celular ocupou em torno de 50 a 60% do espaço da placa, o que denomina-se confluência, as células foram transferidas para uma nova placa “p1”. O processo de remoção da monocamada celular foi realizado com tripsina-EDTA 0.05% (Life Technologies, Carlsbad – EUA) à 37°C. As células da segunda placa foram removidas e congeladas em 3 alíquotas “p0”. A placa “p1” foi subcultivada conforme descrito no tópico 1.3.3. Todos os procedimentos de cultivo se realizaram em capela de fluxo laminar seguindo os protocolos para a manutenção da esterilidade dos materiais, suplementos e meio de cultura a serem utilizados.

3.4.2. Congelamento das amostras

O meio de cultura foi removido por aspiração, a monocamada celular lavada com PBS-EDTA, tripsinizada, ressuspensa em 5 mL de meio de cultura para inativar a tripsina, transferida para um tubo falcon e centrifugada por 5 minutos, 1000 x g a 22°C. O pellet de células foi ressuspensa em 1 mL (por alíquota) de meio de congelamento contendo 10% de DMSO (Sigma Aldrich Co. St. Louis –EUA), 10% de SFB e 80% de meio DMEM alta glicose. Esta suspensão foi incubada por 24 horas a – 80°C e após esse período os criotubos foram transferidos para o reservatório de nitrogênio líquido.

3.4.3. Descongelamento das amostras de pacientes esquizofrênicos e controles

Os criotubos contendo fibroblastos foram retirados do nitrogênio líquido e colocados em banho a 37°C sob agitação durante alguns segundos até o desprendimento de um pequeno pedaço de gelo. Cuidadosamente, as amostras foram transferidas para tubos falcon de 15 mL contendo 10 mL de meio de cultura a 37°C e em seguida, centrifugadas por 5 minutos a 1000 x g a 22°C. O pellet de células foi ressuspensionado por 5 mL de meio de cultura e transferido para placas de cultivo contendo meio de cultura (volume final = 10 mL por placa). Em seguida a cultura foi incubada de acordo com as condições padrões de cultivo.

3.4.4. Subcultivo

Após ocuparem 100% da placa, os fibroblastos foram subcultivados, utilizando, para tanto, solução de tripsina-EDTA a 0,05% para que em 3 a 5 minutos a 37°C, a monocamada celular fosse liberada (tendo sido a cultura previamente lavada uma vez com solução de PBS). A tripsina-EDTA foi inativada com o soro fetal bovino contido em uma nova alíquota de meio de cultura. Cada alíquota da suspensão foi distribuída igualmente em novos recipientes de cultivo contendo o meio de cultura apropriado, e novamente levadas de volta à estufa, onde cada procedimento deste deu origem a uma nova passagem de linhagem celular. Foram realizadas no total 5 passagens.

Para realizar a quinta e última passagem, a monocamada celular foi separada como descrito anteriormente. Em seguida, as células foram

transferidas para um tubo falcon e centrifugadas a 1000g x g por 5 minutos a 4°C. Após aspiração do sobrenadante, o precipitado de células foi ressuspenso em 5 mL de meio de cultura. As células em suspensão foram contadas utilizando a câmara de Neubauer e em seguida aliquotadas em novas placas de modo que a concentração celular estabelecida foi de 6×10^5 células/mL. Em média foi obtido 10 placas por indivíduo (paciente ou controle). As células foram novamente levadas à estufa por 24 horas.

3.4.5. Tratamento com pró-oxidante ou veículo.

No dia seguinte à última passagem (p5) realizou-se o tratamento das culturas com o pró-oxidante (tBHQ) tert-butilhidroquinona, composto conhecido por induzir condição de estresse oxidativo (Sigma-Aldrich Co.St. Louis - EUA) ou veículo dimetil sulfoxido (DMSO) (Sigma-Aldrich Co.St. Louis - EUA). O tBHQ é dissolvido em DMSO para uma solução de concentração final de 0,05%. O tratamento foi feito em dois grupos com igual número de placas (ex.: 5 placas com veículo DMSO e 5 placas com pró-oxidante tBHQ). Para realizar o tratamento foi preparado duas soluções contendo DMSO ou tBHQ (500 µM) em meio de cultura. Adicionou-se 1 mL das soluções às placas contendo o volume de 9 mL de meio de cultura. Dessa forma, a concentração final dos reagentes para tratamento foi definida em 50 µM por placa e volume final de 10 mL. As células foram mantidas em tratamento na incubadora (37°C, 90% de umidade, 5% de CO₂) por 18 horas. O tempo de tratamento foi determinado baseando-se no estudo de Gysin *et al* (2008).

3.4.6. Congelamento do pellet seco

Após o tempo de tratamento, as placas foram retiradas da incubadora e dispostas no fluxo laminar. O meio de cultura foi aspirado e a camada celular foi coberta com 5 mL de PBS-EDTA a 4°C. Com ajuda de um removedor de células (*cell scraper*), as células foram raspadas delicadamente e transferidas para tubos cônicos de 50 mL, um tubo para cada tipo de tratamento a qual as células foram submetidas (DMSO ou tBHQ). A suspensão de células foi coletada centrifugando-se por 10 minutos à 1000 x g a 4°C. O sobrenadante foi descartado, as células foram ressuspensas com o volume de 1mL de PBS-EDTA 1X gelado por placa (ex.: 5 placas DMSO = 5 mL). A suspensão celular foi aliquoteada em tubos de 1,5 mL e centrifugada novamente a 1000 x g, 4°C por 5 minutos. Após essa etapa, retirou-se o máximo de sobrenadante possível, e o pellet seco foi mantido à -80°C.

3.5. Análise da expressão genética

A análise de expressão dos genes MMP16, ADAMTS1, ACSL1, SULF1 e ACSL1 através dos níveis de RNAm (RNA mensageiro) foi feita através da técnica RT-PCR (transcriptase reversa por reação em cadeia da polimerase). O RNA foi extraído com Trizol® (Life Technologies, Carlsbad – EUA) ou através do kit Perfect pure RNA extraction (5 Prime GmbH, Hilden - Alemanha) a partir de células em cultura. O cDNA foi sintetizado e em seguida amplificado em tempo real com TaqMan utilizando sondas específicas em um equipamento apropriado para detecção de fluorescência.

3.5.1. Extração de RNA

Para a extração de RNA, a partir do pellet seco de fibroblastos de pacientes com esquizofrenia, foi utilizado o método de coluna usando o kit Perfect pure RNA extraction (5 Prime GmbH, Hilden - Alemanha) segundo orientações do fabricante sem modificações.

Para a extração de RNA da cultura de fibroblastos de pacientes bipolares utilizando o reagente de Trizol® seguiu-se o protocolo do fabricante com mínimas modificações. Após o tempo de tratamento com o pró-oxidante previamente descrito, duas a quatro placas foram selecionadas para extração de RNA. Mantidas em uma caixa com gelo dentro do fluxo laminar, o meio de cultura foi removido e a camada celular foi rapidamente lavada duas vezes com PBS-EDTA a 4°C. Em seguida, 700 µL de Trizol® foi adicionado e a solução permaneceu em repouso por 5 minutos a temperatura ambiente para a completa lise e dissociação de complexos formados por RNA e proteínas. Após esse tempo, a solução foi transferida para microtubos autoclavados de 1,5 mL e mantidos a -80°C até o momento da extração do RNA.

Os microtubos foram descongelados por 10 minutos a temperatura ambiente e após esse período adicionou-se 140 µL de clorofórmio em cada tubo seguida de uma homogeneização vigorosa no vórtex. Após centrifugação a 12.000 x g por 15 minutos a 4°C, transferiu-se a fase aquosa da mistura contida na fase superior para outro tubo contendo 350 µL de isopropanol (normalmente, 50% do volume inicial de Trizol® utilizado). Novamente

incubou-se por 10 minutos à temperatura ambiente e centrifugou-se a 12.000 x g por 10 minutos a 4°C. O precipitado foi lavado com etanol 75% (v/v) preparado com água-DEPC, seco à temperatura ambiente e redissolvido em 20 µL de água-DEPC.

3.5.2. Quantificação de RNA total

Uma vez isolado, o RNA foi quantificado através de espectrofotometria (NanoDrop™ 2000 - Thermo Scientific, EUA). A relação A260/A280 também foi determinada para estimar o grau de pureza do RNA, sendo utilizado o valor entre 1,8 e 2 como ideal. Em seguida o RNA foi estocado e mantido a -80°C.

3.5.3. Reação da transcriptase reversa (síntese de cDNA)

A síntese de cDNA a partir do RNA extraído de fibroblastos de pacientes esquizofrênicos foi realizada conforme descrito a seguir. Para cada reação de RTPCR foi usada 300 ng de RNA e adicionado 25 mM MgCl₂; 10 mM dNTP; 50 µM Random hexamers; 50 U/µL transcriptase reversa (Applied Biosystem, Foster City, CA, EUA) em um tampão apropriado (RT-tampão 10x - Applied Biosystem, Foster City, CA, EUA). Foram incluídos controles negativos conforme descrito mais a seguir. O volume total por reação foi de 30 µL. As temperaturas sugeridas pelo fabricante foram: 10 min a 25°C, seguidas por 30 min a 48°C e 5 min a 95°C e (*hold* a 4°C), para cada ciclo.

Para as amostras de RNA provenientes de fibroblastos de pacientes bipolares extraídas pelo método de Trizol®, foi realizado o tratamento enzimático (para 1 µg de RNA) com DNase I (Life Technologies, Carlsbad – EUA) para eliminar possíveis contaminações do RNA com DNA genômico. Para tal, o meio reacional consistindo de tampão e DNase I livre de RNases (New England Biolabs, Ipswich – EUA) foi adicionado as amostras como indicado pelo fabricante. As reações foram incubadas a 37°C por 10 minutos. Após o fim da reação, no intuito de inativar a DNase I, 1 µL de EDTA 52 mM foi adicionado a cada tubo reacional (obtendo concentração final de 5 mM) e, em seguida, estes foram transferidos novamente para o termociclador para reação a 75°C por 5 minutos. O cDNA foi sintetizado a partir dos 10 µL da solução tratada com DNase I. Para a síntese de cDNA utilizou-se o kit High capacity cDNA reverse transcription (Applied biosystems by Life Technologies, Carlsbad – EUA) conforme instruções do fabricante com pequenas modificações. Para cada 10 µL de solução contendo 1 µg de RNA foi utilizado 10 µL de reação para síntese de cDNA, totalizando 20 µL de volume total. Além das amostras, sintetizou-se duas reações para controle negativo (uma sem enzima reverse transcriptase (RT-) e uma outra sem amostra (NTC, no template) e 1 reação para controle positivo (amostra de cDNA previamente sabida que amplifica na reação de PCR). Cada síntese de cDNA realizada continha amostras de controles e pacientes tratados (tBHQ) e não tratados (DMSO) além dos controles negativos e positivos. A síntese de cDNA foi realizada no termociclador modelo DNA Engine thermal cycler (Bio Rad, Hercules - EUA) de acordo com as temperaturas sugeridas pelo fabricante do kit para otimização dos resultados (25°C 10 min, 37°C 120 min, 85°C 5 min e

hold 4°C). Após a síntese, as amostras contendo cDNA foram mantidas à -20°C.

3.5.4. qPCR

Amostras de cDNA de pacientes esquizofrênicos e bipolares foram submetidas às mesmas condições de quantificação gênica.

