INSTITUTO POLITÉCNICO DE LISBOA

ESCOLA SUPERIOR DE TECNOLOGIA DA SAÚDE DE LISBOA

New strategies for lupus diagnosis

Mestrando: Andreia Filipa Esteves Martins

Orientador: Prof. Doutora Alexandra Maria Moita Antunes

Co-Orientador: Prof. Doutor Mário Gomes

Mestrado em Tecnologias Moleculares em Saúde

Lisboa, 2021

INSTITUTO POLITÉCNICO DE LISBOA

ESCOLA SUPERIOR DE TECNOLOGIA DA SAÚDE DE LISBOA

New strategies for lupus diagnosis

Mestrando: Andreia Filipa Esteves Martins

Orientador: Prof. Doutora Alexandra Maria Moita Antunes

Co-Orientador: Prof. Doutor Mário Gomes

Júri:

Presidente: Doutor Bruno Filipe Carmona

Arguente: Doutora Judit Morello

Mestrado em Tecnologias Moleculares em Saúde

Lisboa, 2021

ESCOLA SUPERIOR DE TECNOLOGIA DA SAÚDE DE LISBOA
INSTITUTO POLITÉCNICO DE LISBOA

POLITÉCNICO DE LISBOA

Mestrado em Tecnologias Moleculares em Saúde

New strategies for lupus diagnosis

Andreia Martins

2021

Agradecimento

A elaboração da presente tese de mestrado não seria possível sem o apoio de alguns intervenientes. Assim sendo, agradeço a todos os que sempre me apoiaram e contribuíram para a realização e concretização desta etapa final na minha formação em Tecnologias Moleculares em Saúde.

Em especial:

À minha orientadora a Doutora Alexandra Maria Moita Antunes, por toda a disponibilidade e apoio prestado ao longo da dissertação e pelos muitos conhecimentos transmitidos numa área da qual eu tinha poucos conhecimentos.

A todos os docentes que contribuíram para a minha formação ao longo do Mestrado, por todos os conhecimentos, dedicação e contributo para o meu crescimento pessoal e educacional.

À minha família, em especial à minha mãe, pois tudo isto só foi possível graças ao esforço e dedicação que sempre tiveram.

E por fim, aos meus amigos, por todo o apoio, carinho e compreensão que tiveram ao longo deste tempo.

A todos, muito obrigada!

Resumo

O lúpus eritematoso sistémico (LES) é uma doença inflamatória autoimune crónica, com uma maior prevalência em mulheres. Caracteriza-se pela produção de autoanticorpos, que causam lesões em vários órgãos, podendo levar à redução da função física, alta morbidade e baixa qualidade de vida.

Atualmente, o diagnóstico de LES depende da ocorrência de pelo menos quatro dos onze critérios definidos pelo Colégio Americano de Reumatologia. No entanto, o diagnóstico precoce está condicionado pela complexidade da doença e pela variedade de sintomas que apresenta, sendo que muitos dos sintomas também se encontram associados a outras doenças autoimunes. Esta dificuldade tem graves consequências em termos de prognóstico, pois condiciona a adoção de um regime terapêutico adequado em fases mais precoces da doença. Desta forma, é urgente o desenvolvimento de novos biomarcadores específicos de LES.

Tendo em conta o potencial papel da formação de adutos covalentes de proteínas na etiologia do LES, este trabalho teve como objetivo verificar se os adutos covalentes formados entre a Albumina do Soro Humano (HSA) e metabolitos reativos específicos poderiam ser utilizados para o diagnóstico diferencial desta doença autoimune. Para isso, analisou-se por espectrometria de massa de alta resolução acoplada à cromatografia líquida (LC-HRMS) a HSA isolada do sangue de quatro grupos: 1) doentes de LES (n=19); 2) doentes de artrite reumatoide (AR) (n=22); 3) doentes de espondilite anquilosante (AS) (n=23); e 4) de um grupo de controlos saudáveis (n=26).

Para a procura dos adutos covalentes alvo nas amostras clínicas, fez-se uma análise direcionada, auxiliada pela comparação com adutos padrão, preparado *in vitro* por modificação covalente de hemoglobina (Hb) e HSA com os correspondentes metabolitos reativos. A análise dos adutos padrão possibilitou a construção de uma base de dados que foi depois utilizada na procura destes possíveis biomarcadores nas amostras clínicas, utilizando o software TASQ 1.4.

Muito embora não tenha sido possível identificar nenhum dos adutos alvo nas amostras clínicas analisadas, a criação da base de dados representa uma ferramenta fundamental para um melhor conhecimento do papel destes metabolitos reativos tanto no LES como em outras doenças.

Palavras-Chave: Lúpus Eritematoso Sistémico, adutos covalentes, espectrometria de massa, biomarcadores.

Abstract

Systemic lupus erythematosus (SLE) is a chronic autoimmune inflammatory disease, with a higher prevalence in women. It is characterized by the production of autoantibodies, which cause multiorgan damage that can lead to reduced physical function, high morbidity, and low quality of life.

Currently, the diagnosis of SLE depends on the occurrence of at least four of the criteria defined by the American College of Rheumatology. However, early diagnosis is conditioned by the complexity of the disease and the variety of symptoms it presents, and many of the symptoms have also been identified as associated with other autoimmune diseases. This difficulty has serious consequences in terms of prognosis, as it conditions the adoption of an adequate therapeutic regimen at earlier stages of the disease. Therefore, the development of new SLE-specific biomarkers is urgent.

Taking into consideration the potential role of protein covalent adducts formation in LES, this study was aimed at exploring whether covalent adducts formed between blood proteins and specific reactive metabolites could be used for the differential diagnosis of this autoimmune disease. For this purpose, high-resolution mass spectrometry coupled with liquid chromatography (LC-HRMS) was used to analyze the human serum albumin (HSA) isolated from the blood of four groups: 1) SLE patients (n=19); 2) patients with rheumatoid arthritis (RA) (n=22); 3) ankylosing spondylitis (AS) patients (n=23); and 4) from a group of healthy controls (n=26). A targeted analysis was performed, assisted by comparison with standard adducts, prepared *in vitro* upon incubation of hemoglobin and HSA with target reactive metabolites. The analysis of standard adducts enabled the construction of a database that was then used to search for these possible biomarkers in clinical samples, using the TASQ 1.4 software.

Although no target adduct was identified in the clinical samples, the creation of the database represents a fundamental tool for a better understanding of the role target reactive metabolites not only in SLE but also in other diseases.

Key words: Systemic Lupus Erythematosus, covalent adducts, mass spectrometry, biomarkers.

Página em branco

Índice

1. Introdução 1

1.1 Lúpus e a dificuldade no diagnóstico 1

1.2 Lúpus a prevalência nas mulheres e a relação com estrogénios 5

1.3 A formação de adutos covalentes com proteínas e Autoimunidade (Lúpus) 6

1.4 A bioativação de estrogénios e a formação de adutos covalentes com proteínas 8

1.5 Identificação de adutos com proteínas e a utilização de espectrometria de massa para a sua deteção 13

2. Objetivo 15

3. Materiais e Métodos 16

3.1 Amostras Clínicas 16

3.2 Isolamento da Albumina do Soro Humano 16

3.3 Quantificação de proteína (Método Bradford) 17

3.4 Digestão de proteína aos aminoácidos 17

3.5 Análise por Cromatografia Líquida acoplada por Espectrometria de massa de alta resolução (LC-HRMS) * 18

3.6 Processamentos dos dados obtidos 18

3.7 Preparação de adutos padrão: modificação *in vitro* de proteínas 19

4. Resultados e Discussão 20

4.1 Caracterização da População em estudo 22

4.2 Quantificação de proteínas (Método Bradford) 23

4.3 Identificação de adutos formados a partir dos metabolitos reativos do estrogénio nas amostras provenientes da modificação *in vitro* da Hb/HSA (adutos padrão) 23

4.3.1 Identificação dos adutos derivados do 16OHE1 24

4.3.2 Identificação dos adutos derivados da estrona e do estradiol 26

4.3.3 Construção da base de dados com os adutos padrão 29

4.4 Procura dos adutos em amostras clínicas e perspetivas futuras 32

5. Conclusão 33

6. Bibliografia 34

7. Apêndice I

Índice de Figuras

Figura 1.1 - Os efeitos sistémicos mais comuns do lúpus eritematoso sistémico, que afetam vários órgãos do corpo, apresentando assim uma dificuldade no diagnóstico rápido da doença, podendo levar até 10 anos a se obter um diagnóstico [5] 2

Figura 1.2 - Critérios de classificação do LES, definidos pela EULAR e ACR. [6] 3

Figura 1.3 - Estrutura química dos 3 estrogénios mais importantes 8

Figura 1.4 - Biossíntese dos estrogénios a partir do colesterol..... 9

Figura 1.5 - Bioativação da estrona a 16-OHE1 e mecanismos de formação de adutos com proteínas. 10

Figura 1.6 - Formação dos catecóis derivados dos estrogénios E1 e E2 e reações de conjugação na presença de COMT e/ou oxidorreductases 11

Figura 1.7 - Formação das espécies quinone-methide a partir da quinona formada do catecol 2-OHE2 12

Figura 4.1 - Visão geral do trabalho desenvolvido ao longo do tempo..... 21

Figura 4.2 - Identificação do aduto 16-OHE1-Lis (por rearranjo de Heyns) numa amostra de HSA. (A) Espectro de full scan obtido por HRMS da molécula protonada do aduto 16-OHE1-Lis e correspondente estrutura química. (B) Espectro de MS/MS da molécula protonada do aduto 16-OHE1-Lis e dos dois fragmentos encontrados e as suas estruturas químicas..... 25

Figura 4.3 - Identificação do aduto 16-OHE1-Lis (por redução) numa amostra de Hb. (A) Espectro de full scan obtido por HRMS da molécula protonada do aduto 16-OHE1-Lis e correspondente estrutura química. (B) Espectro de MS/MS da molécula protonada do aduto 16-OHE1-Lis e dos dois fragmentos encontrados e as suas estruturas químicas. 25

Figura 4.4 - Identificação do aduto QM-E1-Lis numa amostra de Hb. (A) Espectro de full scan obtido por HRMS da molécula protonada do aduto QM-E1-Lis e correspondente estrutura química. (B) Espectro de MS/MS da molécula protonada do aduto QM-E1-Lis e dos três fragmentos encontrados e as suas estruturas químicas. 27

Figura 4.5 - Identificação do aduto diQM-E1-Hist numa amostra de Hb. (A) Espectro de full scan obtido por HRMS da molécula protonada do aduto diQM-E1-Hist e correspondente estrutura química. (B) Espectro de MS/MS da molécula protonada do aduto diQM-E1-Hist e do fragmento encontrado e a sua estrutura química. 27

Figura 4.6 - Identificação do aduto diQM-E2-Hist numa amostra de Hb. (A) Espectro de full scan obtido por HRMS da molécula protonada do aduto diQM-E2-Hist e correspondente estrutura química. (B) Espectro de MS/MS da molécula protonada do aduto diQM-E2-Hist e do fragmento encontrado e a sua estrutura química. 28

Figura 4.7 - Identificação do aduto QM-E2-Lis numa amostra de Hb. (A) Espectro de full scan obtido por HRMS da molécula protonada do aduto QM-E2-Lis e correspondente estrutura química. (B) Espectro de MS/MS da molécula protonada do aduto QM-E2-Lis e do fragmento encontrado e a sua estrutura química. 28

Índice de Tabelas

Tabela 4.1 - Caracterização da População em Estudo por SPSS: a = média ± desvio padrão; b = entre grupos; c = Teste do Qui Quadrado; d = Teste ANOVA; e T-test; ns = não significativo; AS = espondilite anquilosante; RA = artrite reumatoide; LES = lúpus eritematoso sistêmico; IMC = índice de massa corporal; 22

Tabela 4.2 - Base de dados dos adutos formados com os metabolitos derivados da estrona e do estradiol, cada aduto apresenta a sua fórmula química, rt, valor de m/z da molécula protonada e respetivos fragmentos encontrados. 29

Tabela 4.3 - Adutos formados com os metabolitos derivados da estrona e do estradiol, identificados a partir da base de dados criada no software TASQ 31

Tabela 7.1 - Valores de concentração de proteína obtidos a partir das respetivas equações da reta e respetivos cálculos para a digestão aos aminoácidos. Os valores a laranja não se encontram aptos para a digestão. Três das amostras (LES105; AR108; AR109) foram repetidas as absorvâncias, mas continuava a existir o mesmo erro. I

Tabela 7.2 - Resumo dos adutos padrão encontrados nas amostras modificadas in vitro..... VI

Página em branco

Lista de Abreviaturas

16OHE1 - 16-alfa-hidroxiestrona

17-HSDs - 17-hidroxisteróide desidrogenases

2-OHE1 - 2-hidroxiestrona

2-OHE2 - 2-hidroxiestradiol

3-NT - 3-nitrotirosina

4-HNE - 4-hidroxinonenal

4-OHE1 - 4-hidroxiestrona

4-OHE2 - 4-hidroxiestradiol

ABIC - Tampão bicarbonato de amónio

Abs - Absorvância

ACR - Colégio Americano de Reumatologia, do inglês *American College of Rheumatology*

ANA - Anticorpos antinucleares

anti-dsDNA - Anticorpos DNA (dupla hélice), do inglês *Anti-double stranded DNA*

Anti-Sm - Anti-Smith

AR - Artrite reumatoide

AS - Espondilite anquilosante

ASAS - *Assessment of SpondyloArthritis international Society*

bbCID - *Broadband collision-induced dissociation*

BSA - Albumina de soro bovino, do inglês *Bovine serum albumin*

Cis - Cisteína

COMT - Catecol-*O*-metiltransferase

DDA - Modo data-dependente, do inglês *Data Dependente Analysis*

DNA - Ácido desoxirribonucleico, do inglês *Deoxyribonucleic acid*

E1 - Estrona

E2 - Estradiol

E3 - Estriol

ELISA - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

ESI - Electrospray

EULAR - Liga Europeia Contra o Reumatismo, do inglês *European League Against Rheumatism*