Para amplificação do cDNA, foi realizada uma PCR em tempo real com TaqMan® normalizado pela fluorescência ROX. O reagente TaqMan® Universal PCR MasterMix (Life Technologies, Carlsbad – EUA) foi utilizado para diluir as sondas para detecção dos genes de interesse (ver tabela 3). As condições de temperatura no termociclador foram estabelecidas de acordo com o fabricante do reagente TaqMan® Universal PCR MasterMix: incubação UNG a 50°C, desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos, desnaturação a 95°C por 15 segundos, anelamento e extensão a 60°C por 1 minuto. Cada amostra foi feita em triplicata. Como controle negativo foram utilizados poços que continham a mistura da reação RT- e NTC. As possíveis variações na concentração inicial de RNAm entre as amostras foram calculadas através da normalização do gene constitutivamente expresso ribossômico, subunidade 18 (18S). Para análise de expressão gênica, foi aplicado o método comparativo Delta-Delta C_t ($\Delta\Delta C_t$) (LIVAK; SCHMITTGEM, 2001). Calculou-se inicialmente o ΔC_t de cada amostra, subtraindo-se os valores de C_t (*threshold cycle* ou limiar do ciclo) do gene controle (18S) dos valores de C_t do gene alvo. Após determinação do ΔC_t da amostra, escolheu-se como amostra normalizadora o cDNA de células de indivíduos saudáveis (controles) cultivadas e tratadas com

veículo diluidor do pró-oxidante, DMSO. Para o cálculo do $\Delta\Delta C_t$ utilizou-se a seguinte fórmula: $[\Delta C_t (\text{amostra}) - \Delta C_t (\text{amostra normalizadora})]$. Uma vez determinado o $\Delta\Delta C_t$, aplicou-se a fórmula $2^{-\Delta\Delta C_t}$, que resultou no valor da expressão gênica relativa.

Sondas TaqMan® utilizadas	
GENES	CÓDIGO
MMP16	Hs00234676_m1
SULF1	Hs00290918_m1
GALNT6	Hs00200529_m1
ADAMTS1	Hs00199608_m1
ACSL1	Hs00960561_m1

Tabela 3: Lista de sondas TaqMan® utilizadas para a validação dos genes selecionados.

3.6. Western blot

3.6.1. Extração de proteínas totais de células

Para realizar a extração de proteínas totais foi utilizado amostras de fibroblastos congelados (*pellet* seco) como descrito no tópico 1.3.6.

As proteínas totais das amostras de fibroblastos (*pellet* seco) de pacientes com esquizofrenia e dos controles saudáveis foram extraídas usando um tampão de lise constituído por 100mM Tris-HCl pH 6.8; 150 mM

NaCl; 2% SDS; 1mM EDTA; 1 mM PMSF; 1 mM DTT; 30 mM NaF e contendo um coquetel inibidores de proteases (coquetel tabletes, Roche, Mannheim, Alemanha). Foi adicionado 100 μ L do tampão de lise em cada amostra, homogeneizou-se no vortex para completa dissociação e incubou-se à temperatura ambiente por 10 minutos. Após esse tempo, as amostras foram sonicadas (Vibra-Cell™ - Sonics & Materials, Inc., Newtown – EUA) à amplitude 40 para que ocorresse a lise celular. Os lisados foram centrifugados a 3000 x g por 10 minutos para remoção de fragmentos celulares. O sobrenadante foi pipetado e transferido para tubos novos e mantido à -20°C até as análises posteriores. Todos os reagentes foram obtidos da Sigma-Aldrich Co., St. Louis – EUA.

3.6.2. Quantificação de proteínas totais

A quantificação protéica foi realizada conforme as instruções do kit *Pearce™ BCA protein assay* (biculina) (Thermo Scientific, Rockford, IL EUA), sem modificações. Um microlitro do extrato proteico foi adicionado aos reagentes BCA em uma placa com 96 poços. Após a homogeneização, a mistura foi levada à uma incubadora a 37°C por 30 minutos, logo em seguida mantida à temperatura ambiente para resfriar e depois levada para leitura das absorbâncias no leitor de microplacas Victor™X4 (Perkin Elmer, Inc., Waltham – EUA) no comprimento de onda de 595 nm. Em cada dosagem, uma curva de calibração com albumina sérica bovina na concentração de 1 μ g/ μ L (0 – 10 μ g) foi utilizada como padrão. Através da curva padrão, obtivemos a equação para o cálculo das concentrações a partir das absorvâncias das amostras.

3.6.3. SDS PAGE

Quantidades iguais de proteína (10 a 30µg) foram preparadas para eletroforese com tampão de amostra desnaturante *Laemmli buffer* (Tris-HCl 125 mM pH 6.8; SDS 4%; glicerol 20%; azul de bromofenol 0,02%; DTT 200 mM) (Sigma-Aldrich Co., St. Louis – EUA). Após incubação a 95°C por 10 minutos, as amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida em gradiente de 8 ou 10% (acrilamida 30%; Tris-HCl 1.5 M; H₂O; TEMED 20%; APS 10%) (Sigma-Aldrich Co., St. Louis – EUA) para eletroforese. Em seguida foi realizada transferência para membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) (Amersham Biosciences, Amersham, Reino Unido) com tampão apropriado (Tris 25 mM; 192 mM glicina; etanol 20%) (Sigma-Aldrich Co., St. Louis – EUA).

3.6.4. Imunodeteção

Antes da incubação com os anticorpos, as membranas foram incubadas em solução de bloqueio TBS (Tris 20 mM, NaCl 137 mM, 0.1% Tween 20, pH 7,4) contendo 5% de leite em pó ou 3% de albumina bovina sérica por 60 minutos à temperatura ambiente (TA). Em seguida, as membranas foram incubadas overnight a 4°C (MT3-MMP, SULF1, ADAMTS1) ou por 2 horas à temperatura ambiente (Galnac T6) com anticorpos primários de interesse (tabela 4). Após a incubação em anticorpos primários, as membranas foram lavadas com TBS (TBS + 0,1% Tween 20) 3 vezes e incubadas com anticorpo secundário específico por uma hora em temperatura ambiente. Após três lavagens em TBS, as membranas foram submetidas à detecção de imunorreatividade quimioluminescente conforme instruções do kit *ECL Plus*

(GE, Fairfield – EUA). As membranas foram mantidas no interior de uma caixa da Kodak (*Kodak cassette*) por um tempo apropriado para cada proteína a ser detectada e posteriormente reveladas no equipamento *myECL Imager* (Thermo Scientific, Rockford IL – EUA). A quantificação das bandas imunorreativas foi feita pelo programa Image J (National Institutes of Health, EUA). Os valores obtidos foram corrigidos pelos valores da tubulina.

Anticorpo	Fornecedor
Anti-MMP16 coelho	<i>Abcam Inc.</i>
Anti-Galnac T6 coelho	<i>Abcam Inc.</i>
Anti-ADAMTS1 coelho	<i>Abcam Inc.</i>
Anti-SULF1 cabra	<i>Abcam Inc.</i>
Anti- α -tubulina camundongo	<i>Santa Cruz Biotechnology</i>
Anti-IgG camundongo	<i>Jackson Immuno research</i>
Anti-IgG coelho	<i>Jackson Immuno research</i>
Anti-IgG cabra	<i>Jackson Immuno research</i>

Tabela 4: Anticorpos utilizados pelo estudo.

3.7. Análise estatística

As diferenças significativas entre as médias obtidas pelos achados bioquímicos e moleculares, quando comparadas dois a dois, foram calculadas através do teste t e quando comparados em grupos de três ou mais colunas foram submetidos aos testes de modelo linear misto, com amostras repetidas, seguido do pós-teste de Bonferroni. Os valores apresentados graficamente representam médias $\pm$ erro padrão da média (SEM). Todas as análises estatísticas foram realizadas pelo programa SPSS (versão 20) onde valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4. RESULTADOS

4.1. Parte I

Os resultados desta seção referem-se aos experimentos realizados com amostras de pacientes com esquizofrenia para validar os dados do estudo anterior com microarranjo. Uma nova cultura celular foi realizada e as amostras foram usadas para detectar os níveis de RNAm e proteína.

4.1.1. Dados sócio-demográficos

Tabela 4: Dados sócio-demográficos (esquizofrenia)

Microarranjo			
Características	Controle N=21	Paciente N=18	Valor de P
Sexo	11F – 10M	7F – 11M	0.50 ^Ω
Idade	32,4±7,8	34,3±9,8	
Medicação	-	78,75*	
Validação			
Características	Controle N=19	Paciente N=17	
Sexo	10F – 9M	7F – 10M	0.86 ^Ω
Idade	32,9±7,6	32,4±9,7	
Medicação	-	83,84*	

*: Valor apresentado em mg de clorpromazina equivalente. ^Ω: teste t.

A tabela 4 apresenta os dados sócio-demográficos dos pacientes e controles que participaram dos estudos de microarranjo e validação. Amostras de dezenove controles e dezessete pacientes que participaram do estudo de microarranjo foram utilizadas para o estudo de validação. As amostras selecionadas foram pareadas por sexo e idade. Do total de 21 controles no estudo de microarranjo, onze são mulheres e dez homens, com média de idade de 32,4±7,8 anos. Já no grupo de 18 pacientes, sete são mulheres e 11 são homens, com média de idade de 34,3±9,8 anos. Não houve diferença significativa (p=0,5 e p=0,86) entre as idades dos controles comparados aos pacientes. O valor da medicação de clorpromazina equivalente foi de 78,75 mg no grupo paciente do estudo de microarranjo e 83,84 mg no grupo paciente do estudo de validação.

4.1.2. Níveis de expressão de MMP16 e GALNT6 não está alterada em pacientes comparado aos controles em ambas condições de tratamento.

Análises da expressão gênica foram feitas em amostras de fibroblastos dérmicos de pacientes com esquizofrenia e controles saudáveis. Os níveis de MMP16 e GALNT6 não diferem entre pacientes e controles nas duas condições apresentadas, veículo (DMSO) e sob estresse oxidativo (tBHQ).

Foram analisadas a expressão relativa de MMP16 entre o grupo controle e paciente em condições normais e com o pró-oxidante tBHQ ($p=0,26$ e $p=0,17$ respectivamente). O tratamento com pró-oxidante tBHQ não alterou os níveis de expressão de MMP16 no grupo controle ($p=0,31$) como também foi observado no grupo de pacientes ($p=0,90$).

Os níveis de expressão relativa de GALNT6 não diferem entre pacientes e controles em condições normais e sob tratamento com tBHQ ($p=0,74$ e $p=0,18$ respectivamente). Em condições de estresse oxidativo, os níveis de GALNT6 aumentaram sob efeito do pró-oxidante tBHQ no grupo controle, indicando uma resposta ao tratamento ($p=0,04$). Já no grupo de pacientes não houve efeito do tBHQ nos níveis de expressão de GALNT6 ($p=0,19$). **Figura 2.**

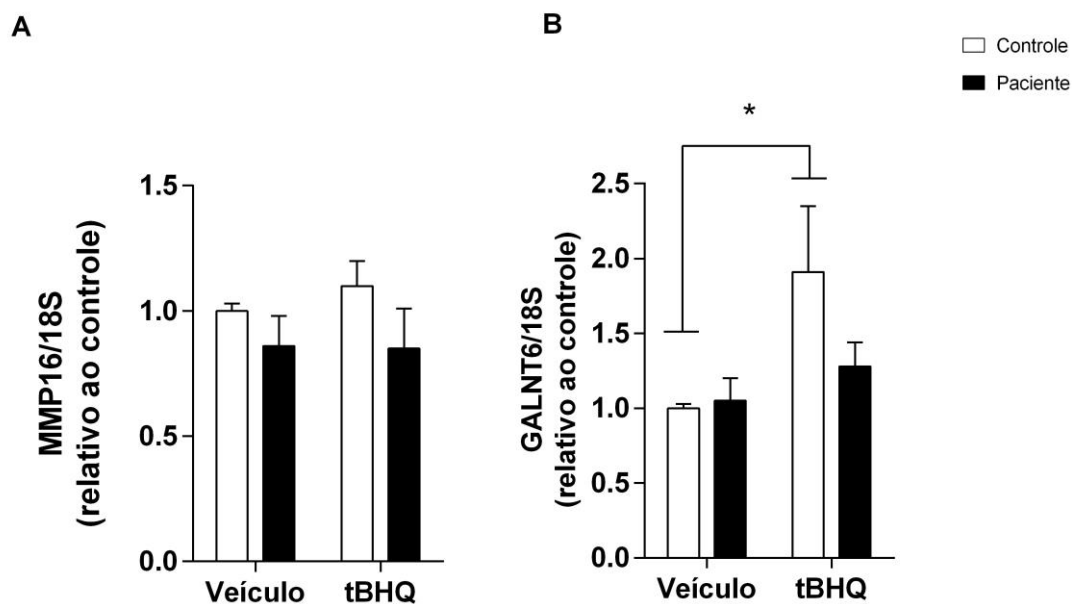


Figura 7: Níveis de expressão relativa de MMP16 e GALNT6 em pacientes com esquizofrenia e controles saudáveis.