FIA - Flow injection analysis

GSH - Glutationa

Hb - Hemoglobina

Hist - Histidina

HSA - Albumina do soro Humano, do inglês *Human serum albumin*

IgG - Imunoglobulina G

IMC - índice de massa corporal

LC-HRMS - Cromatografia líquida acoplada espectrometria de massa de alta resolução, do inglês *Liquid chromatography high-resolution mass spectrometry*

LES - Lúpus Eritematoso sistémico

Lis - Lisina

m/z - Razão massa/carga

MDA - Malondialdeído

MS - Espectrometria de massa, do inglês *Mass spectrometry*

Ns - Não significativo

QM - *Quinone-methide*

QTOF - Quadrupolo conjugado com tempo de voo, do inglês *Quadrupole time-of-flight*

RT - Tempo de Retenção, do inglês *Retention Time*

Ser - Serina

UPLC - Ultra Performance Liquid Chromatography

Val – Valina

1. Introdução

1.1 Lúpus e a dificuldade no diagnóstico

Caracterizado como uma doença autoimune crónica inflamatória, o Lúpus Eritematoso sistémico (LES) é uma doença heterogénea, multissistémica, caracterizada por períodos de atividade e remissão com a particularidade de produzir autoanticorpos. A causa desta doença, apesar de ainda não ser conhecida a 100%, inclui tanto componentes genéticos como ambientais, havendo uma maior prevalência da doença no sexo feminino. [1]

Os anticorpos antinucleares (ANA) estão presentes em aproximadamente 98% dos doentes com lúpus, sendo o teste ANA o mais sensível para o diagnóstico do lúpus. Porém estes autoanticorpos podem ser encontrados em variadas doenças autoimunes, não apresentando grande especificidade. Existem ainda dois tipos de autoanticorpos que já apresentam alguma especificidade para o diagnóstico do lúpus, sendo estes anticorpos anti DNA (dupla hélice) (anti-dsDNA) e Anti-Smith (Anti-Sm), porém não permitem que seja feito um diagnóstico com 100% de certeza. [2] [3]

Esta doença manifesta-se por uma variedade de sintomas (Figura 1.1) a nível da pele (ex.: erupções cutâneas, a mais comum), a nível musculoesquelético (ex.: artrite), a nível hematológico (ex.: anemia) e apresenta também os sintomas mais comuns como fadiga, febre e perda de peso, entre muitos outros sintomas. No entanto, estes são sintomas muito gerais, comuns a outras doenças autoimunes. [4]

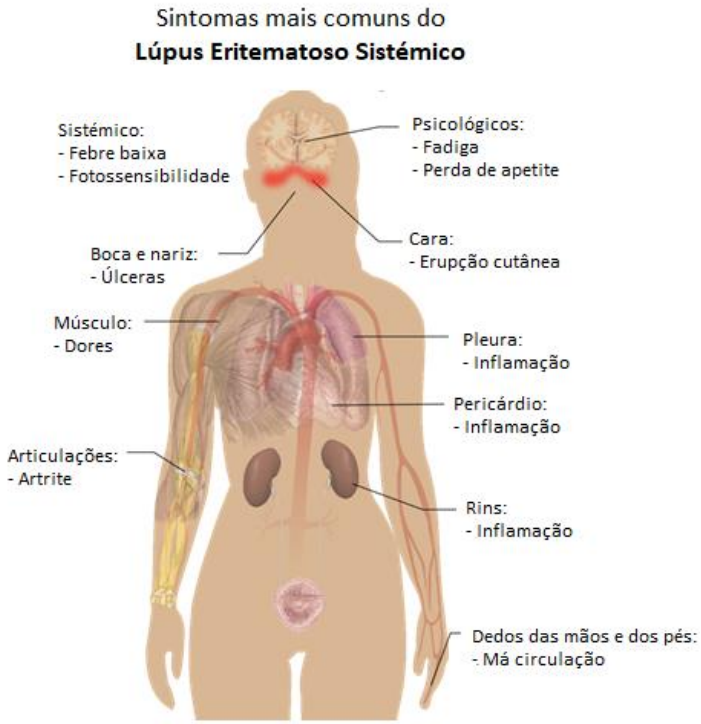

Figura 1.1 - Os efeitos sistémicos mais comuns do lúpus eritematoso sistémico, que afetam vários órgãos do corpo, apresentando assim uma dificuldade no diagnóstico rápido da doença, podendo levar até 10 anos a se obter um diagnóstico [5]

Atualmente o diagnóstico depende da observação de pelo menos 4 de 10 critérios clínicos e laboratoriais (Figura 1.2), definidos pela Liga Europeia contra o Reumatismo (EULAR) e o Colégio Americano de Reumatologia (ACR). No entanto, o diagnóstico precoce é muito difícil, pela complexidade da doença, a variedade de sintomas que apresenta e a inexistência de um teste clínico específico de LES. [6]

Critério de entrada obrigatório
Anticorpos Antinucleares ≥ 1:80 nas células HEp-2 ou teste equivalente positivo

↓

Se ausente, não classificar como LES
Se presente, aplicar critérios adicionais

↓

Critérios Adicionais

Dentro de cada domínio, apenas o critério de maior scores é contado para a pontuação total
A ocorrência de um critério apenas numa ocasião é suficiente.
Os critérios não precisam de ocorrer simultaneamente.
Não considerar um critério se houver uma explicação mais provável que o LES

Domínios e critérios clínicos	*Score*	Domínios e critérios imunológicos	*Score*
Constitucional		***Anticorpos antifosfolipídicos***	
Febre	2	Anticardiolipina ou anti-β2GP1 ou anticoagulante lúpico	2
Hematológico		***Complemento***	
Leucopenia	3	C3 ou C4 baixo	3
Trombocitopenia	4	C3 e C4 baixo	4
Hemólise autoimune	4		
Neuropsiquiátrico		***Anticorpos específicos para LES***	
Delírio	2	Anti-dsDNA ou anti.Sm	6
Psicose	3		
Convulsões	5		
Mucocutâneo			
Alopecia não cicatricial	2		
Úlceras orais	2		
Lupus cutâneo subagudo ou discoide	4		
Lupus cutâneo agudo	6		
Serosite			
Derrame pleural ou pericárdico	5		
Pericardite aguda	6		
Muscoesquelético			
Envolvimento articular	6		
Renal			
Proteinúria >0,5 g/24h	4		
Nefrite lúpica classe II ou V	8		
Nefrite lúpica classe III ou IV	10		
Score total			

↓

Classificar com LES se *score* ≥ 10

Figura 1.2 - Critérios de classificação do LES, definidos pela EULAR e ACR. [6]

Os critérios definidos são bastante diversificados, e dentro de cada um deles ainda existem vários sintomas por optar. Os critérios clínicos definidos são do tipo: constitucional, hematológico, neuropsiquiátricos, mucocutâneos, serosos, muscoloesqueléticos e renais. Para os critérios imunológicos, temos anticorpos antifosfolipídicos, proteínas complementares e anticorpos específicos LES. Estes critérios só serão analisados caso o doente apresente uma análise positiva para o teste ANA (com valores ≥1:80). Dentro de cada domínio existem os critérios ao qual foram atribuídos um "*score*", para o doente ter um diagnóstico positivo para lúpus, é necessário que apresente um "*score*" ≥ 10. [4] [6] Com este método de diagnóstico atualmente utilizado, é de notar uma dificuldade para definir precocemente que o indivíduo

realmente apresenta esta doença, uma vez que muitos destes sintomas só se manifestam num estado bastante avançado de doença. Assim, seria de todo o interesse encontrar biomarcadores específicos, que possam ser utilizados para o diagnóstico precoce da doença, antes que os sintomas mais graves apareçam. O desenvolvimento de novos biomarcadores poderá também ser de grande utilidade para o diagnóstico diferenciado da doença, para a avaliar a resposta terapêutica e para a previsão dos estados ativos da mesma. [7]

1.2 Lúpus a prevalência nas mulheres e a relação com estrogénios

A influência do género apresenta um papel de grande importância na suscetibilidade ao LES, pois para cada dez doentes de LES, nove são mulheres. [8] Para além desta maior prevalência na mulher, a atividade desta doença destaca-se em certos momentos na vida de uma mulher, como por exemplo o período menstrual e gravidez (antes e depois do parto). Durante estes períodos a atividade do LES pode agravar-se, uma vez que depende, em grande parte, dos níveis das hormonas sexuais. Sabe-se que estas hormonas não controlam apenas o sistema reprodutor, mas também desempenham um papel importante no desenvolvimento e função da resposta imunológica, uma vez que têm a capacidade de a regular. A desregulação dos mecanismos de resposta imune, tanto inata como adaptativa, contribui para doenças autoimunes. [8][9]

Alterações nos níveis endógenos dos estrogénios e dos efeitos imunológicos conhecidos destas hormonas, aliados às mudanças na atividade da doença, sugerem fortemente um papel para o estrogénio na iniciação, e possivelmente, na progressão da doença, reforçando assim a predominância feminina que existe no LES. [10]

Devido à enorme prevalência do lúpus nas mulheres, é de notar a importância que o cromossoma X apresenta nesta doença. Sabe-se que em doentes com o síndrome de Klinefelter, indivíduos que apresentam um ou mais cromossoma X a mais, são descritos como portadores de LES clínico e apresentam um metabolismo de estrogénio desregulado. Tendo sido a partir desta constatação que passou a existir um interesse em compreender melhor os padrões de metabolismo do estrogénio no LES. [8]

Os níveis dos metabolitos do estrogénio como o 2-hidroxiestrogénios (2OHE1/E2) (Figura 1.4) foram reportados como sendo 10 vezes mais baixo em doentes com AR e LES do que em controlos saudáveis, enquanto a proporção de 16-alfa-hidroxiestrona (16OHE1) /(2OHE1/E2) (Figura 1.4) foi 20 vezes maior nesses doentes. Indo assim ao encontro com as descobertas previamente feitas onde demonstravam concentrações séricas elevadas de 16OHE1 nos doentes com LES. Além destas descobertas foi também encontrada uma proporção significativamente elevada de 16OHE1/4-hidroxiestradiol (4-OHE2) em doentes com AR. [11] [12]

Dado o papel dos estrogénios na prevenção, causa e agravamento de doenças, um bom conhecimento de como os estrogénios são gerados metabolicamente e metabolizados pode ajudar na compreensão e tratamento de doença. [13]

1.3 A formação de adutos covalentes com proteínas e Autoimunidade (Lúpus)

É um grande desafio definir eventos específicos que causam a perda de tolerância levando à autoimunidade, representando assim uma área de investigação de grande interesse. Alguns dos mecanismos pelos quais a exposição ambiental pode contribuir para a patogénese das doenças autoimunes, incluem alterações epigenéticas, inflamação sistémica, citocinas inflamatórias e stress oxidativo. [14]

O descontrolo do stress oxidativo no LES contribui para modificações celulares de proteínas, lípidos e DNA. As consequências destas modificações oxidativas desempenham um papel crucial na imunomodulação e funcionam como um gatilho na autoimunidade. Efetivamente, a geração de espécies reativas de oxigénio e azoto em excesso tem a capacidade de direta ou indiretamente, danificar biomoléculas (proteínas/lípidos/DNA), formando adutos covalentes. Sendo que um dos principais alvos destas espécies são as proteínas, a oxidação das mesmas leva a alterações das suas funções, como a perda de atividade enzimática e o aumento da suscetibilidade a degradação de proteínas. [15] Nomeadamente, o peroxinitrito, formado por reação do óxido nítrico (NO) com o superóxido ($O_2^{\cdot-}$), tem a capacidade de modificar proteínas e DNA, em particular com resíduos de tirosina, formando 3-nitrotirosina (3-NT). Esta modificação poderá aumentar a imunogenicidade de autoantigénios, levando a uma quebra na tolerância imunológica. [15] [16] Efetivamente, Khan *et al.* [16] colocaram a hipótese de uma superprodução de peroxinitrito levar a uma variedade de modificações estruturais de proteínas endógenas, nomeadamente a modificação da histona 2A por peroxinitrito. Estes autores conseguiram mostrar níveis aumentados da histona H2A modificada, em comparação com a histona H2A nativa, nos doentes com AR. Esta modificação da histona H2A induz uma resposta autoimune, sugerindo assim uma associação entre a modificação oxidativa de proteínas e a autoimunidade. Esta descoberta demonstra que a produção de autoanticorpos contra os adutos covalentes formados por metabolitos derivados do stress oxidativo podem ser úteis para a monitorização da progressão da doença. [16]

Para além dos processos oxidativos, existem outros mecanismos que levam à formação de adutos covalentes com proteínas, por exposição a agentes endógenos ou exógenos. Um aduto covalente é definido como um complexo que se forma quando um produto químico se liga a uma molécula biológica ou como a fração ligada covalentemente a uma proteína, como consequência de uma reação com um agente eletrofílico. Os adutos formam-se a partir de compostos eletrofílicos reativos que se

caracterizam por centros de baixa densidade de eletrões e pela capacidade associada de reagir com centros moleculares de alta densidade de eletrões, presentes nas biomacromoléculas (ex. grupos amina presentes nos grupos laterais dos resíduos de lisina), ou seja, nucleófilos. Pelas suas pequenas dimensões, os xenobióticos ou os metabolitos endógenos a que estamos expostos não são imunogénicos. No entanto, quando se ligam covalentemente às proteínas, formando um aduto covalente, adquirem esta propriedade. Exemplo disso são os metabolitos formados durante a peroxidação lipídica, como o malondialdeído (MDA) e o 4-hidroxinonenal (4-HNE), que por serem aldeídos altamente reativos têm a capacidade de se ligarem covalentemente a proteínas formando adutos e, assim, causar modificações estruturais nas proteínas e afetando as suas funções, tornando-as altamente imunogénicas. Níveis aumentados destes adutos, formados por exposição a aldeídos derivados da peroxidação lipídica, foram encontrados em várias doenças autoimunes como o LES e a AR. Nomeadamente, o 4-HNE tem a capacidade de formar adutos com resíduos de aminoácidos como a cisteína (Cis), histidina (Hist) e lisina (Lis), resultando geralmente numa inativação das proteínas. [15][17][18][19] No estudo realizado por Wang *et al.* [19] foram observados níveis aumentados de anticorpos anti-MDA e anti-HNE no soro de doentes com LES em comparação com os soros de controlos saudáveis. [19] Hardt *et al.* [20] reportou que a geração descontrolada de MDA pode desencadear a indução de níveis mais elevados de anticorpos anti-MDA. Estes autores conseguiram correlacionar as modificações associadas à oxidação dos anticorpos igG à proteína MDA com uma maior atividade da doença, nefrite ativa e biomarcadores pró-inflamatórios nos doentes com LES. Embora a formação destes adutos não seja específica para LES, os níveis séricos estão fortemente correlacionados com níveis de autoanticorpos associados à doença. [20]