Fibroblastos de pacientes com esquizofrenia (n=17) e indivíduos saudáveis (n=19) foram cultivados e tratados com o pró-oxidante tBHQ ou com veículo da diluição, DMSO por 18 horas. Representação gráfica da análise de expressão de MMP16 (A) e GALNT6 (B) em fibroblastos de pacientes e controles normalizada pelos níveis de 18S (gene de referência) encontrada no grupo controle com veículo. tBHQ: tert-butilhidroquinona; DMSO: dimetil sulfoxido. Os resultados nos gráficos representam a média fold change $\pm$ SEM, considerando $p < 0,05$ (teste t).

4.1.3. Níveis de expressão de SULF1, ADAMTS1 e ACSL1 não estão alterados em pacientes comparados aos controles em ambas condições de tratamento.

Não foi observado diferença estatística entre os níveis de expressão de SULF1 em pacientes quando comparados aos controles em condições normais ($p=0,33$) e sob estresse oxidativo ($p=0,33$). Porém, foi observada uma diminuição dos níveis de SULF1 em amostras de fibroblastos tratados com tBHQ ($p<0,001$) no grupo controle e nenhuma alteração no grupo de pacientes ($p=0,79$).

O nível de expressão de ADAMTS1 não se alterou em pacientes comparados aos controles tanto no veículo como sob ação do tBHQ ($p=0,16$ e $p=0,29$ respectivamente). Entretanto, uma diminuição dos níveis de ADAMTS1 foi detectada no grupo de pacientes com o pró-oxidante comparado ao veículo ($p=0,003$), indicando uma resposta ao tratamento. Nenhuma alteração foi vista no grupo controle.

Não houve alteração nos níveis de ACSL1 entre pacientes e controles nas duas condições veículo e tBHQ ($p=0,33$ e $p=0,34$ respectivamente). Amostras de fibroblastos do grupo controle submetidas ao tratamento com tBHQ mostraram uma tendência de aumento dos níveis de ACSL1 quando comparadas ao grupo controle-veículo ($p=0,09$). Nenhuma alteração foi observada no grupo pacientes. **Figura 3.**

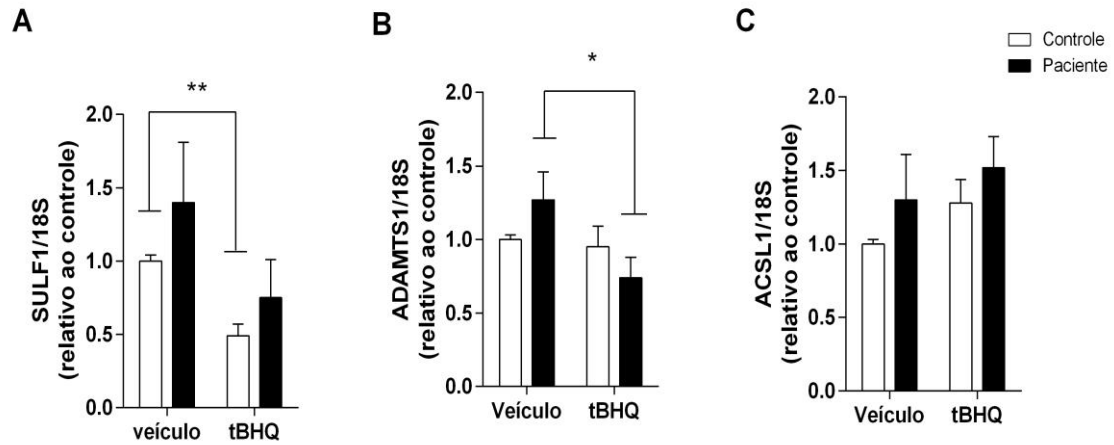


Figura 8: Níveis de expressão relativa de SULF1, ADAMTS1 e ACSL1 em pacientes com esquizofrenia e controles saudáveis.

Amostras de fibroblastos de pacientes com esquizofrenia (n=17) e indivíduos saudáveis (n=19) foram cultivados e tratados com tBHQ ou veículo diluidor (DMSO) por 18 horas. Representação gráfica dos níveis de expressão gênica relativa de SULF1 (A), ADAMTS1 (B) e ACSL1 (C) de pacientes e controles normalizada pelo 18S (gene de referência) encontrada no grupo controle com veículo. tBHQ: tert-butilhidroquinona; DMSO: dimetil sulfoxido. Os resultados nos gráficos representam a média fold change $\pm$ SEM, considerando $p < 0,05$ (teste t).

4.1.4. Níveis de expressão da proteína MT3-MMP inativa e solúvel não estão alteradas em pacientes com esquizofrenia comparados aos controles saudáveis.

Amostras de fibroblastos de pacientes com esquizofrenia e de indivíduos saudáveis foram usadas para avaliar os níveis protéicos das enzimas codificadas pelo gene MMP16. O gene MMP16 codifica a enzima MT3-MMP em duas formas: inserida na membrana ou solúvel. O anticorpo utilizado no estudo foi capaz de detectar duas isoformas: inativa ligada à membrana (65 kDa) e solúvel (45 kDa). Não houve alteração nos níveis das isoformas, inativa ligada à membrana e solúvel, nos pacientes comparados aos controles, tanto veículo quanto tBHQ ($p=0,38$ e $p=0,72$ respectivamente). Porém, o nível da isoforma de MT3-MMP inativa ligada à membrana aumentou quando submetidas à exposição do tBHQ tanto no grupo controle quanto no grupo paciente ($p < 0,0001$ em ambas). Já os níveis da isoforma MT3-MMP solúvel aumentaram sob ação do tBHQ somente no grupo controle ($p=0,007$).

Figura 4.

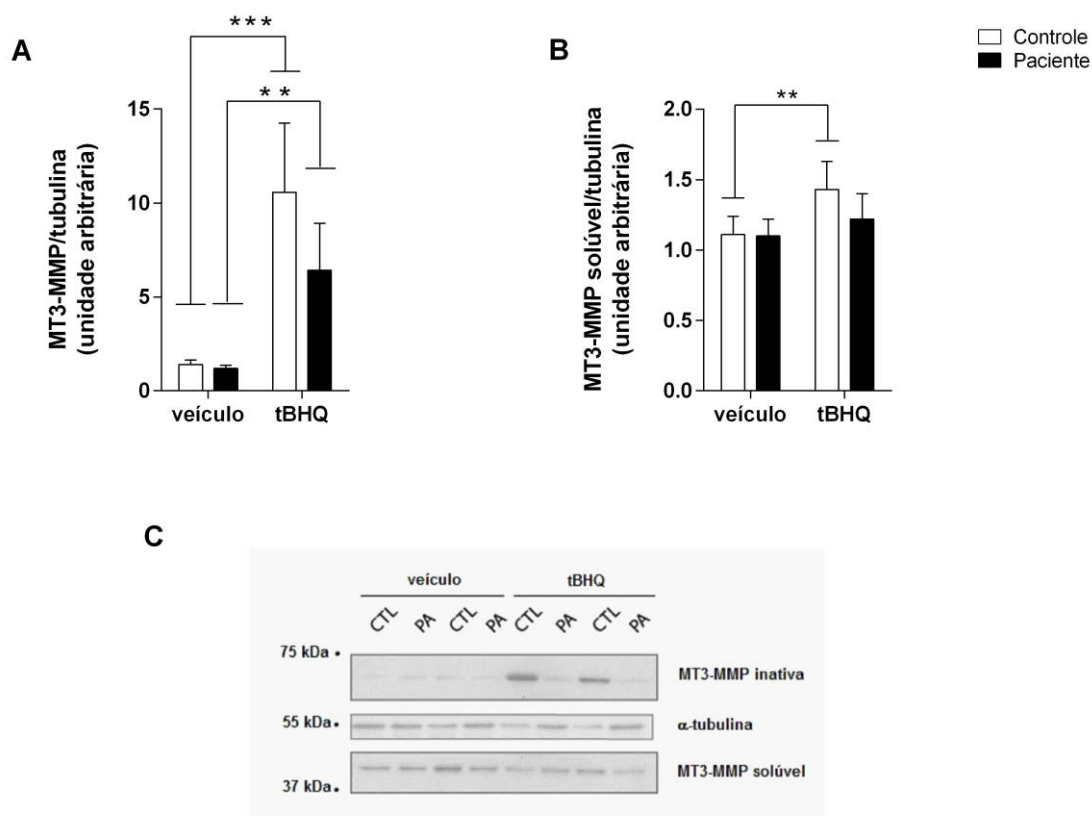


Figura 9: Níveis de MT3-MMP inativa ligada à membrana e MT3-MMP solúvel em amostras de fibroblastos de pacientes com esquizofrenia e controles saudáveis.

Amostras de fibroblastos de pacientes com esquizofrenia (n=17) e indivíduos saudáveis (n=18) foram usadas para detecção e quantificação das proteínas MT3-MMP codificadas pelo gene MMP16. As amostras foram divididas em dois grupos e submetidas ao tratamento com pró-oxidante tBHQ ou com o veículo diluidor, DMSO. Representação gráfica dos níveis de expressão da proteína MT3-MMP inativa ligada à membrana (A) e MT3-MMP solúvel (B) normalizada pelos níveis de α -tubulina (proteína de referência) em fibroblastos de pacientes e controles saudáveis. (C) Figura representativa da imunodeteção das proteínas MT3-MMP inativa e MT3-MMP solúvel composta por amostras de dois pacientes e dois controles submetidas ao tratamento com tBHQ ou veículo. A quantificação das bandas e os níveis relativos foram apresentados nos gráficos A e B. Os resultados nos gráficos representam a média $\pm$ SEM, considerando $p < 0,05$ (teste de modelo linear misto).

4.1.5. Níveis de Galnac T6 estão alterados em pacientes com esquizofrenia comparados aos controles saudáveis.

Amostras de fibroblastos de pacientes com esquizofrenia e de indivíduos saudáveis foram usadas para avaliar os níveis protéicos da enzima Galnac T6 (72 kDa) codificada pelo gene GALNT6. Amostras de fibroblastos de pacientes apresentaram níveis reduzidos de Galnac T6 em relação aos controles em ambas condições, veículo e tBHQ ($p=0,04$). Foi observado também uma diminuição ($p=0,06$) dos níveis de Galnac T6 nas amostras de pacientes sob efeito do pró-oxidante tBHQ em relação as amostras do veículo correspondente. Não foi observado efeito do tBHQ nas amostras dos controles ($p=0,15$). **Figura 5.**

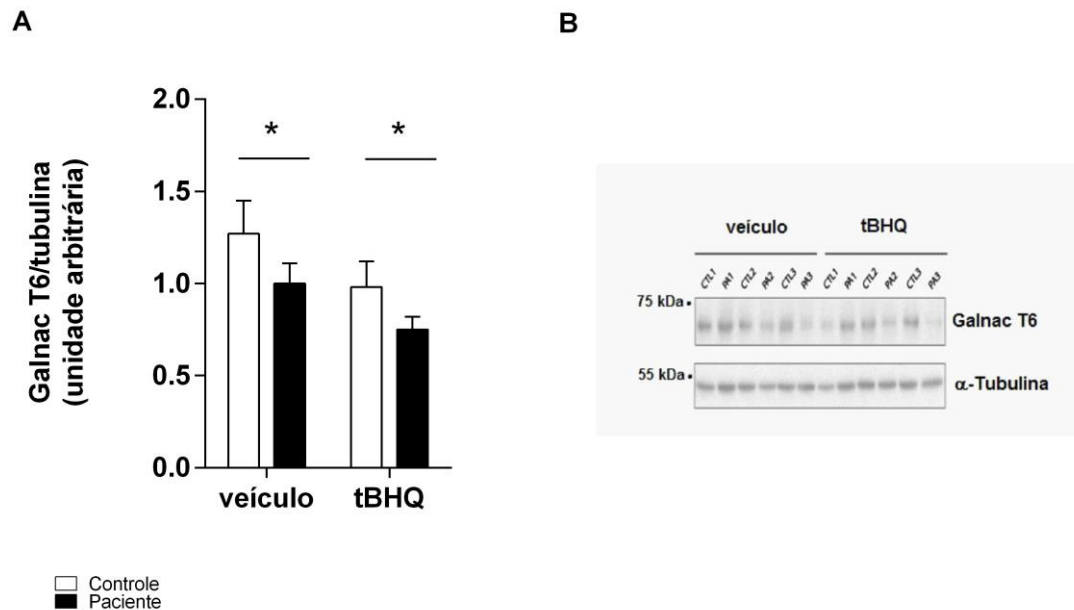


Figura 10: Níveis de Galnac T6 em amostras de fibroblastos de pacientes com esquizofrenia e controles saudáveis.

Amostras de fibroblastos de pacientes com esquizofrenia (n=17) e indivíduos saudáveis (n=18) foram usadas para detecção e quantificação da proteína Galnac T6 codificada pelo gene GALNT6. As amostras foram divididas em dois grupos e submetidas ao tratamento com pró-oxidante tBHQ ou com o veículo diluidor, DMSO. Representação gráfica dos níveis de expressão da proteína Galnac T6 **(A)** normalizada pelos níveis de α -tubulina (proteína de referência) em fibroblastos de pacientes e controles saudáveis. **(B)** Figura representativa da imunodeteção da proteína Galnac T6 composta por amostras de três pacientes e três controles submetidas ao tratamento com tBHQ ou veículo. A quantificação das bandas e os níveis relativos foram apresentados no gráfico **A**. Os resultados no gráfico representam a média $\pm$ SEM, considerando $p < 0,05$ (teste de modelo linear misto).

4.2. Parte II

Os resultados dessa seção referem-se aos resultados preliminares dos experimentos realizados com amostras de fibroblastos de pacientes com transtorno bipolar e controles saudáveis comparados aos resultados obtidos com as amostras de pacientes com esquizofrenia.

4.2.1. Dados sócio-demográficos

Tabela 5: Dados sócio-demográficos (transtorno bipolar)

	Controles N=7	Pacientes N=11	Valor de p
	N ou média±DPM		
Sexo	3F – 4M	7F – 4M	-
Idade	37,4±11,1	39±10,4	0,75*
Escolaridade (anos de estudo)	6,7±1,6	9±1,86	0,014*
Medicação	N e Proporção %		
<i>Quietiapina</i>	-	2 (18%)	-
<i>Ácido valpróico</i>	-	7 (63%)	-
<i>Lítio</i>	-	10 (90%)	-
<i>Clonazepam</i>	-	3 (27%)	-
<i>Bupropiona</i>	-	1 (9%)	-
<i>Fluoxetina</i>	-	3 (27%)	-

*: teste t.

A tabela 5 apresenta os dados sócio-demográficos dos pacientes com transtorno bipolar e controles. No grupo controle, três são mulheres e quatro são homens, já no grupo de pacientes são sete mulheres e quatro homens. A média de idade do grupo controle foi de 37,4 anos e 39 anos para o grupo de pacientes. Não houve diferença significativa entre as idades dos dois grupos ($p=0,75$). Os dados de escolaridade também foram coletados, sendo a média de anos de estudo no grupo controle foi de 6,7 anos e 9 anos para o grupo de pacientes (considera-se 8 anos em média o indivíduo com ensino fundamental e ensino médio completo). Houve diferença significativa referente a escolaridade do grupo controle comparado ao grupo de pacientes ($p=0,014$). Já em relação à medicação, o lítio foi a medicação tomada por 90% dos

pacientes o que corresponde ao total de 10 indivíduos. O segundo medicamento mais usado é o ácido valpróico (63%). Esse valor refere-se aos sete pacientes que faziam o uso combinado de lítio e ácido valpróico. Nenhum paciente fazia uso de ácido valpróico isolado. Do total de 11 pacientes, somente 2 indivíduos estavam em monoterapia em uso de lítio. Os demais faziam uso de antidepressivo, ansiolítico e antipsicótico.

4.2.2. Níveis de MMP16 e GALNT6 não estão alterados em pacientes comparados aos controles em ambas condições de tratamento.

Amostras de fibroblastos de pacientes bipolares e indivíduos saudáveis foram usadas para avaliar os níveis de MMP16 e GALNT6.

Os dados preliminares indicaram nenhuma alteração nos níveis de MMP16 em pacientes comparados aos controles, no veículo ($p=0,39$) e sob ação do tBHQ ($p=0,46$). O tratamento com pró-oxidante tBHQ não alterou os níveis de expressão de MMP16 no grupo controle ($p=0,15$) e no grupo de pacientes ($p=0,85$).

Os níveis de expressão relativa de GALNT6 também não diferem entre pacientes e controles em condições normais e sob tratamento com tBHQ ($p=0,82$ e $p=0,32$ respectivamente). Em condições de estresse oxidativo, foi observado uma forte tendência ($p=0,05$) de aumento dos níveis de GALNT6 no grupo de pacientes. Já no grupo controle não houve efeito do tBHQ nos níveis de expressão de GALNT6 ($p=0,63$). **Figura 6.**

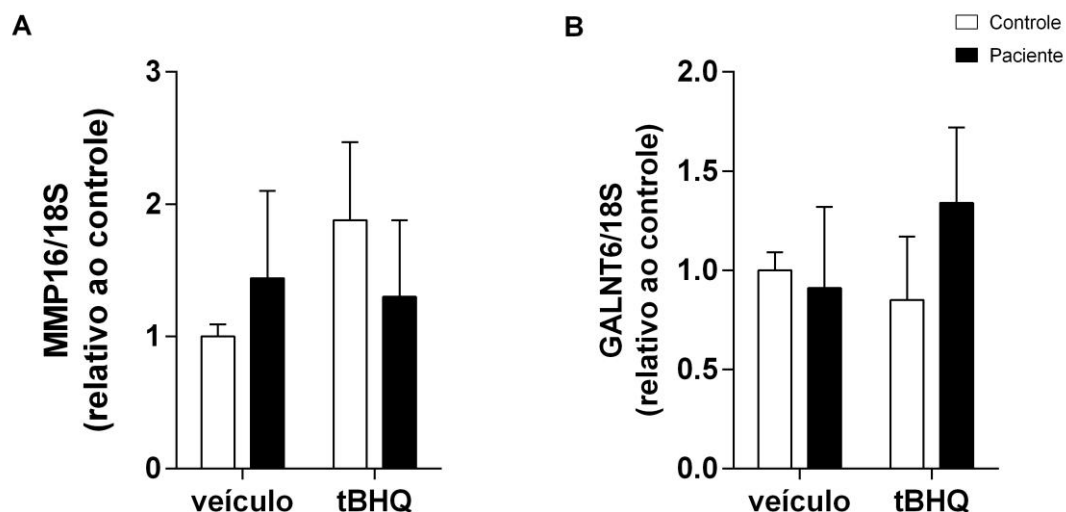


Figura 11: Níveis de expressão relativa de MMP16 e GALNT6 em amostras de fibroblastos de pacientes bipolares e controles saudáveis.

Fibroblastos de pacientes bipolares (n=11) e indivíduos saudáveis (n=7) foram cultivados e tratados com o pró-oxidante tBHQ ou com veículo da diluição, DMSO por 18 horas. Representação gráfica da análise de expressão de MMP16 **(A)** e GALNT6 **(B)** em fibroblastos de pacientes e controles normalizada pelos níveis de 18S (gene de referência) encontrada no grupo controle com veículo. tBHQ: tert-butilhidroquinona; DMSO: dimetil sulfoxido. Os resultados nos gráficos representam a média fold change $\pm$ SEM, considerando $p < 0,05$ (teste t).

4.2.3. Níveis de expressão de SULF1, ADAMTS1 e ACSL1 não estão alterados em pacientes bipolares comparados aos controles em ambas condições de tratamento.

Não foi observado diferença estatística entre os níveis de expressão de SULF1 em pacientes quando comparados aos controles em condições normais ($p=0,27$) e sob estresse oxidativo ($p=0,30$). Nenhuma resposta à exposição ao tBHQ foi observada no grupo controle ($p=0,90$) e no grupo de pacientes ($p=0,77$).

Foi observado uma tendência de aumento do nível de expressão de ADAMTS1 em pacientes comparado aos controles ($p=0,08$) no veículo (DMSO), mas não sob ação do tBHQ ($p=0,14$). Além disso, um aumento dos níveis de ADAMTS1 foi detectada no grupo controle com o pró-oxidante comparado ao veículo ($p=0,04$), mas não foi observada alteração no grupo de pacientes ($p=0,11$).

Observou-se uma tendência de aumento dos níveis de ACSL1 em pacientes comparados aos controles ($p=0,10$) no veículo e nenhuma alteração significativa no tratamento com tBHQ ($p=0,31$). Nas amostras de fibroblastos do grupo controle no tBHQ observou-se um aumento dos níveis de ACSL1 quando comparadas ao grupo controle-veículo ($p=0,01$). Não houve resposta ao pró-oxidante no grupo de pacientes ($p=0,60$). **Figura 7.**

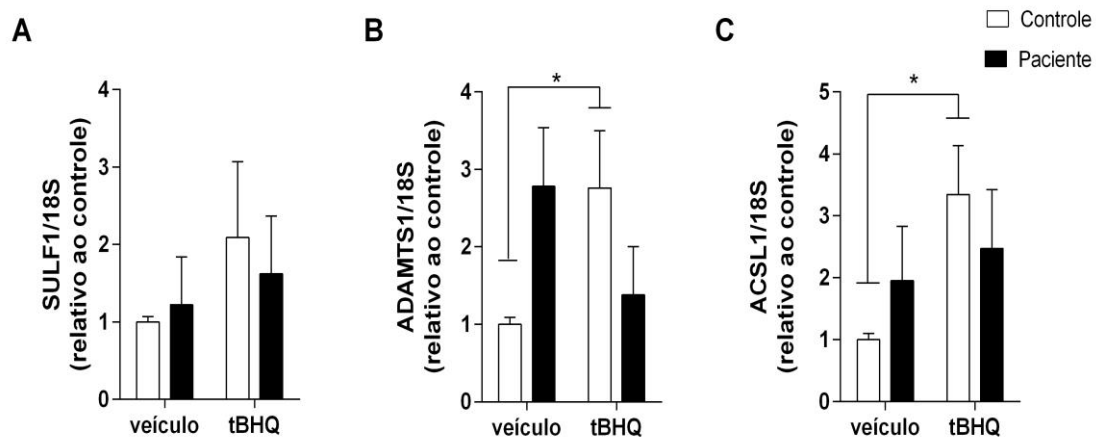


Figura 12: Níveis de expressão relativa de SULF1, ADAMTS1 e ACSL1 em pacientes com esquizofrenia e controles saudáveis.

Amostras de fibroblastos de pacientes bipolares (n=11) e indivíduos saudáveis (n=7) foram cultivados e tratados com tBHQ ou veículo diluidor (DMSO) por 18 horas. Representação gráfica dos níveis de expressão gênica relativa de SULF1 **(A)**, ADAMTS1 **(B)** e ACSL1 **(C)** de pacientes e controles normalizada pelo 18S (gene de referência) encontrada no grupo controle com veículo. tBHQ: tert-butilhidroquinona; DMSO: dimetil sulfoxido. Os resultados nos gráficos representam a média fold change $\pm$ SEM, considerando $p < 0,05$ (teste t).

5. DISCUSSÃO

5.1. Fibroblastos de pacientes com esquizofrenia.

Os participantes do estudo de validação eram os mesmos participantes do estudo de microarranjo. Apenas uma amostra de um paciente não pode ser incluída no estudo de validação. Por esse motivo, nota-se a diferença entre os valores da medicação, clorpromazina equivalente. Os pacientes com esquizofrenia, no momento do recrutamento do estudo, eram adultos jovens, fazendo uso de uma baixa dosagem de medicação, não estavam internados ou se encontravam na fase aguda. Eram pacientes estáveis, e especula-se que apresentavam poucos sintomas positivos, visto a dosagem reduzida da medicação.