Para além dos metabolitos gerados durante a peroxidação lipídica, também os estrogénios poderão, mediante bioativação, gerar metabolitos capazes de modificar covalentemente as proteínas. Nomeadamente, devido ao seu carácter eletrofílico, o metabolito 16OHE1 tem a capacidade de modificar covalentemente resíduos de Lis na HSA, dando-se assim a formação de um aduto. Foram já observados níveis elevados deste metabolito e o aumento da formação de adutos 16OHE1-HSA em mulheres grávidas e em doentes do sexo feminino com LES. [21] [22] Num outro estudo foram detetados níveis elevados de autoanticorpos contra os adutos formados pela 16OHE1 em doentes com LES com depressão. Esta descoberta torna-se importante pois sabe-se que a depressão e a ansiedade são sintomas comuns e iniciais associados ao LES. [23]

1.4 A bioativação de estrogénios e a formação de adutos covalentes com proteínas

O termo estrogénios refere-se a um grupo de hormonas sexuais, predominantemente femininas, com múltiplas funções, como a regulação do ciclo menstrual e reprodução, densidade óssea, função cerebral, mobilização do colesterol, desenvolvimento do tecido mamário e órgãos sexuais. [24]

Quimicamente, os estrogénios (Figura 1.3) pertencem à família dos compostos orgânicos conhecidos como esteróides. A estrona (E1) e o estradiol (E2) são os esteróides sexuais femininos predominantes em circulação, a terceira forma mais comum em humanos, o estriol (E3), pode ser produzida a partir do E1. [25] [26]

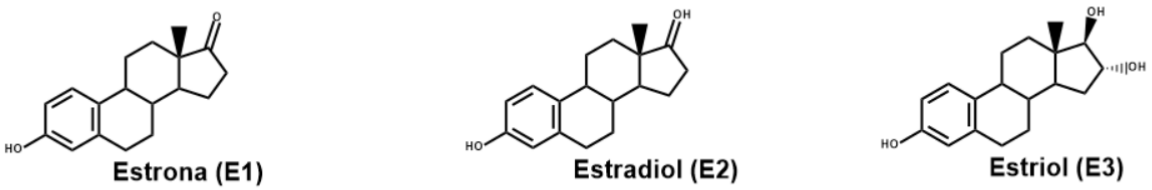

Figura 1.3 - Estrutura química dos 3 estrogénios mais importantes

A sua estrutura central é composta por 17 ligações carbono-carbono dispostas por quatro anéis fundidos. Todos os estrogénios contêm 18 carbonos ($C_{18}H_{24}O_2$) e são conhecidos coletivamente como esteróides C18. [24] Os estrogénios são sintetizados principalmente nos ovários, mas também nas glândulas suprarrenais e no tecido adiposo. No entanto, a palavra estrogénio é comummente usada para se referir ao E2, devido à sua relevância fisiológica e predominância durante os anos reprodutivos. [24]

O colesterol é o precursor das hormonas sexuais, sendo a partir da biossíntese deste que se formam os androgénios, estrogénios, corticoides entre outros. O colesterol é catalisado a pregnenolona, que por sua vez irá ser transformada em androgénios (androstenediona e testosterona). [26] [27]

A E1 e E2 são sintetizados através da aromatização da androstenediona e testosterona, respetivamente, também podem ser interconvertidos pela ação de 17-hidroxiesteróide desidrogenases (17-HSDs), já o E3 é sintetizado a partir da E1 via um intermediário 16OHE1. O metabolismo oxidativo da E1 e do E2, nas posições C2, C4 e C16 pelas enzimas do citocromo P450, leva à geração de metabolitos hidroxilados

(Figura 1.4): 2OHE1/2, 4OHE1/2 e 16OHE1. Os 2OHE1/2 e 4OHE1/2 são também conhecidos como catecol estrogénios. (Figura 1.4) [24] [25] [28]

Vários estudos já mostraram que os catecóis 4OHE1/2 e o metabolito 16OHE1 são potentes promotores do crescimentos e inflamação, em especial de tecidos sensíveis, como o útero, cérvix e a próstata. Pelo contrário, os catecóis 2OHE1/2 apresentam-se como uma potente proteção desses mesmo tecidos, prevenindo o cancro. [29]

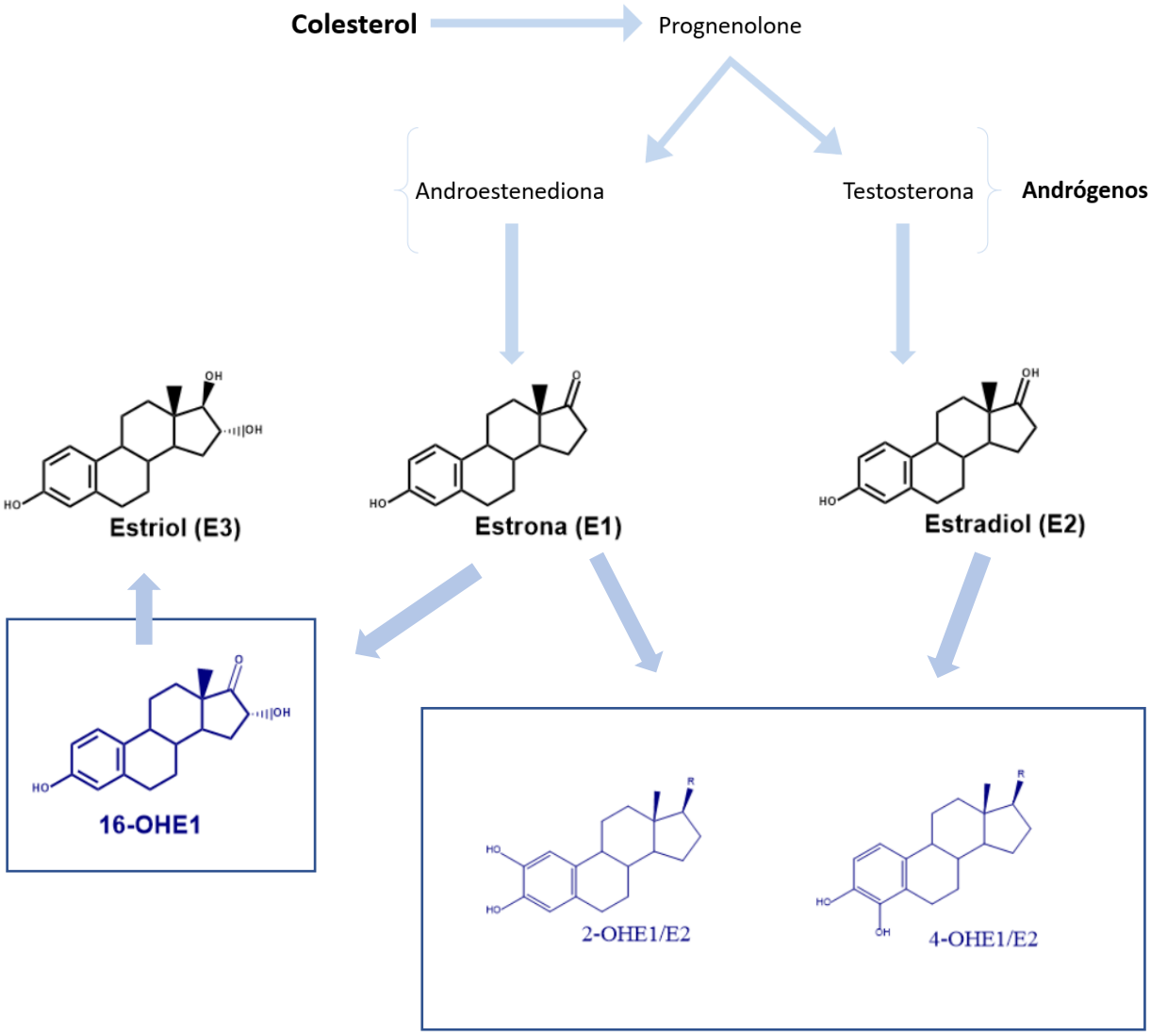

Figura 1.4 - Biossíntese dos estrogénios a partir do colesterol

O metabolito 16OHE1, formado a partir da E1, é uma hormona endógena mitogénica e proliferativa que se liga covalentemente ao recetor de estrogénio levando a uma translocação nuclear. Como referido anteriormente, alguns estudos já demonstraram padrões anormais do metabolismo do estrogénio em doentes com LES, sendo que a via 16-hidroxilação é usada como a principal via catabólica, gerando um metabolito reativo, que funciona como hapteno, com a capacidade de se ligar covalentemente aos resíduos de Lis de proteínas. [29] [30] O mecanismo de adução (formação de aduto covalente) deste metabolito (Figura 1.5), envolve a formação de uma base Schiff, sendo esta posteriormente estabilizada por dois mecanismos: (a) via estabilização redutiva, produzindo o aduto α-hidroxiamina e (b) via rearranjo de Heyns, produzindo um aduto estável de cetamina. [30]

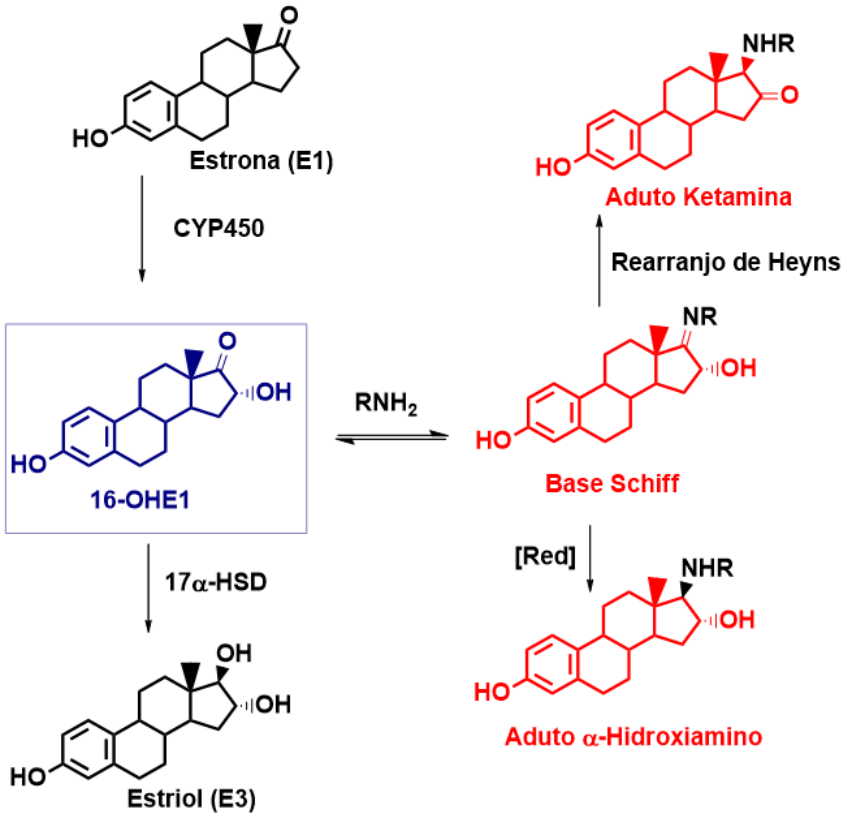

Figura 1.5 - Bioativação da estrona a 16-OHE1 e mecanismos de formação de adutos com proteínas.