O presente estudo foi realizado com o objetivo de validar os resultados de expressão gênica obtidos no estudo utilizando a técnica de microarranjo, no qual empregou-se fibroblastos dérmicos de pacientes com esquizofrenia.

Os níveis de expressão do gene MMP16 e GALNT6 encontravam-se reduzidos e os níveis de SULF1, ADAMTS1 e ACSL1 aumentados em pacientes comparados aos controles pela técnica de microarranjo. Essas alterações na expressão gênica entre pacientes e controles não foram observadas nos experimentos de PCR quantitativo, de modo que não puderam, então, serem validadas. Porém, algumas variáveis metodológicas podem interferir na quantificação da expressão gênica e precisam ser consideradas. Existem várias etapas cruciais para realizar a técnica de microarranjo e os dados obtidos sofrem a influência de muitas fontes de variações (WEST, 2003). As variações técnicas, por exemplo incluem o processo de preparação das amostras. Para ambos os experimentos,

microarranjo e PCR quantitativo, foram usadas amostras de fibroblastos provenientes dos mesmos pacientes, sob as mesmas condições de cultivo e tratamento com o pró-oxidante tBHQ. Entretanto, a extração do RNA e a síntese do cDNA realizadas para a técnica de microarranjo diferem do modo como foi realizado para a técnica de PCR quantitativo. A diferença dos métodos podem explicar, em partes, a diferença entre os resultados obtidos entre ambas as técnicas. Além disso, existem outras variações técnicas que podem ocorrer durante a preparação do próprio experimento do microarranjo e acabam sendo incorporadas às medidas de expressão gênica de interesse. (CHEN et al., 2004). Tais como, identificação das amostras através da incorporação de corantes (diferentes colorações ou quantidade entre os materiais utilizados), procedimento de construção do experimento (número de sondas, quantidade de cDNA aplicado no arranjo, temperatura de hibridização e método de detecção (CHEN et al., 2004). Uma outra dificuldade apontada para os experimentos de microarranjo é a necessidade de se analisar uma enorme quantidade de genes avaliados sob poucas unidades amostrais (muito comum em microarranjos devido ao alto custo experimental), resultando no paradigma “*large p, small n*” (LI & HONG, 2001; WEST, 2003) . A técnica de PCR tem recentemente alcançado um nível de sensibilidade, confiabilidade e praticidade que suporta seu uso como um bioinstrumento de rotina para quantificação de expressão gênica, sendo atualmente considerado o método mais apropriado para confirmar os dados gerados por microarranjo (PROVENZANO and MOCELLIN, 2007). Entretanto, o problema de múltiplos testes estatísticos empregados no microarranjo pode ter resultado em falsos positivos e que não puderam ser validados pela técnica de PCR quantitativo,

que é mais específica. Por outro lado, os resultados obtidos da técnica de microarranjo condizem com estudos da literatura que relatam alterações na ECM em esquizofrenia. Talvez, se a técnica de PCR quantitativo for realizada com um n amostral maior, a alteração de expressão gênica em pacientes poderia ser observada e desta forma, os dados de microarranjo seriam validados. Os resultados obtidos por PCR quantitativo, na sua maioria, seguem a mesma tendência de aumento ou diminuição dos níveis de todos os genes analisados no estudo do microarranjo.

Os níveis de MMP16 estavam diminuídos em pacientes, no estudo de microarranjo, mas esta alteração não foi observada pelo PCR quantitativo. No entanto, apesar dos valores não terem significância estatística, os níveis de MMP16 do grupo controle, mas não no grupo de pacientes, aumentam levemente na condição de estresse oxidativo. O pró-oxidante tBHQ parece favorecer a transcrição do gene MMP16. Em paralelo, os dados da quantificação das proteínas MT3-MMP (codificada pelo gene MMP16) revelaram um aumento estatístico significativo dos níveis proteicos na condição de estresse oxidativo, indicando que o efeito tBHQ sob esse gene é bem maior em nível de tradução comparado ao nível de transcrição. O aumento dos níveis de MT3-MMP (transmembrana) é menos acentuado no grupo paciente comparado ao grupo controle, ao passo que o aumento dos níveis de MT3-MMP solúvel foi observado somente no grupo controle. Observa-se então que a resposta de aumento de expressão sob ação do pró-oxidante tBHQ é menos eficiente no grupo de pacientes. Assim, os dados sugerem que, em condições de estresse oxidativo, há um comprometimento na tradução da proteína MT3-MMP em pacientes com esquizofrenia. As MMPs

estão expressas em níveis baixos no cérebro de adultos, mas podem ser superreguladas em resposta à uma lesão ou doença (HOWELL and GOTTSCHALL, 2012). MMPs ativas promovem a degradação de alguns componentes da ECM para promover a remodelação sináptica (LUKES et al., 1999; MALEMUD, 2006). Embora não se tenha realizado nenhum ensaio enzimático, os níveis de MT3-MMP reduzidos em pacientes comparado aos controles no estresse oxidativo podem indicar uma maior dificuldade na reorganização da matriz extracelular frente ao estresse, afetando estruturalmente e funcionalmente o tecido.

A redução dos níveis de GALNT6 em pacientes observada no estudo de microarranjo não foi detectada no estudo de validação. Porém, foi possível identificar no estudo de validação um aumento dos níveis de expressão de GALNT6 induzidos pelo estresse oxidativo no grupo controle. O aumento da expressão desse gene na condição de estresse oxidativo pode sugerir um mecanismo protetor da ECM para impedir a degradação dos seus componentes. A enzima Galnac transferase (codificada pelo gene GALNT6) possui a função de glicosilar diversos componentes da ECM e assim mantê-los estáveis e menos susceptíveis a degradação pelas metaloproteinases (XU and MOSHER, 2011). A manutenção da integridade dos componentes da ECM é importante para preservar a atividade antioxidante da matriz (BARROS et al., 2011). Como a exposição ao pró-oxidante não induziu aumento da expressão do gene GALNT6 em pacientes, sugere-se que a integridade da ECM na esquizofrenia pode estar possivelmente mais comprometida. Os resultados da análise proteica apontam para esse mesmo raciocínio. Pacientes com esquizofrenia apresentam níveis reduzidos de galnac T6 comparados aos

controles. Além disso, na condição de estresse oxidativo, os níveis de galnac T6 do grupo paciente apresentam uma tendência de diminuição em relação ao nível basal. Isso indica que a atividade de glicosilação pode estar prejudicada em pacientes com esquizofrenia. Um dos substratos para a galnac transferases é a fibronectina e foi observado que fibroblastos de pacientes com esquizofrenia possuíam uma redução na quantidade desse componente e uma alteração na sua função (MAHADIK et al., 1994). A fibronectina quando não glicosilada torna-se mais susceptível a degradação por MMPs, assim como demais componentes da ECM (MAHADIK et al., 1994). Portanto, pode-se especular que a diminuição dos níveis da enzima Galnac T6 pode ser o fator responsável pela diminuição da glicosilação da fibronectina, comprometendo sua função e tornando-a mais susceptível a degradação. Além disso, um outro componente importante na matriz, em especial a ECM do SNC, a tenascina-R também é um dos substratos para as galnac transferases, possuindo vários sítios de O-glicosilação (WILSON et al., 1991). Então, a redução dos níveis de galnac T6 em pacientes com esquizofrenia pode comprometer a integridade de componentes da ECM e promover a perda da estabilidade estrutural e funcional da ECM.

O estudo do microarranjo revelou um aumento dos níveis de expressão de SULF1 em pacientes comparados aos controles. Pudemos observar uma tendência de aumento dos níveis de expressão desse gene em pacientes no estudo de validação. Além disso, os resultados apontaram para uma diminuição dos níveis do gene na condição de estresse oxidativo em controles, mas sem significância estatística no grupo de pacientes. A remoção do sulfato pela sulfatase 1 dos proteoglicanos HSPG degrada este componente e

interfere na sinalização neuronal, visto que os HSPG sulfatados são co-receptores para vários fatores de transcrição e citocinas, além de moléculas da via Wnt (LAI et al., 2008). Assim, a redução dos níveis de SULF1 nos controles frente ao estresse oxidativo parece sugerir uma função protetora. Os resultados da expressão de SULF1 indicam um provável comprometimento funcional na ECM de pacientes com esquizofrenia.

O estudo de microarranjo também revelou um aumento nos níveis do gene ADAMTS1 em pacientes comparados aos controles, na condição basal. A mesma tendência de aumento foi observada na análise de expressão gênica por PCR quantitativo, porém sem significância estatística. ADAMTS1 é uma metaloproteinase que cliva proteoglicanos, em especial CSPG (HOWELL and GOTTSCHALL, 2012), principal componente da ECM do SNC. Níveis aumentados de ADAMTS1 em pacientes poderiam sugerir uma maior degradação de CSPG. Porém, alguns estudos demonstraram aumento de CSPG em astrócitos, mas redução da expressão deste proteoglicano na rede perineuronal (PNN) em pacientes com esquizofrenia (PANTAZOPOULOS et al., 2013, 2014). A regulação da síntese e clivagem do CSPG na esquizofrenia ainda não é totalmente clara. Neste estudo, foi identificada uma redução da expressão de ADAMTS1 em pacientes sob ação do pró-oxidante. Essa redução poderia indicar um mecanismo de proteção, visto que CSPG possui atividade antioxidante (EGEA et al., 2010; GALTREY and FAWCETT, 2007; KWOK et al., 2012), tornando-o importante quando há uma condição de estresse oxidativo estabelecida na ECM.

Quanto ao gene ACSL, observou-se aumento dos níveis de expressão em pacientes, comparados aos controles em condições basais, no estudo do

microarranjo. Uma tendência de aumento de expressão de ACSL1 no estudo com PCR quantitativo também foi observada no grupo pacientes, sem diferença estatística. O gene ACSL1 está envolvido na síntese lipídica via beta-oxidação e na degradação de ácidos graxos (PANOV et al., 2014). Alguns estudos sugerem que a desregulação redox encontrada na esquizofrenia é um dos mecanismos responsáveis pela alteração da síntese de fosfolipídios, resultando no comprometimento da membrana neuronal (HORROBIN, 1996; MAHADIK and EVANS, 2003). A alteração na regulação da expressão do gene ACSL1 poderia ser um dos fatores genéticos envolvidos no comprometimento da estrutura e função da membrana plasmática, e consequentemente, na neurotransmissão. Mudanças na composição dos ácidos graxos (HORROBIN, 1996; KADDURAH-DAOUK et al., 2007), aumento na degradação de fosfolipídios (KATO et al., 1995; STANLEY et al., 1994) e níveis reduzidos de ácido graxos (ARVINDAKSHAN et al., 2003; BENTSEN et al., 2011; KHAN et al., 2002) já foram relatados em fibroblastos, sangue e cérebro de pacientes com psicose inicial e com esquizofrenia crônica. Esses estudos corroboram o resultado do microarranjo e a tendência de aumento de ACSL1 em pacientes mostrada no estudo com PCR quantitativo.

5.2. Fibroblastos de pacientes com transtorno bipolar.

Os pacientes bipolares brasileiros, selecionados para o estudo, possuíam uma média de idade um pouco acima dos pacientes com esquizofrenia suíços selecionados. Os pacientes bipolares pertencentes ao ambulatório de transtorno bipolar do Hospital das Clínicas possuem na sua maioria idade acima de 35 anos. O transtorno bipolar se inicia entre a segunda e terceira década de vida (GHAEMI et al., 2001). O início precoce é relacionado a uma carga genética maior (CARLSON et al., 2002). Devido ao n amostral pequeno não foi possível parear os níveis de escolaridade e controle. Além disso, também não foi possível separar em dois grupos os pacientes bipolares do tipo I e II, devido ao tamanho amostral reduzido. O fato do grupo bipolar ser heterogêneo quanto aos sintomas pode ter influenciado nos resultados das análises genéticas. Entretanto, como os resultados de expressão gênica obtidos são dados preliminares, acreditamos que com um tamanho amostral maior poderemos neutralizar essa diferença de escolaridade entre as amostras e manter o grupo de bipolar mais homogêneo possível. Em relação à medicação, todos os pacientes faziam uso de estabilizadores de humor (lítio e valproato), apenas um paciente fazia monoterapia por lítio e os demais faziam uso concomitantemente com antidepressivo ou ansiolíticos. Apenas um paciente fazia uso de antipsicóticos. A cultura de fibroblastos foi realizada com cerca de cinco passagens celulares e portanto capaz de minimizar os efeitos da medicação sob as análises de expressão gênica e proteica (FOURNIER et al., 2014).

Para avaliarmos se as alterações na expressão gênica encontradas em esquizofrenia crônica podem ser observadas em outro transtorno psiquiátrico, utilizamos amostras de fibroblastos de pacientes com transtorno bipolar na fase eutímica. Vários estudos relatam importantes características compartilhadas entre a esquizofrenia e o transtorno bipolar, principalmente na fase maníaca da doença (LAURSEN et al., 2009; MAIER et al., 2006). Foram observadas alterações neuropsicológicas (KRABBENDAM et al., 2005), neurofisiológicas (THAKER, 2008) e mudanças anatômicas cerebrais (ARNONE et al., 2009; ELLISON-WRIGHT and BULLMORE, 2010). Além dessas evidências, vários genes de risco em comum já foram identificados (MAIER, 2008; PORTEOUS, 2008), além de neuropatologias como desregulação do sistema de defesa antioxidante (ANDREAZZA et al., 2008) e diminuição de GSH no córtex pré-frontal (GAWRYLUK et al., 2011).

Os resultados da expressão do gene MMP16 em amostras de pacientes com transtorno bipolar são similares aos resultados encontrados nas amostras de pacientes com esquizofrenia crônica. Apesar do tamanho amostral ser pequeno (11 pacientes e 7 controles), o que pode justificar os valores sem significância estatística, foi possível identificar uma mesma projeção de aumento dos níveis de expressão de MMP16 no grupo controle sob ação do pró-oxidante. As MMPs em geral são expressas em níveis reduzidos, mas sua expressão aumenta quando ocorre algum estresse, lesão ou doença (YONG, 2005; YONG et al., 2001). O aumento da expressão desse gene na condição de estresse oxidativo pode indicar uma degradação dos componentes da ECM na tentativa de remodelação e rearranjo estrutural da matriz. A falta da resposta ao estresse no grupo paciente pode sugerir uma falha nesse

mecanismo de reparo, prejudicando funcionalmente a própria ECM e a remodelação sináptica. Faz-se necessário estudos posteriores para avaliar o nível proteico e a função enzimática da proteína codificada pelo gene MMP16 nas amostras de pacientes bipolares, para melhor entender a relação desse gene/proteína e o transtorno bipolar.

Os níveis do gene GALNT6 em amostras de pacientes bipolares diferem dos níveis observados em amostras de pacientes com esquizofrenia. Observa-se um leve aumento da expressão do gene GALNT6 no grupo paciente ao estímulo do pró-oxidante, ao passo que nas amostras de pacientes com esquizofrenia não houve qualquer resposta. O aumento dos níveis de GALNT6 poderia sugerir uma resposta protetora, visto que a proteína galnac T6 promove a glicosilação dos componentes da ECM (BENNETT et al., 2012) mantendo-a estável e menos susceptível a degradação. Porém a variabilidade nos níveis de expressão pode representar um fator perturbador na interpretação desse resultado. Com um tamanho amostral maior e análises proteicas podem ajudar a elucidar a existência da relação entre o gene GALNT6 e o transtorno bipolar. Os resultados do gene SULF1 também diferem dos resultados analisados nas amostras de pacientes com esquizofrenia. Na condição de estresse oxidativo, os níveis de expressão de SULF1 do grupo de pacientes não se alteram, mas observa-se um aumento no grupo controle, sem significância estatística. O aumento dos níveis de sulf1 podem talvez sugerir uma maior quantidade de tradução da enzima sulf1, o que resultaria no aumento da remoção de sulfatos nos componentes da ECM. Isso implicaria na degradação da ECM, facilitando a sua remodelação e promovendo a plasticidade. Tais atividade estariam preservadas somente nos controles.

Pacientes com transtorno bipolar possuem uma tendência a expressar mais ADAMTS1 em condições basais do que controle. Em contrapartida, somente os controles aumentam a expressão do gene sob estímulo do pró-oxidante. ADAMTS1 é uma das enzimas responsáveis por clivar proteoglicanos, CSPG em particular (FLANNERY, 2006; HOWELL and GOTTSCHALL, 2012; WANG and FAWCETT, 2012). O aumento da expressão do gene ADAMTS1 na condição de estresse oxidativo observado nos controles pode indicar uma tentativa de remodelação e rearranjo da ECM. Porém, um aumento da transcrição desse gene em condições basais no grupo de pacientes pode implicar em uma maior susceptibilidade à degradação da matriz extracelular. A inclusão de estudos de análise proteica poderá ajudar a determinar se há uma alteração na quantidade e na atividade da enzima ADAMTS1 em condições basais. E assim, esses novos dados contribuiriam para fortalecer a evidência da associação entre ADAMTS1 e transtorno bipolar.

E por fim, foi observado uma tendência de aumento nos níveis do gene ACSL1 em pacientes comparados aos controles a nível basal. Dado este, semelhante ao encontrado nas amostras de pacientes com esquizofrenia. Somente o grupo controle apresentou níveis elevados de ACSL1 sob ação do pró-oxidante. Aumento da expressão de ACSL1 apresentado no grupo de pacientes pode indicar uma desregulação na síntese lipídica e na degradação de ácidos graxos. Vários são os estudos que corroboram nossos dados. Estudos demonstraram aumento anormal de ácido graxos, como ácido linoleico, ácido palmítico e ácido araquidônico (principais substratos de ACSL1) em pacientes bipolares (LIU et al., 2014; MCNAMARA et al., 2014). Além disso, drogas utilizadas no tratamento de transtorno bipolar, como os

estabilizadores de humor, lítio e valproato, tem como alvo inibidores da síntese do ácido graxos, em especial o ácido araquidônico (BAZINET, 2009; BAZINET et al., 2006; CHANG et al., 2001; LIU et al., 2014; RAPOPORT and BOSETTI, 2002). Modelo animal para transtorno bipolar foi proposto através da privação de n-3-ácido graxo poliinsaturado, resultando na diminuição dos níveis de BDNF, alteração vista no transtorno bipolar (RAO et al., 2007).

6. CONCLUSÃO

A técnica de microarranjo permitiu a identificação de um conjunto de genes relacionados à matriz extracelular diferentemente expressos entre paciente com esquizofrenia crônica e controles. Alterações na matriz extracelular tanto em esquizofrenia quanto no transtorno bipolar já está bem documentada na literatura. O estudo de validação não permitiu identificar diferença significativa na expressão dos genes selecionados, porém todos os resultados seguem a mesma tendência de expressão observada no microarranjo. Os pacientes bipolares compartilham similaridades na expressão de alguns genes, como o MMP16 e o ACSL1 revelando alterações em comum. E em outros genes, a expressão foi diferenciada, mostrando que também há mecanismos opostos na regulação da integridade e funcionalidade da matriz extracelular.

Devido as evidências descritas na literatura, de todos os genes analisados, ADAMTS1 (transtorno bipolar) GALNT6 (esquizofrenia) e ACSL1 (transtorno bipolar e esquizofrenia) são os candidatos que poder estar potencialmente envolvidos da fisiopatologia dos dois transtornos psiquiátricos estudados. Mais estudos são necessários para elucidar a funcionalidade das enzimas codificadas por esses genes, para o melhor entendimento do comprometimento da matriz extracelular na esquizofrenia e no transtorno bipolar. Além disso, a cultura de fibroblastos se mostrou um modelo *in vitro* bastante útil para a investigação da expressão gênica relativa e expressão de proteínas em transtornos psiquiátricos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDREAZZA, A. C. et al. Serum S100B and antioxidant enzymes in bipolar patients. **Journal of psychiatric research**, v. 41, n. 6, p. 523–9, set. 2007.

ANDREAZZA, A. C. et al. Oxidative stress markers in bipolar disorder: a meta-analysis. **Journal of affective disorders**, v. 111, n. 2-3, p. 135–44, dez. 2008.

ARNONE, D. et al. Magnetic resonance imaging studies in bipolar disorder and schizophrenia: meta-analysis. **The British journal of psychiatry : the journal of mental science**, v. 195, n. 3, p. 194–201, set. 2009.

ARVINDAKSHAN, M. et al. Supplementation with a combination of omega-3 fatty acids and antioxidants (vitamins E and C) improves the outcome of schizophrenia. **Schizophrenia research**, v. 62, n. 3, p. 195–204, 1 ago. 2003.

AUBURGER, G. et al. Primary skin fibroblasts as a model of Parkinson's disease. **Molecular neurobiology**, v. 46, n. 1, p. 20–7, ago. 2012.

BAINS, J. S.; SHAW, C. A. Neurodegenerative disorders in humans: the role of glutathione in oxidative stress-mediated neuronal death. **Brain research. Brain research reviews**, v. 25, n. 3, p. 335–58, dez. 1997.

BARROS, C. S.; FRANCO, S. J.; MÜLLER, U. Extracellular matrix: functions in the nervous system. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 3, n. 1, p. a005108, jan. 2011.

BAZINET, R. P. et al. Chronic carbamazepine decreases the incorporation rate and turnover of arachidonic acid but not docosahexaenoic acid in brain phospholipids of the unanesthetized rat: relevance to bipolar disorder. **Biological psychiatry**, v. 59, n. 5, p. 401–7, 1 mar. 2006.

BAZINET, R. P. Is the brain arachidonic acid cascade a common target of drugs used to manage bipolar disorder? **Biochemical Society transactions**, v. 37, n. Pt 5, p. 1104–9, out. 2009.

BEECHAM, G. W. et al. Genome-wide association meta-analysis of neuropathologic features of Alzheimer's disease and related dementias. **PLoS genetics**, v. 10, n. 9, p. e1004606, set. 2014.

BELMAKER, R. H.; BERSUDSKY, Y. Bipolar disorder: Mania and depression. **Discovery medicine**, v. 4, n. 23, p. 239–45, out. 2004.

BENNETT, E. P. et al. Control of mucin-type O-glycosylation: a classification of the polypeptide GalNAc-transferase gene family. **Glycobiology**, v. 22, n. 6, p. 736–56, jun. 2012.

BENTSEN, H. et al. Bimodal distribution of polyunsaturated fatty acids in schizophrenia suggests two endophenotypes of the disorder. **Biological psychiatry**, v. 70, n. 1, p. 97–105, 1 jul. 2011.

BERRETTA, S. et al. Losing the sugar coating: Potential impact of perineuronal net abnormalities on interneurons in schizophrenia. **Schizophrenia research**, 16 jan. 2015.

BHARATH, S. et al. Glutathione, iron and Parkinson's disease. **Biochemical pharmacology**, v. 64, n. 5-6, p. 1037–48, set. 2002.

BRIETZKE, E. et al. A theoretical framework informing research about the role of stress in the pathophysiology of bipolar disorder. **Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry**, v. 39, n. 1, p. 1–8, 1 out. 2012.

BURNSIDE, E. R.; BRADBURY, E. J. Manipulating the extracellular matrix and its role in brain and spinal cord plasticity and repair. **Neuropathology and applied neurobiology**, v. 40, n. 1, p. 26–59, fev. 2014.

BUXBAUM, J. D. et al. Molecular dissection of NRG1-ERBB4 signaling implicates PTPRZ1 as a potential schizophrenia susceptibility gene. **Molecular psychiatry**, v. 13, n. 2, p. 162–72, fev. 2008.

CABUNGCAL, J.-H. et al. Early-life insults impair parvalbumin interneurons via oxidative stress: reversal by N-acetylcysteine. **Biological psychiatry**, v. 73, n. 6, p. 574–82, 15 mar. 2013a.

CABUNGCAL, J.-H. et al. Perineuronal nets protect fast-spiking interneurons against oxidative stress. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 22, p. 9130–5, 28 maio 2013b.

CARLSON, G. A. et al. Age at onset, childhood psychopathology, and 2-year outcome in psychotic bipolar disorder. **The American journal of psychiatry**, v. 159, n. 2, p. 307–9, fev. 2002.