Os catecóis derivados do estrogénio (Figura 1.6) podem ser metilados através da enzima catecol-*O*-metiltransferase (COMT) em 2- e 4-metoxiestrogénios. A *O*-metilação destes compostos inativa o seu potencial estrogénico e bloqueia a sua capacidade de sofrerem oxidações sucessivas para semi-quinonas e quinonas que conseguem formar adutos no DNA e/ou participar no ciclo redox para produzir espécies reativas de

oxigénio. No entanto, se esta reação não ocorrer, os catecóis poderão ser oxidados por qualquer enzima, pela presença de O_2 ou iões metálicos, dando origem a quinonas: 2OHE1/E2Q ou 4OHE1/E2Q. Podem ainda formar-se outras espécies quinóides como os quinone methides (QM), resultantes da isomerização das *o*-quinonas formadas por oxidação dos catecóis da E1 e do E2. [31] [32]

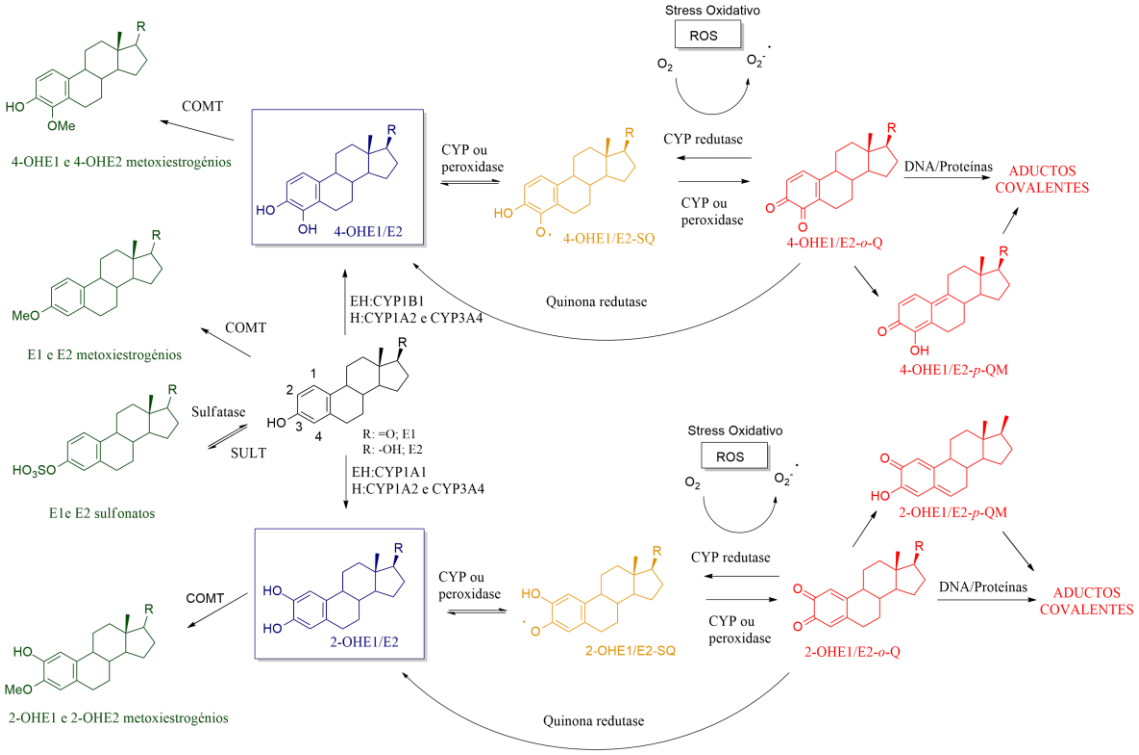

Figura 1.6 - Formação dos catecóis derivados dos estrogénios E1 e E2 e reações de conjugação na presença de COMT e/ou oxidorreductases

Foram também detetados adutos covalentes que provêm da conjugação da glutationa (GSH) com espécies do tipo *quinone-methide* (QM), resultantes da isomerização das *o*-quinonas formadas por oxidação dos catecóis da E1 e do E2.[32] [33] Na Figura 1.7 exemplifica-se a formação destas espécies a partir da quinona formada do catecol 2OHE2.

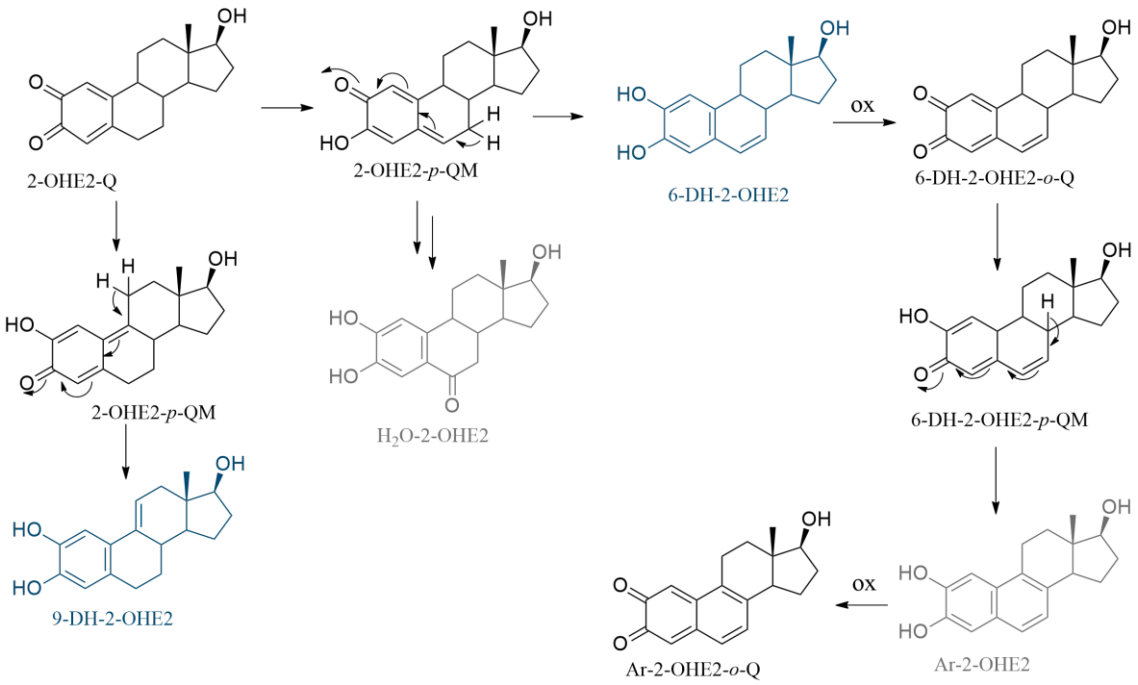

Figura 1.7 - Formação das espécies quinone-methide a partir da quinona formada do catecol 2-OHE2

Será ainda de destacar que, tanto na reação do 2-OHE1/E2 como do 4-OHE1/E2, foram identificados os bis-adutos, resultantes da oxidação dos mono-adutos e subsequente conjugação com outra molécula de GSH. A formação destes bis-adutos mostra que os mono-adutos são bons substratos para as reações de oxidação/conjugação [32] [34]

1.5 Identificação de adutos com proteínas e a utilização de espectrometria de massa para a sua deteção

Muito embora haja uma relação estabelecida entre a formação de metabolitos reativos (com a capacidade de reagirem covalentemente com biomacromoléculas) e a indução de doenças, há uma grande dificuldade na biomonitorização destes metabolitos. Efetivamente, devido à sua reatividade, os metabolitos reativos têm um tempo de meia vida muito curto *in vivo*, uma propriedade que torna a sua identificação/quantificação em biofluídos muito difícil. No entanto, quando reagem com as biomacromoléculas, formam adutos covalentes estáveis, que poderão ser convenientemente identificados e quantificados. Estes adutos funcionam como biomarcadores de exposição aos metabolitos reativos.

Em termos de biomonitorização, os adutos de proteína têm várias vantagens sobre adutos de DNA, uma vez que as proteínas são muito mais abundantes do que o DNA no sangue (Hb ≈ 150 mg/mL; HSA ≈ 40 mg/mL; DNA ≈ 0,005 mg/mL). Para além da sua maior abundância estas proteínas não são submetidas a processos de reparação, como acontece nos adutos de DNA, permitindo assim cálculos mais simples de dose sistémica, fazendo com que que os adutos de proteína sirvam como melhores biomarcadores. [35]

A identificação da natureza das modificações covalentes e o local de adução dentro da proteína ou de outras biomoléculas é referido como '*Adutómica*', e engloba metodologias de deteção/identificação/quantificação de adutos extremamente sensíveis. [35][36] Atualmente, os métodos de espectrometria de massa (MS), e imunológicos (*Wester Blot*/Enzyme-Linked Immunosorbent Assay - ELISA), são os dois métodos mais comuns na deteção de modificações covalentes de proteínas. [37]

As estratégias imunológicas baseiam-se em interações especificas do antígeno-anticorpo, permitindo uma boa sensibilidade de análise. Porém, a reatividade cruzada de anticorpos pode levar a falsos positivos e resultados incorretos. Por outro lado, este método não permite a descoberta de novas modificações covalentes, uma vez que está sempre dependente dos anticorpos disponíveis. Em comparação, os métodos baseados na técnica de MS, permitem identificar e caracterizar várias modificações diferentes em múltiplas proteínas, e a deteção é independente da existência ou não de anticorpos específicos. Embora as abordagens baseadas em MS possam diferir de acordo com as modificações de interesse, existe um procedimento geral de trabalho para caracterizar adutos de proteína: [37]

1. As proteínas alvo passam pelo processo de isolamento da matriz (lisado celular, soro ou tecido) com base nas propriedades de proteínas.
2. As proteínas são desnaturadas, e digeridas com enzimas especificas, a péptidos de pequenas dimensões (*bottom-up*) ou aos aminoácidos.
3. Os adutos de proteína são analisados por MS.
4. No caso da abordagem *bottom-up*, os dados são analisados através de um banco de dados, de forma a caracterizar os adutos de proteína, incluindo a identificação de proteínas modificadas/isoformas de proteínas, localização da modificação e quantificação da modificação covalente. No caso da abordagem que envolve a digestão aos aminoácidos (ou o tratamento químico para destacar aminoácidos modificados) a análise de MS é efetuada por comparação com padrões previamente sintetizados e caracterizados.

As abordagens de MS usadas na identificação de adutos covalentes de proteínas são frequentemente classificadas como:

→ Direcionadas (*targeted*) – Abordagem que se foca na identificação de adutos covalentes específicos, por exemplo formados após a exposição a um agente químico específico; [38]

→ Não direcionada (*untargeted*) – Abordagem que pretende caracterizar de forma ampla a totalidade dos conjugados covalentes ligados a um resíduo nucleofílico específico de uma proteína. [38]

Os estudos de adutómica são úteis para estudar os perfis de adutos em diferentes populações com diferentes condições de exposição ou doenças para obter informações valiosas, monitorizar clinicamente fármacos e avaliar as respostas farmacológicas de uma terapia. [35][37] Constituem ainda uma grande oportunidade para o desenvolvimento de biomarcadores que permitem desenvolver ferramentas eficazes para o diagnóstico/prognóstico de doenças e para avaliar com precisão a exposição humana. [38]

2. Objetivo

O objetivo principal deste projeto é identificar biomarcadores específicos de LES. Tendo em conta a relação existente entre o LES e os níveis aumentados de alguns metabolitos reativos derivados dos estrogénios e a evidência preliminar da existência de níveis aumentados de anticorpos anti-adutos de proteínas formados com o metabolito 16OHE1 em doentes de LES, este trabalho tem como objetivo explorar algumas abordagens de MS para a identificação específica de adutos formados entre a HSA e metabolitos reativos derivados dos estrogénios. Essas ferramentas serão posteriormente aplicadas para a identificação deste tipo de adutos em amostras de HSA isoladas do plasma de um grupo composto por doentes com LES, AR, AS e voluntários saudáveis.

3. Materiais e Métodos

3.1 Amostras Clínicas

Para este estudo foram utilizadas amostras de plasma recolhidas e tratadas na Unidade De Patologias Reumatológicas do Hospital Egas Moniz e no Centro de Estudos de Patologias Crónicas FCM-UNL, as amostras foram posteriormente armazenadas a -80 °C. A recolha foi realizada de acordo com as diretrizes da Declaração de Hensinkia e aprovada pela Comissão de Ética Hospitalar e pela Comissão de Proteção de Dados. Todos os participantes assinaram um consentimento informado (recebendo uma cópia do mesmo).

Foram recolhidas amostras de 90 indivíduos com idade superior ou igual a 18 anos onde: n = 19 indivíduos com LES (de acordo com a classificação de LES), n = 23 indivíduos com AS (de acordo com os critérios da *Assessment of SpondyloArthritis international Society* (ASAS)), n = 22 indivíduos com AR (de acordo com os critérios ACR/EULAR) e n = 26 controlos saudáveis.

3.2 Isolamento da Albumina do Soro Humano

i. Adicionar a 200ul de soro descongelado a igual volume de solução de $(NH_4)_2SO_4$ saturada, de modo a ficar com 50% de concentração final ao soro descongelado.
ii. Centrifugar a mistura a 900*g* durante 30 min a 4°C para precipitar as imunoglobulinas
iii. Recolher o sobrenadante
iv. Centrifugar com tubos Amicon de 4mL (10 000 MWCO) a 3800*g* a 4ºC durante 20 min
v. Evaporar até à secura
vi. Adicionar acetonitrilo (±200µl) às amostras e colocar no *speedvac* até a evaporação total do líquido.
vii. Uma vez evaporado todo o líquido pesar entre 3mg a 5mg de cada amostra e colocar num eppendorf rotulado.
viii. De seguida adicionar 500µl de tampão bicarbonato de amónio (ABIC) 50mM pH 7,8 a cada uma das amostras previamente pesadas
ix. Uma vez adicionado o tampão colocar as amostras no ultrassom durante ±30 min, de forma a garantir que as amostras dissolvem corretamente.

3.3 Quantificação de proteína (Método Bradford)

i. A partir de uma solução de *stock* de albumina de soro bovino (BSA) 2mg/ml, preparar as soluções (concentrações: 0 mg/ml, 0,05 mg/ml, 0,1 mg/ml, 0,2 mg/ml, 0,4 mg/ml, 0,6 mg/ml, 0,8 mg/ml, 1 mg/ml) por diluição com água.
ii. Colocar 10µl de cada amostra nos poços da microplaca em triplicado, por ordem crescente de concentração, ocupando assim 24 poços da microplaca.
iii. Diluição das amostras: Caso a amostra se encontre muito concentrada, é necessário fazer uma diluição. A diluição foi de 10x, e para cada amostra foram realizados triplicados.
iv. Adicionar 4µl de cada amostra a 36µl de água, uma vez feita a diluição, pipetar 10µl da mistura em cada poço da microplaca 3x para cada amostra, por fim adicionar 200µl do reagente Bradford em todos os poços da microplaca.
v. Uma vez completa a microplaca, aguardar alguns minutos com a microplaca no escuro.
vi. Efetuar a leitura da absorvância (abs) no comprimento de onda de 595nm no espectrofotómetro- SPECTROstar Nano da BMG LABTECH.

3.4 Digestão de proteína aos aminoácidos

i. De cada amostra retirar 150µg para um eppendorf *low-bind* e adicionar o restante volume em tampão ABIC 50mM (pH=7,8), até perfazer 150µl.
ii. De seguida adicionar 15µl de Pronase E numa proporção de protéase/proteína de 1:10 (p/p) e 0,93µl de Leucine Aminopeptidase numa proporção de protéase/ proteína de 1:30 (p/p). com concentração 5,4mg/ml (já vinha preparada).
iii. Colocar os eppendorfs durante ±18h no *thermomixer* a 37°C e a 300rpm.
iv. Retirar as amostras e colocar no *speedvac* para reduzir à secura.
v. Armazenar a -18°C no congelador
vi. Ressuspender as amostras numa solução com 95% água, 5% acetonitrilo, 0,1% ácido fórmico –150 µl da solução em cada

3.5 Análise por Cromatografia Líquida acoplada por Espectrometria de massa de alta resolução (LC-HRMS) *

As amostras foram analisadas num sistema composto por um UPLC *Elute* - *Ultra Performance Liquid Chromatography* (Bruker, Bremen, Alemanha) conectado a um espetrómetro de massa híbrido (QTOF - quadrupolo conjugado com tempo de voo) IMPACT II (Bruker Daltoniks, Bremen) e equipado com uma fonte de ionização por electrospray (ESI) (Bruker Daltoniks, Bremen). Estas foram separadas em colunas Luna® (Phenomenex) 3µm polar C18 (2) 100 Å (150x2 mm). O fluxo definido para a fase móvel foi de 170µLmin^{-1} recorrendo ao seguinte gradiente: inicia-se com 95% de ácido fórmico 0,1% em água (eluente A), que é mantido por 1,5 min, seguindo-se um gradiente linear de 6,20 min até 100% de acetonitrilo (eluente B), mantendo-se estas condições por 1,8 min, seguiu-se um gradiente de 0,5 min até às condições iniciais, que são mantidas por 1 min. Foram injetados 10 µL de cada amostra e 5 µL de QC Pool.

Os espetros de MS foram adquiridos no modo positivo com os seguintes parâmetros: voltagem do capilar, ± 4,5 kV; gás nebulizador, 4 Bar; fluxo do gás de secagem, 8 Lmin^{-1} e temperatura do gás de secagem, 200 °C.

Cada amostra foi analisada num intervalo de *m/z* compreendido entre 50 e 1500 Da, por dois modos de aquisição distintos: modo data-dependente (DDA, Auto MS) e *broadband collision-induced dissociation* (bbCID). A calibração de cada espetro foi efetuada com uma amostra de formato de amónio que foi analisada por *flow injection analysis* (FIA).

*Procedimento realizado por outro aluno do grupo de investigação.

3.6 Processamentos dos dados obtidos

Os dados recolhidos foram processados pelo software *Compass Data Analysis Version* 4.4 e o software TASQ. Para a utilização do TASQ, na estratégia dirigida, foi construída uma base de dados contendo os valores de *m/z* e tempo de retenção (rt) (quando disponíveis através de padrões) de todos os adutos expectáveis pela modificação de aminoácidos com metabolitos reativos derivados da E1 e E2.

Todos os espetros correspondentes aos adutos covalentes foram verificados manualmente. O desvio de massa exata dos metabolitos de catinona identificados permaneceu abaixo de 5 ppm para o precursor e abaixo de 10 ppm para os fragmentos obtidos.

3.7 Preparação de adutos padrão: modificação *in vitro* de proteínas

A partir dos metabolitos reativos derivados da E1 e do E2, previamente sintetizados por elementos do grupo de investigação onde se realizou esta tese, foi possível fazer a modificação *in vitro* da Hb e da HSA (comercialmente obtidas). Para tal, foram incubadas durante 24h a 37°C as soluções de Hb/HSA (10 mg/mL em tampão fosfato 50 mmM pH 7,4) com uma solução de cada eletrófilo: 16OHE1 (solução etanólica 2 µg/µL, 5 µL), catecóis derivados do E2 (solução etanólica 6,7 µg/µL, 20 µL), catecóis derivados da E1 (solução etanólica 10 µg/µL, 20 µL). Para o metabolito 16OHE1, foi necessário realizar se uma incubação adicional, nas mesmas condições, mas com a presença de um agente redutor cianoboro-hidreto de sódio. No final da incubação, as soluções foram extraídas 3x com acetato de etilo de forma a remover o excesso de eletrófilo que não reagiu.

As amostras obtidas *in vitro*, foram digeridas e analisadas por LC-MS nas mesmas condições utilizadas para as amostras clínicas (como descrito nos pontos 3.5 e 3.6)

4. Resultados e Discussão

O objetivo pretendido para este trabalho passa pela identificação de adutos covalentes formados com a HSA que possam ter um papel importante no diagnóstico de LES. Para isso foi necessário fazer o isolamento da HSA das amostras de sangue dos 3 grupos de doentes envolvidos no estudo: a) doentes de LES; b) doentes de AR; c) doentes de AS e 1 grupo de indivíduos saudáveis.

A HSA é a proteína mais abundante do soro humano, com uma concentração média de aproximadamente 43 mg/ml e um tempo de meia vida que varia entre os 19 e os 25 dias. Uma das razões que levaram a escolher esta proteína para a análise do estudo, deve-se ao facto de já terem sido detetados níveis aumentados de adutos 16OHE1-HSA em doentes de LES. [21] [22] Para além disso, esta é uma proteína frequentemente utilizada para efeitos de monitorização à exposição de metabolitos reativos, não só pela sua elevada abundância, mas também pela facilidade de obtenção numa simples recolha de sangue, e pelo seu longo tempo de meia vida, que permite a acumulação dos adutos. [39]

Uma vez feito o isolamento da proteína das amostras de soro recolhidas dos 4 grupos incluídos no estudo, a proteína foi quantificada e posteriormente digerida. Uma vez que o objetivo seria a identificação de um biomarcador e não a identificação do resíduo exato onde ocorre a modificação, optou-se por seguir a abordagem que se inicia com a digestão da proteína aos aminoácidos, usando uma mistura de Pronase E a leucina aminopeptidase, em vez da abordagem "*bottom-up*". As amostras foram por fim analisadas por LC-HRMS.

Tirando partido da capacidade de síntese em química orgânica do grupo de investigação onde este trabalho se desenvolveu, foi possível preparar padrões sintéticos dos adutos covalentes formados entre a HSA, tanto com as quinonas derivadas do E1 e E2 como com o 16OHE1. Para tal, os metabolitos previamente sintetizados foram incubados *in vitro* com HSA e Hb comercial, que foram posteriormente digeridas e analisadas por LC-HRMS, nas mesmas condições utilizadas para as amostras clínicas. Este procedimento possibilitou a criação de uma base de dados com os dados de LC-HRMS (tempo de retenção, *m/z* da molécula protonada e respetivos fragmentos maioritários) para cada um dos metabolitos padrão. A criação desta base de dados permite assim que seja feita uma procura seletiva destes adutos nas amostras clínicas – abordagem direcionada. Na Figura 4.1 encontra-se uma visão geral resumida do trabalho desenvolvido no decorrer do trabalho.

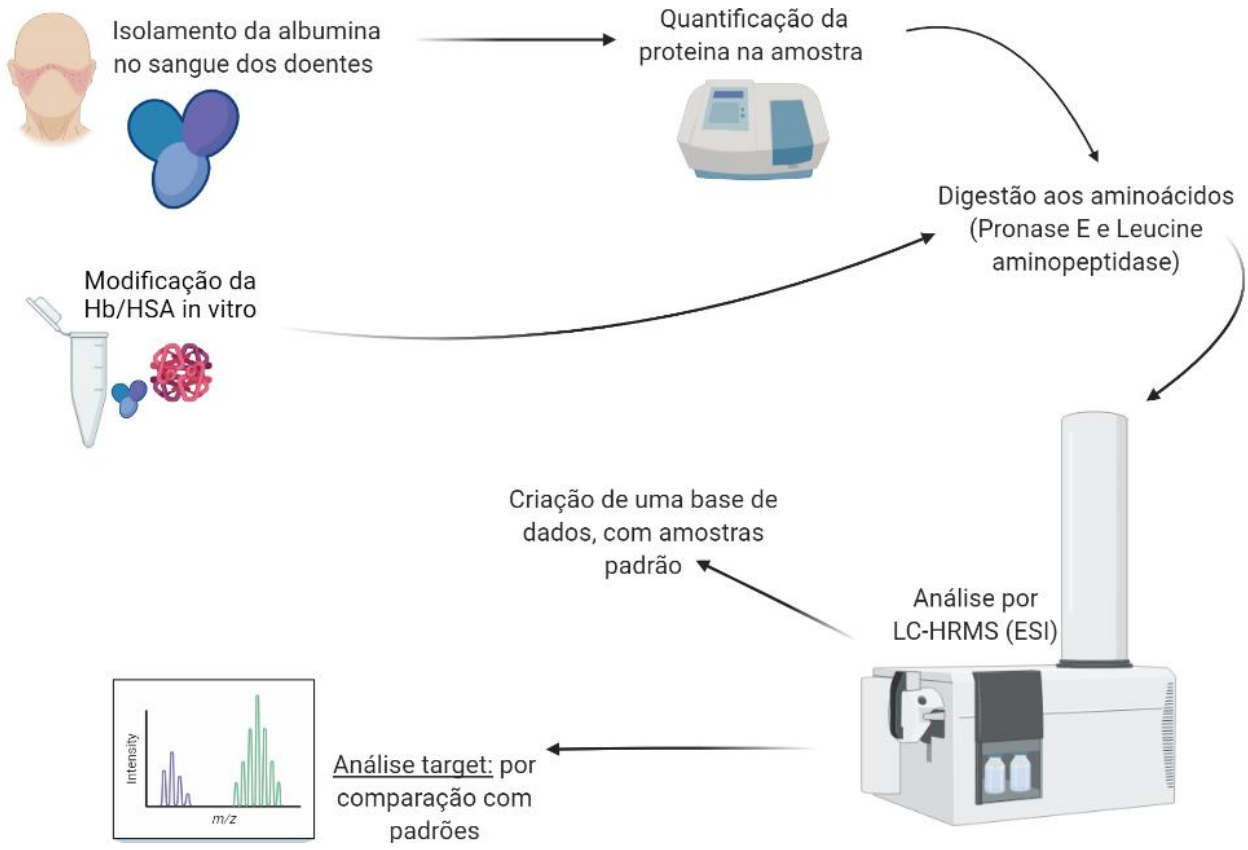

Figura 4.1 - Visão geral do trabalho desenvolvido ao longo do tempo

4.1 Caracterização da População em estudo

Para a realização deste estudo foram selecionados 90 indivíduos, de três grupos distintos: LES, AR, AS e indivíduos saudáveis (como grupo de controlo). Estas doenças caracterizam-se por serem todas doenças inflamatórias crónicas, com a envolvência da área reumatoide. Como apresentado anteriormente, o LES apresenta uma maior prevalência nas mulheres, assim como a AR, sendo que muitos dos sintomas de ambas se sobrepõe. Já no caso da AS esta apresenta uma prevalência muito maior nos homens e com um envolvimento mais predominante no sistema muscoloesquelético, diferenciando-se assim das outras duas patologias deste estudo. Na Tabela 4.1 encontra-se a caracterização da população em estudo, os resultados apresentados foram previamente feitos por outro aluno do grupo de investigação.

Tabela 4.1 - Caracterização da População em Estudo por SPSS: a = média ± desvio padrão; b = entre grupos; c = Teste do Qui Quadrado; d = Teste ANOVA; e T-test; ns = não significativo; AS = espondilite anquilosante; RA = artrite reumatoide; LES = lúpus eritematoso sistêmico; IMC = índice de massa corporal;

Variável	*LES*	*AR*	*AS*	*Controlos Saudáveis*	*p-value* [b]
n	19	22	23	26	
Mulheres, n (%)	17 (89)	20 (90)	9 (39)	7 (27)	<0.001 [c]
Idade (anos), n (%)	47±13 [a]	57±13 [a]	37±6 [a]	37±7 [a]	<0.001 [d]
IMC (Kg/m^2), n (%)	26±3,47 [a]	27,23±4,34 [a]	24±0,2 [a]		ns [e]
Crossfit (Sim), n (%)				5 (19)	

4.2 Quantificação de proteínas (Método Bradford)

Depois do isolamento da HSA das amostras de soro e antes de se proceder à digestão, foi necessário fazer a determinação da concentração da proteína, pelo método de Bradford para que se pudesse determinar a quantidade de enzima a utilizar na digestão e depois na análise.

Nas primeiras medições de abs as amostras foram feitas em duplicado, porém nas segundas medições decidiu-se que seriam feitas em triplicado de forma a diminuir quaisquer erros que possam existir. Uma vez obtidos os valores da abs, foram construídas as retas de calibração com as concentrações de BSA e abs, de forma a calcular os valores da concentração da proteína em cada amostra. No apêndice encontra-se a Tabela 7.1 com os valores de concentração de proteína obtidos a partir das respetivas equações da reta e os valores a adicionar de volume de proteína e ABIC, após feitos os respetivos cálculos.

4.3 Identificação de adutos formados a partir dos metabolitos reativos do estrogénio nas amostras provenientes da modificação *in vitro* da Hb/HSA (adutos padrão)

A modificação *in vitro* das proteínas Hb/HSA com os metabolitos reativos derivados da E1/E2, permitiu a identificação de alguns adutos. A identificação foi feita no modo DDA, tendo-se obtido os espectros MS em dois modos: modo *full scan* (MS) e em tandem (MS/MS) simultaneamente numa única injeção.

Através do *software Data Analysis* foi possível caracterizar os adutos de acordo com os seus tempos de retenção, *m/z* e espectro de fragmentação (tandem). Foram analisados todos os espectros obtidos para a Hb e HSA. No entanto, quando encontrados resultados nos dois espectros apenas ficou o que apresentava o melhor erro experimental, para os espectros de *full scan* o erro terá que ser menor que 5ppm e para os espectros em tandem menor que 10ppm.

A análise das amostras foi dividida em 3 tipos de adutos:

- Adutos formados a partir da 16-OHE1, por rearranjo de Heyns ou redução, reagindo com a Lis. Pode ser ainda possível visualizar a formação de bis-adutos, com a entrada de uma segunda molécula, com a Lis, Hist e valina (Val) terminal (no caso da Hb). [30]

- Adutos formados a partir das quinonas derivadas da E1 e do E2 com a Cis, Hist, Lis e serina (Ser). [30]

Para cada aduto expectável foi calculado o valor teórico de *m/z* da sua molécula protonada. Este valor foi depois utilizado para procurar manualmente (através do programa *Data* Analysis) nas amostras de Hb ou HSA modificadas *in vitro* com cada um dos metabolitos derivados da E1/E2. Para tal, fez-se o cromatograma iónico extraído, do valor de *m/z* de cada um dos adutos expectáveis. Uma vez obtido um sinal, foi possível determinar não só o erro associado à molécula protonada, mas também a caracterização do padrão de fragmentação obtido para cada aduto, assim como o erro associado a cada um dos fragmentos encontrados. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 7.2, no apêndice.