CHANG, M. C. et al. Chronic valproate treatment decreases the in vivo turnover of arachidonic acid in brain phospholipids: a possible common effect of mood stabilizers. **Journal of neurochemistry**, v. 77, n. 3, p. 796–803, maio 2001.

CHEN, J. J. et al. Analysis of variance components in gene expression data. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 20, n. 9, p. 1436–46, 12 jun. 2004.

CORFAS, G.; ROY, K.; BUXBAUM, J. D. Neuregulin 1-erbB signaling and the molecular/cellular basis of schizophrenia. **Nature neuroscience**, v. 7, n. 6, p. 575–80, jun. 2004.

CUI, H. et al. Proteoglycans in the central nervous system: role in development, neural repair, and Alzheimer's disease. **IUBMB life**, v. 65, n. 2, p. 108–20, fev. 2013.

DEEPA, S. S. et al. Composition of perineuronal net extracellular matrix in rat brain: a different disaccharide composition for the net-associated proteoglycans. **The Journal of biological chemistry**, v. 281, n. 26, p. 17789–800, 30 jun. 2006.

DEKOSKY, S. T. et al. Effects of post-injury hypothermia and nerve growth factor infusion on antioxidant enzyme activity in the rat: implications for clinical therapies. **Journal of neurochemistry**, v. 90, n. 4, p. 998–1004, ago. 2004.

DO, K. Q. et al. Redox dysregulation, neurodevelopment, and schizophrenia. **Current opinion in neurobiology**, v. 19, n. 2, p. 220–30, abr. 2009.

DOW, D. J. et al. ADAMTSL3 as a candidate gene for schizophrenia: gene sequencing and ultra-high density association analysis by imputation. **Schizophrenia research**, v. 127, n. 1-3, p. 28–34, abr. 2011.

DRINGEN, R. Glutathione metabolism and oxidative stress in neurodegeneration. **European journal of biochemistry / FEBS**, v. 267, n. 16, p. 4903, ago. 2000.

DRINGEN, R.; GUTTERER, J. M.; HIRRLINGER, J. Glutathione metabolism in brain Metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defense against reactive oxygen species. v. 4916, p. 4912–4916, 2000.

DRINGEN, R.; PAWLOWSKI, P. G.; HIRRLINGER, J. Peroxide detoxification by brain cells. **Journal of neuroscience research**, v. 79, n. 1-2, p. 157–65, jan. .

EASTWOOD, S. L.; HARRISON, P. J. Interstitial white matter neurons express less reelin and are abnormally distributed in schizophrenia: towards an integration of molecular and morphologic aspects of the neurodevelopmental hypothesis. **Molecular psychiatry**, v. 8, n. 9, p. 769, 821–31, set. 2003.

EGEA, J. et al. Antioxidant, antiinflammatory and neuroprotective actions of chondroitin sulfate and proteoglycans. **Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society**, v. 18 Suppl 1, p. S24–7, jun. 2010.

ELLISON-WRIGHT, I.; BULLMORE, E. Anatomy of bipolar disorder and schizophrenia: a meta-analysis. **Schizophrenia research**, v. 117, n. 1, p. 1–12, mar. 2010.

FARHY TSELNICKER, I.; BOISVERT, M. M.; ALLEN, N. J. The role of neuronal versus astrocyte-derived heparan sulfate proteoglycans in brain development and injury. **Biochemical Society transactions**, v. 42, n. 5, p. 1263–9, out. 2014.

FERRARO, G. B. et al. Membrane-type matrix metalloproteinase-3 regulates neuronal responsiveness to myelin through Nogo-66 receptor 1 cleavage. **The Journal of biological chemistry**, v. 286, n. 36, p. 31418–24, 9 set. 2011.

- FLANNERY, C. R. MMPs and ADAMTSs: functional studies. **Frontiers in bioscience : a journal and virtual library**, v. 11, p. 544–69, jan. 2006.
- FOURNIER, M. et al. Impaired metabolic reactivity to oxidative stress in early psychosis patients. **Schizophrenia bulletin**, v. 40, n. 5, p. 973–83, set. 2014.
- FREEDMAN, R. Schizophrenia. **The New England journal of medicine**, v. 349, n. 18, p. 1738–49, 30 out. 2003.
- FREY, B. N. et al. Biomarkers in bipolar disorder: a positional paper from the International Society for Bipolar Disorders Biomarkers Task Force. **The Australian and New Zealand journal of psychiatry**, v. 47, n. 4, p. 321–32, abr. 2013.
- FULLERTON, J. M. et al. Assessing oxidative pathway genes as risk factors for bipolar disorder. **Bipolar disorders**, v. 12, n. 5, p. 550–6, ago. 2010.
- GALTREY, C. M.; FAWCETT, J. W. The role of chondroitin sulfate proteoglycans in regeneration and plasticity in the central nervous system. **Brain research reviews**, v. 54, n. 1, p. 1–18, abr. 2007.
- GAWRYLUK, J. W. et al. Decreased levels of glutathione, the major brain antioxidant, in post-mortem prefrontal cortex from patients with psychiatric disorders. **The international journal of neuropsychopharmacology / official scientific journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum (CINP)**, v. 14, n. 1, p. 123–30, fev. 2011.
- GHAEMI, S. N.; DALLEY, S. The bipolar spectrum: conceptions and misconceptions. **The Australian and New Zealand journal of psychiatry**, v. 48, n. 4, p. 314–24, abr. 2014.
- GHAEMI, S. N.; KO, J. Y.; GOODWIN, F. K. The bipolar spectrum and the antidepressant view of the world. **Journal of psychiatric practice**, v. 7, n. 5, p. 287–97, set. 2001.
- GIAMANCO, K. A.; MORAWSKI, M.; MATTHEWS, R. T. Perineuronal net formation and structure in aggrecan knockout mice. **Neuroscience**, v. 170, n. 4, p. 1314–27, 10 nov. 2010.
- GRILLO, C. A. et al. Region specific increases in oxidative stress and superoxide dismutase in the hippocampus of diabetic rats subjected to stress. **Neuroscience**, v. 121, n. 1, p. 133–40, jan. 2003.
- GUBERT, C. et al. Mitochondrial activity and oxidative stress markers in peripheral blood mononuclear cells of patients with bipolar disorder, schizophrenia, and healthy subjects. **Journal of psychiatric research**, v. 47, n. 10, p. 1396–402, out. 2013.

HARRISON, P. J.; WEINBERGER, D. R. Schizophrenia genes, gene expression, and neuropathology: on the matter of their convergence. **Molecular psychiatry**, v. 10, n. 1, p. 40–68; image 5, jan. 2005.

HORROBIN, D. F. Schizophrenia as a membrane lipid disorder which is expressed throughout the body. **Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids**, v. 55, n. 1-2, p. 3–7, ago. 1996.

HOWELL, M. D.; GOTTSCHALL, P. E. Lectican proteoglycans, their cleaving metalloproteinases, and plasticity in the central nervous system extracellular microenvironment. **Neuroscience**, v. 217, p. 6–18, 16 ago. 2012.

HU, W. et al. Stress impairs GABAergic network function in the hippocampus by activating nongenomic glucocorticoid receptors and affecting the integrity of the parvalbumin-expressing neuronal network.

Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology, v. 35, n. 8, p. 1693–707, jul. 2010.

J-F, W. et al. Increased oxidative stress in the anterior cingulate cortex of subjects with bipolar disorder and schizophrenia. p. 523–529, 2009.

JONES, D. P.; GO, Y.-M. Redox compartmentalization and cellular stress. **Diabetes, obesity & metabolism**, v. 12 Suppl 2, p. 116–25, out. 2010.

KADDURAH-DAOUK, R. et al. Metabolomic mapping of atypical antipsychotic effects in schizophrenia. **Molecular psychiatry**, v. 12, n. 10, p. 934–45, out. 2007.

KÄHLER, A. K. et al. Candidate gene analysis of the human natural killer-1 carbohydrate pathway and perineuronal nets in schizophrenia: B3GAT2 is associated with disease risk and cortical surface area. **Biological psychiatry**, v. 69, n. 1, p. 90–6, 1 jan. 2011.

KATO, T. et al. Lateralized abnormality of high-energy phosphate and bilateral reduction of phosphomonoester measured by phosphorus-31 magnetic resonance spectroscopy of the frontal lobes in schizophrenia. **Psychiatry research**, v. 61, n. 3, p. 151–60, 29 set. 1995.

KEMP, M.; GO, Y.-M.; JONES, D. P. Nonequilibrium thermodynamics of thiol/disulfide redox systems: a perspective on redox systems biology. **Free radical biology & medicine**, v. 44, n. 6, p. 921–37, 15 mar. 2008.

KERR, M. K.; CHURCHILL, G. A. Experimental design for gene expression microarrays. **Biostatistics (Oxford, England)**, v. 2, n. 2, p. 183–201, jun. 2001.

KHAN, M. M. et al. Reduced erythrocyte membrane essential fatty acids and increased lipid peroxides in schizophrenia at the never-medicated first-episode of psychosis and after years of treatment with antipsychotics. **Schizophrenia research**, v. 58, n. 1, p. 1–10, 1 nov. 2002.

- KOHEN, R.; NYSKA, A. Toxicologic Pathology. 2002.
- KRABBENDAM, L. et al. Cognitive functioning in patients with schizophrenia and bipolar disorder: a quantitative review. **Schizophrenia research**, v. 80, n. 2-3, p. 137–49, 15 dez. 2005.
- KRAFTSIK, R. et al. Impaired glutathione synthesis in schizophrenia : Convergent genetic and functional evidence. v. 104, n. 42, 2007.
- KRAFTSIK, R. et al. Genetic Dysregulation of Glutathione Synthesis Predicts Alteration of Plasma Thiol Redox Status in Schizophrenia. v. 00, n. 0, 2011.
- KULOGLU, M. et al. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme levels in patients with schizophrenia and bipolar disorder. n. January 2001, p. 171–175, 2002.
- KUPFER, D. J. The increasing medical burden in bipolar disorder. **JAMA**, v. 293, n. 20, p. 2528–30, 25 maio 2005.
- KWOK, J. C. F. et al. Extracellular matrix and perineuronal nets in CNS repair. **Developmental neurobiology**, v. 71, n. 11, p. 1073–89, nov. 2011.
- KWOK, J. C. F.; WARREN, P.; FAWCETT, J. W. Chondroitin sulfate: a key molecule in the brain matrix. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 44, n. 4, p. 582–6, abr. 2012.
- LAI, J.-P. et al. The tumor suppressor function of human sulfatase 1 (SULF1) in carcinogenesis. **Journal of gastrointestinal cancer**, v. 39, n. 1-4, p. 149–58, jan. 2008.
- LAURSEN, T. M.; AGERBO, E.; PEDERSEN, C. B. Bipolar disorder, schizoaffective disorder, and schizophrenia overlap: a new comorbidity index. **The Journal of clinical psychiatry**, v. 70, n. 10, p. 1432–8, out. 2009.
- LEWIS, D. A. et al. Perisomatic inhibition and cortical circuit dysfunction in schizophrenia. **Current opinion in neurobiology**, v. 21, n. 6, p. 866–72, dez. 2011.
- LIN, C.-Y.; SAWA, A.; JAARO-PELED, H. Better understanding of mechanisms of schizophrenia and bipolar disorder: from human gene expression profiles to mouse models. **Neurobiology of disease**, v. 45, n. 1, p. 48–56, jan. 2012.
- LIU, J. J. et al. Pathways of polyunsaturated fatty acid utilization: Implications for brain function in neuropsychiatric health and disease. **Brain Research**, 8 dez. 2014.
- LIU, Y. et al. Replication of an association of a common variant in the Reelin gene (RELN) with schizophrenia in Ashkenazi Jewish women. **Psychiatric genetics**, v. 20, n. 4, p. 184–6, ago. 2010.