4.3.1 Identificação dos adutos derivados do 16OHE1

Na análise da HSA e Hb modificada in vitro com 16-OHE1 foi possível identificar o aduto formado por rearranjo de Heyns entre a 16-OHE1 e a Lis com um valor de *m/z* de 415,2592 (± 0,2 ppm) no espectro de *full scan*, com um rt de 5,5 minutos. No espectro de MS/MS observou-se um fragmento maioritário a *m/z* de 352,2275 (± 1,14 ppm) e um *m/z* de 286,1798 (± 1,05 ppm) (Figura 4.2). Foi também possível encontrar, o aduto formado por redução da base de Schiff entre a 16alfa-OHE1 e a Lis. Este aduto apresenta um valor de *m/z* de 417,2748 (± 0,2 ppm) no espectro de *full scan*, com um rt de 5,5 minutos. Os fragmentos encontrados no espectro de MS/MS apresentam um valor de *m/z* de 399,2643 (± 1,25 ppm) e um *m/z* de 354,2428 (± 1,41 ppm) (Figura 4.3).

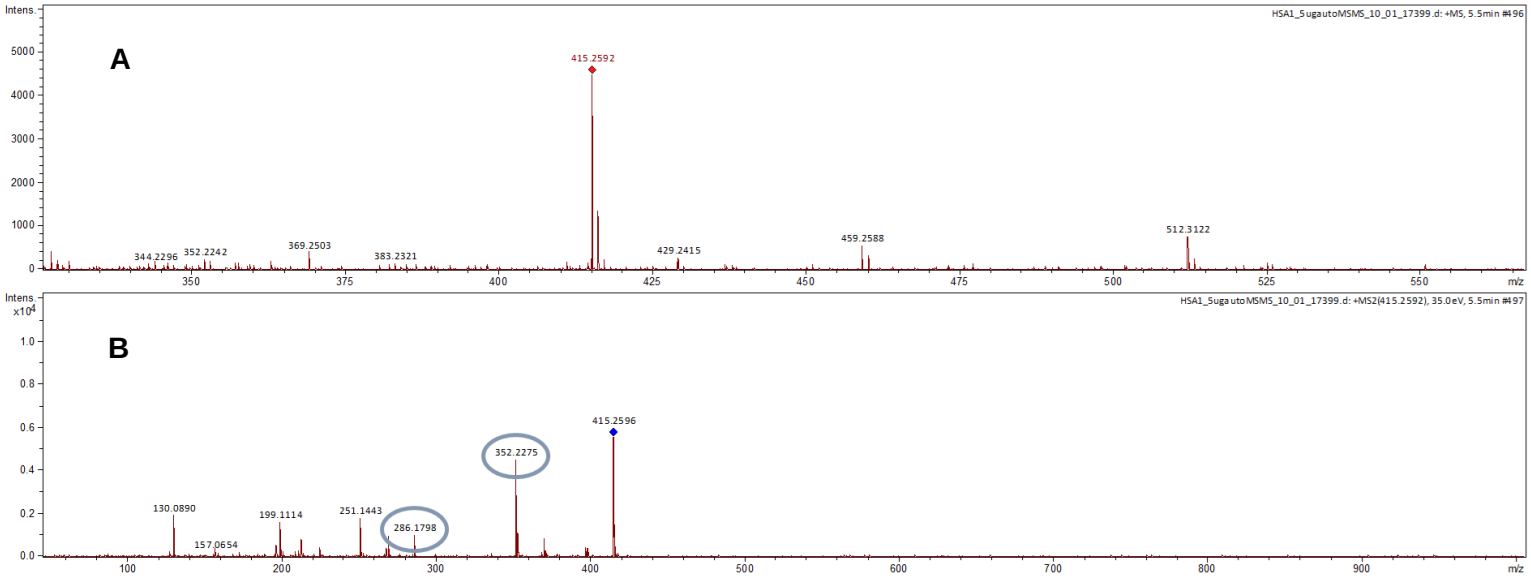

Figura 4.2 - Identificação do aduto 16-OHE1-Lis (por rearranjo de Heyns) numa amostra de HSA. (A) Espectro de full scan obtido por HRMS da molécula protonada do aduto 16-OHE1-Lis e correspondente estrutura química. (B) Espectro de MS/MS da molécula protonada do aduto 16-OHE1-Lis e dos dois fragmentos encontrados e as suas estruturas químicas.

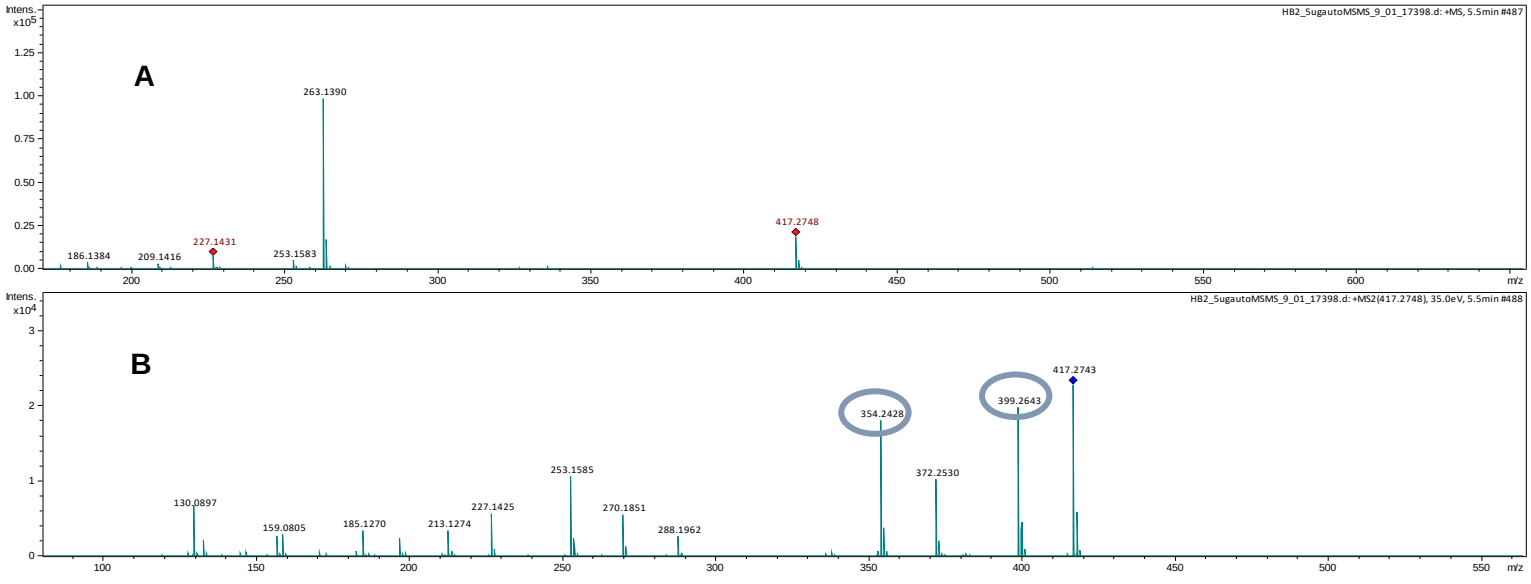

Figura 4.3 - Identificação do aduto 16-OHE1-Lis (por redução) numa amostra de Hb. (A) Espectro de full scan obtido por HRMS da molécula protonada do aduto 16-OHE1-Lis e correspondente estrutura química. (B) Espectro de MS/MS da molécula protonada do aduto 16-OHE1-Lis e dos dois fragmentos encontrados e as suas estruturas químicas.

4.3.2 Identificação dos adutos derivados da estrona e do estradiol

Tendo como base o trabalho realizado anteriormente pelo grupo de investigação [40], seria de esperar que as Cis fossem os aminoácidos que mais favoravelmente formavam adutos com os metabolitos quinóides derivados do E1 e E2. No entanto, neste trabalho foi também visto que outros aminoácidos, nomeadamente a Hist, Ser e Lis, poderão estar envolvidos na formação de adutos covalentes com estes metabolitos reativos. Era também já esperada a possibilidade de formação de adutos com as quinonas, assim como, com os *quinone methides*.

Para o caso específico da HSA, como esta proteína apresenta apenas uma Cis que é nucleofílica, ainda foi colocada a hipótese de as condições enzimáticas não terem digerido totalmente à Cis, e existir a formação de dipéptidos. Tendo em conta a sequência da HSA, colocou-se ainda a possibilidade de se formarem outros adutos resultantes da digestão incompleta até ao aminoácido da Cis 34. [40]

Depois de definidos todos as possibilidades de adutos que se poderiam formar, foi então feita a pesquisa no *Data Analysis* para todas as amostras modificadas *in vitro*. No entanto, surpreendentemente apenas se identificaram adutos formados com os QM, formados por oxidação/isomerização das quinonas geradas, e não foram encontrados adutos formados com Cis (nem nas amostras de Hb nem de HSA modificadas *in vitro*). Foram apenas identificados adutos de Hist formado com um diQM e um aduto de Lis formado com um QM.

Identificou-se a ligação entre a Lis e QM-E1, no espectro de *full scan* com um valor de *m/z* de 429,2360 (± 2,9 ppm), com um rt de 6,6 minutos. No espectro de MS/MS encontraram se 3 fragmentos maioritários com o valor de *m/z* de 383,2312 (± 5,74 ppm); *m/z* de 366,2048 (± 5,73 ppm) e *m/z* de 302,1724 (± 10,6 ppm) (Figura 4.4). O segundo aduto identificado foi entre a Hist e diQM-E1, no espectro de *full scan* com um valor de *m/z* de 439,1875 (± 1,83 ppm), com um rt de 5,6 minutos. No espectro de MS/MS foi apenas possível detetar um fragmento maioritário com um valor de *m/z* de 390,1814 (± 0,51 ppm) (Figura 4.5).

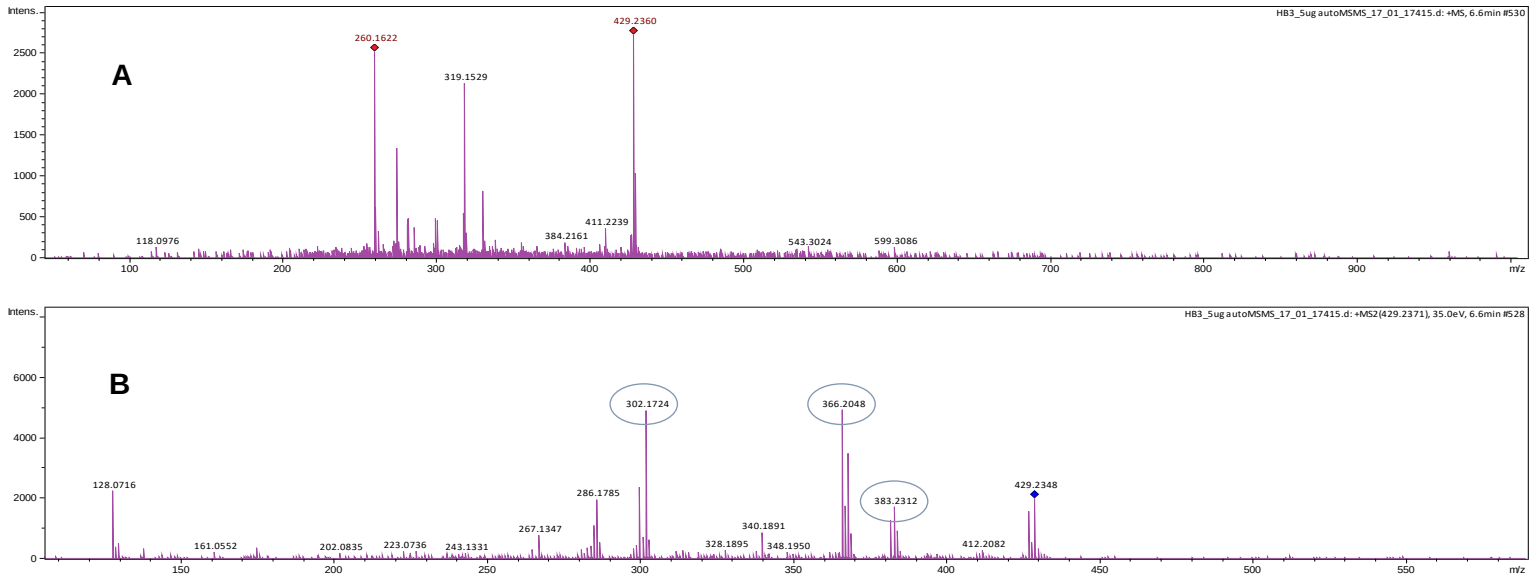

Figura 4.4 - Identificação do aduto QM-E1-Lis numa amostra de Hb. (A) Espectro de full scan obtido por HRMS da molécula protonada do aduto QM-E1-Lis e correspondente estrutura química. (B) Espectro de MS/MS da molécula protonada do aduto QM-E1-Lis e dos três fragmentos encontrados e as suas estruturas químicas.

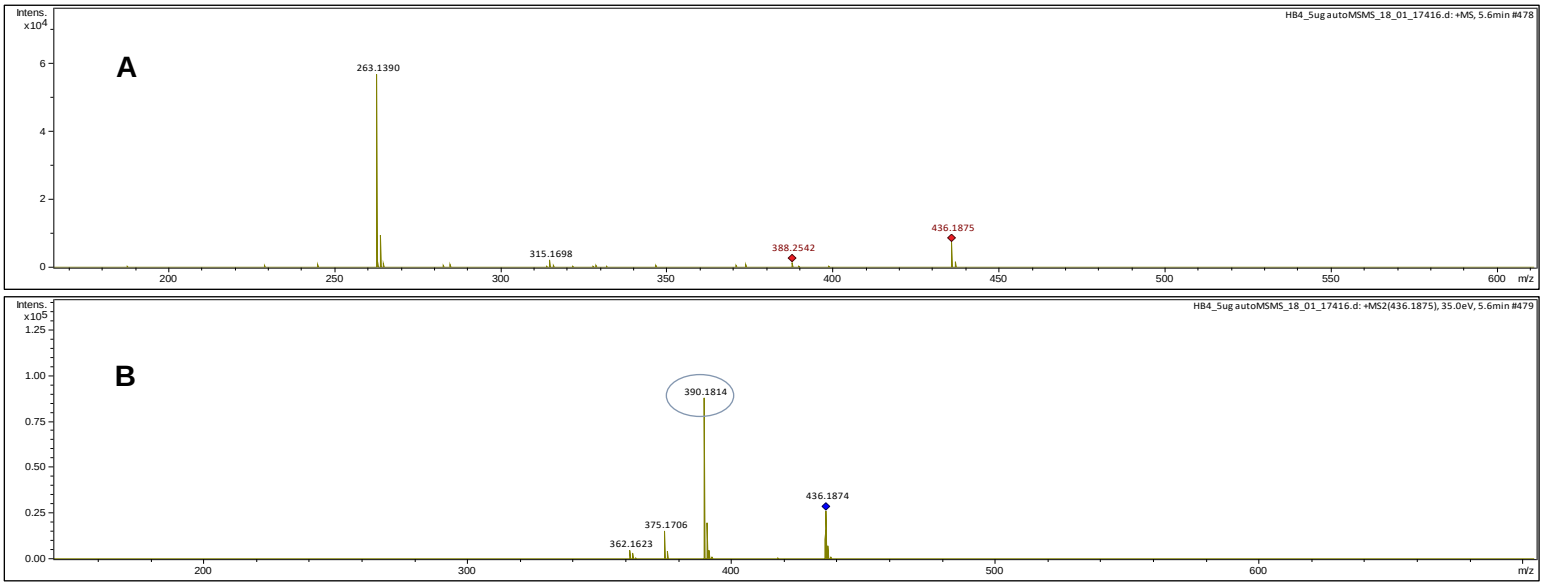

Figura 4.5 - Identificação do aduto diQM-E1-Hist numa amostra de Hb. (A) Espectro de full scan obtido por HRMS da molécula protonada do aduto diQM-E1-Hist e correspondente estrutura química. (B) Espectro de MS/MS da molécula protonada do aduto diQM-E1-Hist e do fragmento encontrado e a sua estrutura química.

No caso das amostras de Hb e HSA modificadas com os catecóis derivados do E2, os resultados foram muito similares aos obtidos nas amostras modificadas com os catecóis derivados da E1. A molécula protonada do aduto de Hist diQM-E2, apresenta no espectro de *full scan* um valor de *m/z* de 438,2017 (± 3,98 ppm), com um rt de 5,3 minutos. No espectro de MS/MS foi apenas possível detetar um fragmento maioritário com um valor de *m/z* de 392,1970 (± 1,02 ppm) (Figura 4.6). O segundo aduto

identificado foi entre a Lis e QM-E2, no espectro de *full scan* com um valor de *m/z* de 431,2534 (± 1,39 ppm), com um rt de 6,4 minutos. No espectro de MS/MS encontraram se 2 fragmentos maioritários com o valor de *m/z* de 368,2226 (± 0,27 ppm) e um *m/z* de 304,1905 (± 2,30 ppm) (Figura 4.7).

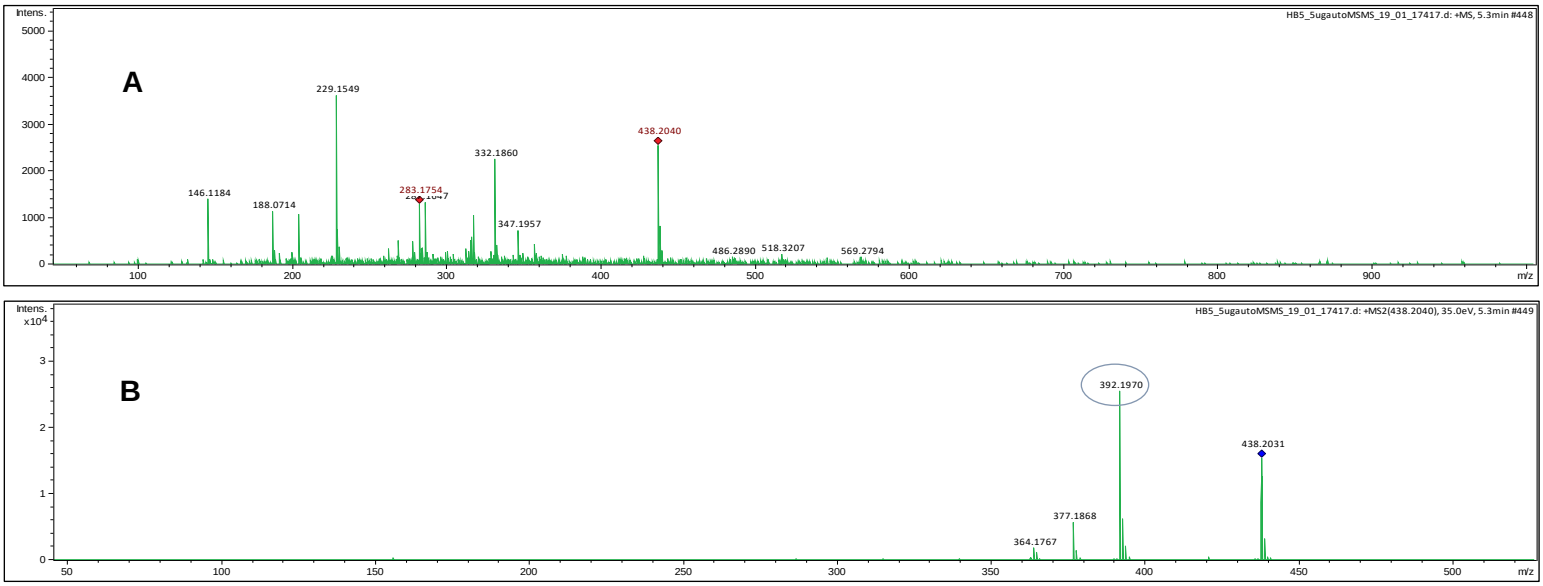

Figura 4.6 - Identificação do aduto diQM-E2-Hist numa amostra de Hb. (A) Espectro de full scan obtido por HRMS da molécula protonada do aduto diQM-E2-Hist e correspondente estrutura química. (B) Espectro de MS/MS da molécula protonada do aduto diQM-E2-Hist e do fragmento encontrado e a sua estrutura química.

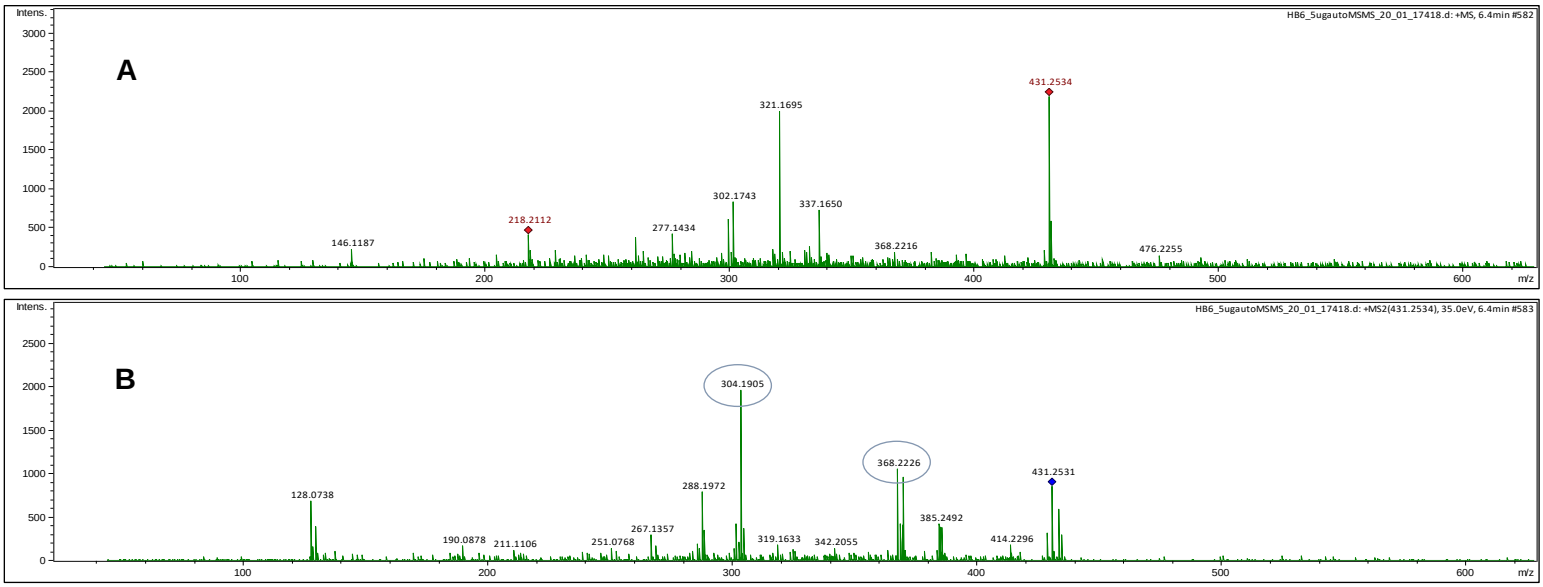

Figura 4.7 - Identificação do aduto QM-E2-Lis numa amostra de Hb. (A) Espectro de full scan obtido por HRMS da molécula protonada do aduto QM-E2-Lis e correspondente estrutura química. (B) Espectro de MS/MS da molécula protonada do aduto QM-E2-Lis e do fragmento encontrado e a sua estrutura química.

4.3.3 Construção da base de dados com os adutos padrão

Uma vez identificados todos as adutos padrão, foi possível criar uma base de dados mais completa (Tabela 4.2) a partir dos dados obtidos, como os valores de *m/z* das moléculas protonadas e dos seus fragmentos assim como os seus rt. Nesta base de dados encontram-se todos os adutos anteriormente pesquisados manualmente no *Data Analysis,* independentemente de terem sido encontrados ou não nas amostras modificadas *in vitro*.

Esta base de dados irá permitir o processamento dos dados das amostras clínicas de uma forma qualitativa e quantitativa, permitindo analisar várias amostras de uma só vez. O programa utilizado para este efeito foi o software TASQ 1.4, que permite a comparação das propriedades físicas das moléculas em análise com as propriedades físicas já conhecidas das moléculas da base de dados, que funcionam como uma referência. Sendo que os valores teóricos e experimentais são comparados e avaliados estatisticamente fornecendo uma pontuação para cada identificação. A partir deste software é também possível obter os respetivos cromatogramas das amostras e espectros de massa.

Tabela 4.2 - Base de dados dos adutos formados com os metabolitos derivados da estrona e do estradiol, cada aduto apresenta a sua fórmula química, rt, valor de m/z da molécula protonada e respetivos fragmentos encontrados.

Nome	*Fórmula Química*	*Rt (min)*	*m/z*	*Qual1*	*Qual2*	*Qual3*
16-OHE1-Lis Heyns	$C_{24}H_{34}N_2O_4$	5,5	415,2592	352,2275	286,1798	
16-OHE1-Lis red	$C_{24}H_{36}N_2O_4$	5,5	417,2748	399,2643	354,2428	
16-OHE1-LisLis bis	$C_{30}H_{48}N_4O_5$		545,3697			
16-OHE1-LisHist bis	$C_{30}H_{43}N_5O_5$		526,3275			
16-OHE1-ValHist bis	$C_{28}H_{43}N_3O_5$		502,3275			
Q-E1-Cis	$C_{21}H_{27}NO_5S$		406,1682			
Q-E1-Hist	$C_{24}H_{29}N_3O_5$		440,2179			
Q-E1-Ser	$C_{21}H_{27}NO_6$		390,1911			
Q-E1-Lis	$C_{24}H_{34}N_2O_5$		431,2540			

QM-E1-Cis	$C_{21}H_{25}NO_5S$		404,1526			
QM-E1-Hist	$C_{24}H_{27}N_3O_5$		438,2023			
QM-E1-Ser	$C_{21}H_{25}NO_6$		388,1754			
QM-E1-Lis	$C_{24}H_{32}N_2O_5$	6,6	429,2360	383,2312	366,2048	302,1724
diQM-E1-Hist	$C_{24}H_{25}N_3O_5$	5,6	436,1875	390,1814		
Q-E2-Cis	$C_{21}H_{29}NO_5S$		408,1839			
Q-E2-Hist	$C_{24}H_{31}N_3O_5$		442,2336			
Q-E2-Ser	$C_{21}H_{29}NO_6$		392,2067			
Q-E2-Lis	$C_{24}H_{36}N_2O_5$		433,2696			
QM-E2-Cis	$C_{21}H_{27}NO_5S$		406,1682			
QM-E2-Hist	$C_{24}H_{29}N_3O_5$		440,2179			
QM-E2-Ser	$C_{21}H_{27}NO_6$		390,1911			
diQM-E2-Hist	$C_{24}H_{28}N_3O_5$	5,3	438,2017	392,1970		
QM-E2-Lis	$C_{24}H_{34}N_2O_5$	6,4	431,2534	368,2226	304,1905	
E1-Cis34+AA$_1$	$C_{26}H_{32}N_2O_6S$		501,2053			
E1-Cis34+AA$_2$	$C_{26}H_{34}N_2O_6S$		503,2210			
E1-Cis34+AA$_3$	$C_{35}H_{41}N_3O_7S$		648,2737			
E1-Cis34+AA$_4$	$C_{35}H_{43}N_3O_7S$		650,2894			
E2-Cis34+AA$_1$	$C_{26}H_{34}N_2O_6S$		503,2210			
E2-Cis34+AA$_2$	$C_{26}H_{36}N_2O_6S$		505,2366			
E2-Cis34+AA$_3$	$C_{35}H_{43}N_3O_7S$		650,2894			
E2-Cis34+AA$_4$	$C_{35}H_{45}N_3O_7S$		652,3050			

De forma a confirmar se realmente estes adutos eram identificados pelo software TASQ, procedeu-se à análise das amostras provenientes da modificação *in vitro* da Hb/HSA. Foi assim possível confirmar a presença de todos os adutos à exceção do aduto QM-E2-Lis. Alguns adutos foram identificados tanto nas amostras de Hb como nas de HSA.