- LU, S. C. Regulation of glutathione synthesis. **Molecular aspects of medicine**, v. 30, n. 1-2, p. 42–59, jan. .
- LU, S. C. Glutathione synthesis. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1830, n. 5, p. 3143–53, maio 2013a.
- LU, S. C. Glutathione synthesis. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1830, n. 5, p. 3143–53, maio 2013b.
- LUKES, A et al. Extracellular matrix degradation by metalloproteinases and central nervous system diseases. **Molecular neurobiology**, v. 19, n. 3, p. 267–84, jun. 1999.
- MAES, M. et al. A review on the oxidative and nitrosative stress (O&NS) pathways in major depression and their possible contribution to the (neuro)degenerative processes in that illness. **Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry**, v. 35, n. 3, p. 676–92, 29 abr. 2011.
- MAHADIK, S. P. et al. Decreased adhesiveness and altered cellular distribution of fibronectin in fibroblasts from schizophrenic patients. **Psychiatry Research**, v. 53, n. 1, p. 87–97, jul. 1994.
- MAHADIK, S. P.; EVANS, D. R. Is schizophrenia a metabolic brain disorder? Membrane phospholipid dysregulation and its therapeutic implications. **The Psychiatric clinics of North America**, v. 26, n. 1, p. 85–102, mar. 2003.
- MAIER, W. Common risk genes for affective and schizophrenic psychoses. **European archives of psychiatry and clinical neuroscience**, v. 258 Suppl , p. 37–40, jun. 2008.
- MAIER, W.; ZOBEL, A.; WAGNER, M. Schizophrenia and bipolar disorder: differences and overlaps. **Current opinion in psychiatry**, v. 19, n. 2, p. 165–70, mar. 2006.
- MALEMUD, C. J. Matrix metalloproteinases (MMPs) in health and disease: an overview. **Frontiers in bioscience : a journal and virtual library**, v. 11, p. 1696–701, jan. 2006.
- MARAZZITI, D. et al. Psychiatric disorders and mitochondrial dysfunctions. **European review for medical and pharmacological sciences**, v. 16, n. 2, p. 270–5, fev. 2012.
- MARTÍNEZ-ARÁN, A. et al. Cognitive impairment in euthymic bipolar patients: implications for clinical and functional outcome. **Bipolar disorders**, v. 6, n. 3, p. 224–32, jun. 2004.
- MATTHEWS, R. T. et al. AggreCAN Glycoforms Contribute to the Molecular Heterogeneity of Perineuronal Nets. v. 22, n. 17, p. 7536–7547, 2002.

MCNAMARA, R. K. et al. Abnormal fatty acid pattern in the superior temporal gyrus distinguishes bipolar disorder from major depression and schizophrenia and resembles multiple sclerosis. **Psychiatry research**, v. 215, n. 3, p. 560–7, 30 mar. 2014.

MEISTER, A. Glutathione metabolism and its selective modification. **The Journal of biological chemistry**, v. 263, n. 33, p. 17205–8, 25 nov. 1988.

MERIKANGAS, K. R. et al. The impact of comorbidity of mental and physical conditions on role disability in the US adult household population. **Archives of general psychiatry**, v. 64, n. 10, p. 1180–8, out. 2007.

MIGUEL, R. F.; POLLAK, A.; LUBEC, G. Metalloproteinase ADAMTS-1 but not ADAMTS-5 is manifold overexpressed in neurodegenerative disorders as Down syndrome, Alzheimer's and Pick's disease. **Brain research. Molecular brain research**, v. 133, n. 1, p. 1–5, 5 jan. 2005.

MISRA, I.; GRIFFITH, O. W. Expression and purification of human gamma-glutamylcysteine synthetase. **Protein expression and purification**, v. 13, n. 2, p. 268–76, jul. 1998.

MONIN, A. et al. Glutathione deficit impairs myelin maturation: relevance for white matter integrity in schizophrenia patients. **Molecular psychiatry**, 26 ago. 2014.

MORAWSKI, M. et al. Perineuronal nets potentially protect against oxidative stress. **Experimental neurology**, v. 188, n. 2, p. 309–15, ago. 2004.

MOTT, J. D.; WERB, Z. Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. **Current opinion in cell biology**, v. 16, n. 5, p. 558–64, out. 2004.

MÜHLEISEN, T. W. et al. Genome-wide association study reveals two new risk loci for bipolar disorder. **Nature communications**, v. 5, p. 3339, jan. 2014.

MUZINA, D. J.; CALABRESE, J. R. Maintenance therapies in bipolar disorder : focus on randomized controlled trials. n. October 2003, 2005.

MYTILINEOU, C. et al. Impaired oxidative decarboxylation of pyruvate in fibroblasts from patients with Parkinson's disease. **Journal of neural transmission. Parkinson's disease and dementia section**, v. 8, n. 3, p. 223–8, jan. 1994.

NORDBERG, J.; ARNÉR, E. S. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free radical biology & medicine**, v. 31, n. 11, p. 1287–312, 1 dez. 2001.

OZTURK, E. et al. Antioxidant properties of propofol and erythropoietin after closed head injury in rats. **Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry**, v. 29, n. 6, p. 922–7, jul. 2005.

PANOV, A. et al. Fatty acids in energy metabolism of the central nervous system. **BioMed research international**, v. 2014, p. 472459, jan. 2014.

PANTAZOPOULOS, H. et al. Proteoglycan abnormalities in olfactory epithelium tissue from subjects diagnosed with schizophrenia. **Schizophrenia research**, v. 150, n. 2-3, p. 366–72, nov. 2013.

PANTAZOPOULOS, H. et al. Extracellular Matrix-Glial Abnormalities in the Amygdala and Entorhinal Cortex of Subjects Diagnosed With Schizophrenia. 2014.

PARK, J.-H. et al. Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 6 disrupts mammary acinar morphogenesis through O-glycosylation of fibronectin. **Neoplasia (New York, N.Y.)**, v. 13, n. 4, p. 320–6, abr. 2011.

PISANTÉ, A. et al. A variant in the reelin gene increases the risk of schizophrenia and schizoaffective disorder but not bipolar disorder. **Psychiatric genetics**, v. 19, n. 4, p. 212, ago. 2009.

PORTEOUS, D. Genetic causality in schizophrenia and bipolar disorder: out with the old and in with the new. **Current opinion in genetics & development**, v. 18, n. 3, p. 229–34, jun. 2008.

PRABAKARAN, S. et al. Mitochondrial dysfunction in schizophrenia: evidence for compromised brain metabolism and oxidative stress. **Molecular psychiatry**, v. 9, n. 7, p. 684–97, 643, jul. 2004.

PRESTERA, T. et al. Chemical and molecular regulation of enzymes that detoxify carcinogens. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, n. 7, p. 2965–9, 1 abr. 1993.

PROVENZANO, M.; MOCELLIN, S. Complementary techniques: validation of gene expression data by quantitative real time PCR. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 593, p. 66–73, jan. 2007.

RAFFA, M. et al. Reduced antioxidant defense systems in schizophrenia and bipolar I disorder. **Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry**, v. 39, n. 2, p. 371–5, 3 dez. 2012.

RANJEKAR, P. K. et al. Decreased antioxidant enzymes and membrane essential polyunsaturated fatty acids in schizophrenic and bipolar mood disorder patients. **Psychiatry Research**, v. 121, n. 2, p. 109–122, dez. 2003.

RAO, J. S. et al. n-3 polyunsaturated fatty acid deprivation in rats decreases frontal cortex BDNF via a p38 MAPK-dependent mechanism. **Molecular psychiatry**, v. 12, n. 1, p. 36–46, jan. 2007.

- RAPOPORT, S. I.; BOSETTI, F. Do lithium and anticonvulsants target the brain arachidonic acid cascade in bipolar disorder? **Archives of general psychiatry**, v. 59, n. 7, p. 592–6, jul. 2002.
- SCHIAVONE, S. et al. Involvement of NOX2 in the development of behavioral and pathologic alterations in isolated rats. **Biological psychiatry**, v. 66, n. 4, p. 384–92, 15 ago. 2009.
- SCHILDERSMAN, P. A. et al. The role of prostaglandin H synthase-mediated metabolism in the induction of oxidative DNA damage by BHA metabolites. **Carcinogenesis**, v. 14, n. 7, p. 1297–302, jul. 1993.
- SHIFMAN, S. et al. Genome-wide association identifies a common variant in the reelin gene that increases the risk of schizophrenia only in women. **PLoS genetics**, v. 4, n. 2, p. e28, fev. 2008.
- SOHAL, V. S. et al. Parvalbumin neurons and gamma rhythms enhance cortical circuit performance. **Nature**, v. 459, n. 7247, p. 698–702, 4 jun. 2009.
- STANLEY, J. A. et al. Membrane phospholipid metabolism and schizophrenia: an in vivo ³¹P-MR spectroscopy study. **Schizophrenia research**, v. 13, n. 3, p. 209–15, out. 1994.
- STEULLET, P. et al. Redox dysregulation affects the ventral but not dorsal hippocampus: impairment of parvalbumin neurons, gamma oscillations, and related behaviors. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 30, n. 7, p. 2547–58, 17 fev. 2010.
- SUTTKUS, A. et al. Neuroprotection against iron-induced cell death by perineuronal nets - an in vivo analysis of oxidative stress. v. 1, n. 2, p. 122–129, 2012.
- TAMMINGA, C. A.; HOLCOMB, H. H. Phenotype of schizophrenia: a review and formulation. **Molecular psychiatry**, v. 10, n. 1, p. 27–39, jan. 2005.
- THAKER, G. K. Neurophysiological endophenotypes across bipolar and schizophrenia psychosis. **Schizophrenia bulletin**, v. 34, n. 4, p. 760–73, jul. 2008.
- TORREY, E. F. et al. Neurochemical markers for schizophrenia, bipolar disorder, and major depression in postmortem brains. **Biological psychiatry**, v. 57, n. 3, p. 252–60, 1 fev. 2005.
- TOSIC, M. et al. Schizophrenia and Oxidative Stress : Glutamate Cysteine Ligase Modifier as a Susceptibility Gene. v. 79, n. September, p. 586–592, 2006.
- VAWTER, M. P. et al. Elevated concentration of N-CAM VASE isoforms in schizophrenia. **Journal of psychiatric research**, v. 34, n. 1, p. 25–34, jan. .

VAWTER, M. P. et al. Characterization of human cleaved N-CAM and association with schizophrenia. **Experimental neurology**, v. 172, n. 1, p. 29–46, nov. 2001.

WANG, D.; FAWCETT, J. The perineuronal net and the control of CNS plasticity. **Cell and tissue research**, v. 349, n. 1, p. 147–60, jul. 2012.

WANG, X.-X. et al. Matrix metalloproteinases and their multiple roles in Alzheimer's disease. **BioMed research international**, v. 2014, p. 908636, jan. 2014.

WEST, M. Bayesian Factor Regression Models in the “ Large p , Small n ” Paradigm. 2003.

WHITTINGTON, M. A. et al. Multiple origins of the cortical γ rhythm. **Developmental neurobiology**, v. 71, n. 1, p. 92–106, 1 jan. 2011.

WILSON, I. B.; GAVEL, Y.; VON HEIJNE, G. Amino acid distributions around O-linked glycosylation sites. **The Biochemical journal**, v. 275 (Pt 2, p. 529–34, 15 abr. 1991.

XU, J.; MOSHER, D. **The Extracellular Matrix: an Overview**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2011. p. 41–76

YAO, J. K.; LEONARD, S.; REDDY, R. Altered Glutathione Redox State in Schizophrenia. **Disease Markers**, v. 22, n. 1-2, p. 83–93, 2006.

YONG, V. W. et al. Metalloproteinases in biology and pathology of the nervous system. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 2, n. 7, p. 502–11, jul. 2001.

YONG, V. W. Metalloproteinases: mediators of pathology and regeneration in the CNS. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 6, n. 12, p. 931–44, dez. 2005.

ZAHARIEVA, I. et al. Association study in the 5q31-32 linkage region for schizophrenia using pooled DNA genotyping. **BMC psychiatry**, v. 8, p. 11, jan. 2008.

ZHANG, Z. J.; REYNOLDS, G. P. A selective decrease in the relative density of parvalbumin-immunoreactive neurons in the hippocampus in schizophrenia. **Schizophrenia research**, v. 55, n. 1-2, p. 1–10, 1 maio 2002.