Na Tabela 4.3 encontram-se os valores obtidos após a análise pelo TASQ, este software tem por base a classificação por um método de pontuação. A partir da base de dados fornecida e os dados das amostras a analisar, é calculada uma pontuação para cada analito encontrado a partir da precisão de massa, rt, ajuste de padrão de isótopo (valor Sigma) e iões qualificadores (fragmentos). A pontuação é dada por uma associação de símbolos a cores, sendo atribuído à melhor pontuação o símbolo e cor (++), a segunda pontuação (+) e por fim a última pontuação (-).

Tabela 4.3 - Adutos formados com os metabolitos derivados da estrona e do estradiol, identificados a partir da base de dados criada no software TASQ

Ficheiro	*Aduto*	*RT Score*	*ΔRT [min]*	*m/z Score*	*Δm/z [ppm]*	*IR Q1*	*mSigma Score*	*mSigma*
HB1auto MSMS_5ug_8_01_17397	16-OHE1-Lis Heyns	++	-0,02	+	1,68	0,117	+	19,3
HSA1_5ugautoMSMS_10_01_17399	16-OHE1-Lis Heyns	++	-0,03	+	2,17			43,8
HB2_5ugautoMSMS_9_01_17398	16-OHE1-Lis red	++	-0,04	+	1,44	0,269	++	5,2
HSA2 auto MS_5ug_11_01_17400	16-OHE1-Lis red	++	-0,03	+	1,68	0,148	+	17,4
HB3_5ug autoMSMS_17_01_17415	QM-E1-Lis	++	-0,02	+	0,53		+	16,4
HSA3 auto_5ug_12_01_17410	diQM-E1-Hist	++	0,00	+	0,27			108,6
HSA3 auto_5ug_12_01_17410	QM-E1-Lis	++	-0,05	+	0,46	0,274	++	6,3
HB4_5ug autoMSMS_18_01_17416	diQM-E1-Hist	++	-0,01	+	1,36		+	13,5

4.4 Procura dos adutos em amostras clínicas e perspetivas futuras

Uma vez confirmada que a base de dados criada estava funcional, foi então feita a identificação nas amostras clínicas. Através da base de dados criada, esta foi corrida no software TASQ 1.4 permitindo a identificação dos adutos de uma forma mais rápida, uma vez que permite analisar várias amostras de uma só vez. As amostras foram divididas pelo tipo de processamento a que foram sujeitas, ficando assim divididas por: auto MS/MS; bbcid e *full-scan*. Este procedimento foi feito de forma a garantir um melhor processamento das amostras. No entanto, não foi possível detetar nenhum dos adutos derivados dos metabolitos de estrogénios que se encontravam na base de dados.

Foram ainda feitas alterações à base de dados, onde se deixou apenas o valor do fragmento maioritário, retirou-se todos os fragmentos assim como o rt. Experimentou-se também dividir a base de dados primeiro para apenas os adutos formados com o 16-OHE1, e separou-se também os adutos da E1 e E2, pois muitos valores sobrepõem-se entre os Q e QM, podendo constituir fatores de confusão na deteção. Ainda assim não foram obtidos quaisquer resultados apesar de todas as alterações possíveis a fazer aos parâmetros.

Tendo em consideração a baixa abundância de adutos de proteínas expectáveis *in vivo*, uma das razões possíveis para não terem sido identificados quaisquer adutos nas amostras clínicas, poderá dever-se ao facto de a fração modificada da proteína ser em geral muito inferior à fração não modificada, dificultando a deteção dos adutos. Assim, o passo a seguir para melhorar os resultados, passaria por um enriquecimento de adutos antes da análise por MS.

5. Conclusão

Com o objetivo de identificar possíveis biomarcadores específicos de LES, neste trabalho explorou-se a identificação direcionada de adutos covalentes formados entre metabolitos reativos derivados dos estrogénios e a proteína HSA, por LC-HRMS, num grupo de amostras obtidas de três grupos clínicos: doentes LES, AR, AS e controlos saudáveis.

Um passo importante neste trabalho foi a possibilidade de caracterizar por LC-HRMS adutos padrão, preparados *in vitro* por reação entre os metabolitos reativos derivados dos estrogénios (pré-sintetizados por elementos do grupo de investigação onde este trabalho se desenvolveu). Efetivamente, este passo permitiu a criação de uma base de dados, usando o software *Data Analysis*, com os dados de LC-HRMS (tempo de retenção, *m/z* da molécula protonada e dos fragmentos maioritários obtidos) conferindo uma maior especificidade à base de dados.

Uma vez caracterizados os adutos padrão, procedeu-se à análise das amostras clínicas utilizando o software TASQ 1.4, onde é possível comparar os valores presentes na base de dados com os valores experimentais e analisar várias amostras de uma só vez, ao contrário do software referido anteriormente, onde é necessário analisar uma a uma. No entanto, não foi possível detetar nenhum dos adutos derivados dos metabolitos de estrogénios que se encontravam na base de dados, mesmo com várias alterações dos parâmetros na base de dados, na tentativa de melhorar os resultados. Porém a construção da base de dados representa um avanço bastante importante para futuras análises, uma vez que a formação deste tipo de adutos poderá estar associada a vários tipos de doenças.

Uma das razões possíveis para não terem sido identificados os adutos alvo nas amostras clínicas, poderá dever-se ao facto de a fração modificada da proteína ser em geral muito inferior à fração não modificada, dificultando a deteção dos adutos. Assim, é expectável que haja necessidade de recorrer a processos de enriquecimento de adutos antes da análise por MS.

6. Bibliografia

[1] Bertsias, G., Cervera, R., & Boumpas, D. T. (2012). Systemic lupus erythematosus: pathogenesis and clinical features. *EULAR textbook on rheumatic diseases*, *5*, 476-505.

[2] Sawalha, A. H., & Harley, J. B. (2004). Antinuclear autoantibodies in systemic lupus erythematosus. *Current opinion in rheumatology*, *16*(5), 534-540.

[3] Mok, C. C., & Lau, C. S. (2003). Pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Journal of clinical pathology*, *56*(7), 481-490.

[4] Gill, J. M., Quisel, A. M., Rocca, P. V., & Walters, D. T. (2003). Diagnosis of Systemic Lupus Erythematossus. *American family physician*, *68*(11), 2179-2186.

[5] Haggstrom, M. (2014). Medical gallery of Mikael Haggstrom 2014. *WikiJournal of Medicine, 1*(2), 1.

[6] Aringer, M., Costenbader, K., Daikh, D., Brinks, R., Mosca, M., Ramsey-Goldman, R., ... & Jayne, D. (2019). 2019 European League Against Rheumatism/American College of Rheumatology classification criteria for systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatology*, *71*(9), 1400-1412.

[7] Illei, G. G., Tackey, E., Lapteva, L., & Lipsky, P. E. (2004). Biomarkers in systemic lupus erythematosus: I. General overview of biomarkers and their applicability. Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology, 50(6), 1709-1720Yazdany, J., & Dall'Era, M. (2019). Definition and classification of lupus and lupus-related disorders. In *Dubois' Lupus Erythematosus and Related Syndromes* (pp. 15-22).

[8] Lahita, R. G. (2000). Sex hormones and systemic lupus erythematosus. Rheumatic Disease Clinics of North America, 26(4), 951-968.

[9] Moulton, V. R. (2018). Sex hormones in acquired immunity and autoimmune disease. Frontiers in immunology, 9, 2279.

[10] Chakravarty, E. F., & Sammaritano, L. R. (2019). Pregnancy and Autoimmune Disease, Reproductive and Hormonal Issues. In Dubois' Lupus Erythematosus and Related Syndromes (pp. 499-519).

[11] Khan, W. A., Habib, S., Khan, W. A., & Alam, K. (2008). Enhanced binding of circulating SLE autoantibodies to catecholestrogen-copper-modified DNA. *Molecular and cellular biochemistry*, *315*(1-2), 143-150.

[12] Weidler, C., Härle, P., Schedel, J., Schmidt, M., Schölmerich, J., & Straub, R. H. (2004). Patients with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus have increased renal excretion of mitogenic estrogens in relation to endogenous antiestrogens. The Journal of rheumatology, 31(3), 489-494.

[13] Thomas, M. P., & Potter, B. V. (2013). The structural biology of oestrogen metabolism. The Journal of steroid biochemistry and molecular biology, 137, 27-49.

[14] Khan, M. F., & Wang, G. (2018). Environmental agents, oxidative stress and autoimmunity. Current opinion in toxicology, 7, 22-27.

[15] Alzolibani, A. A., Al Robaee, A. A., Al-Shobaili, H. A., & Rasheed, Z. (2013). 4-Hydroxy-2-nonenal modified histone-H2A: a possible antigenic stimulus for systemic lupus erythematosus autoantibodies. Cellular immunology, 284(1-2), 154-162.

[16] Khan, M. A., Dixit, K., Uddin, M., Malik, A., & Alam, K. (2012). Role of peroxynitrite-modified H2A histone in the induction and progression of rheumatoid arthritis. *Scandinavian journal of rheumatology*, *41*(6), 426-433.

[17] Törnqvist, M., Fred, C., Haglund, J., Helleberg, H., & Paulsson, B. (2002). Protein adducts: quantitative and qualitative aspects of their formation, analysis and applications. Journal of chromatography. B, Biomedical sciences and applications, 778(1-2), 279-308.

[18] Naisbitt, D. J., Pirmohamed, M., & Park, B. K. (2003). Immunopharmacology of hypersensitivity reactions to drugs. Current allergy and asthma reports, 3(1), 22-29.

[19] Wang, G., Pierangeli, S. S., Papalardo, E., Ansari, G. A. S., & Khan, M. F. (2010). Markers of oxidative and nitrosative stress in systemic lupus erythematosus: correlation with disease activity. *Arthritis & Rheumatism*, *62*(7), 2064-2072.

[20] Hardt, U., Larsson, A., Gunnarsson, I., Clancy, R. M., Petri, M., Buyon, J. P., ... & Grönwall, C. (2018). Autoimmune reactivity to malondialdehyde adducts in systemic lupus erythematosus is associated with disease activity and nephritis. *Arthritis research & therapy*, *20*(1), 36.

[21] Bucala, R., Fishman, J., and Cerami, A. (1984) The Reaction of 16 alpha-hydroxyestrone with erythrocytes *in vitro* and *in vivo*. Eur. J. Biochem. 140 (3), 593−598. Bucala, R., Fishman, J., and Cerami, A. (1984) The Reaction of 16 alpha-hydroxyestrone with erythrocytes *in vitro* and *in vivo*. Eur. J. Biochem. 140 (3), 593−598.

[22] Bucala R, Lahita RG, Fishman J, Cerami A. Increased Levels of 16α-Hydroxyestrone-Modified Proteins in Pregnancy and in Systemic Lupus Erythematosus. J Clin Endocrinol Metab. 1985;60(5):841–7.

[23] Khan, W. A., Zaman, G. S., Alouffi, S., & Khan, M. W. A. (2019). Depression and its related parameters increased the production of autoantibodies against 16α-hydroxyestrone-albumin complex in systemic lupus erythematosus. *International immunopharmacology*, *71*, 215-223.

[24] *Fuentes, N., & Silveyra, P. (2019). Estrogen receptor signaling mechanisms. In Advances in protein chemistry and structural biology (Vol. 116, pp. 135-170). Academic Press.*

[25] *Denver, N., Khan, S., Homer, N. Z., MacLean, M. R., & Andrew, R. (2019). Current strategies for quantification of estrogens in clinical research. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 192, 105373.*

[26] Cutolo, M., Sulli, A., & Straub, R. H. (2012). Estrogen metabolism and autoimmunity. Autoimmunity reviews, 11(6-7), A460-A464.

[27] *Pham, G. S., & Mathis, K. W. (2019). Autoimmunity, estrogen, and lupus. In Sex Differences in Cardiovascular Physiology and Pathophysiology (pp. 219-237). Academic Press.*

[28] *Thomas, M. P., & Potter, B. V. (2013). The structural biology of oestrogen metabolism. The Journal of steroid biochemistry and molecular biology, 137, 27-49.*

[29] *Khan, W. A., Uddin, M., Khan, M. W. A., & Chabbra, H. S. (2009). Catecholoestrogens: possible role in systemic lupus erythematosus. Rheumatology, 48(11), 1345-1351.*

[30] Charneira, C., Nunes, J., & Antunes, A. M. (2020). 16α-Hydroxyestrone: mass spectrometry-based methodologies for the identification of covalent adducts formed with blood proteins. *Chemical Research in Toxicology*, *33*(8), 2147-2156.

[31] *Yager, J. D. (2000). Endogenous estrogens as carcinogens through metabolic activation. Journal of the National Cancer Institute Monographs, 27(27), 67–73.*

[32] Iverson, S. L., Shen, L., Anlar, N., & Bolton, J. L. (1996). Bioactivation of estrone and its catechol metabolites to quinoid− glutathione conjugates in rat liver microsomes. *Chemical research in toxicology*, *9*(2), 492-499.

[33] Bolton, J. L., & Shen, L. (1996). p-Quinone methides are the major decomposition products of catechol estrogen o-quinones. *Carcinogenesis*, *17*(5), 925-929.

[34] Cao, K., Devanesan, P. D., Ramanathan, R., Gross, M. L., Rogan, E. G., & Cavalieri, E. L. (1998). Covalent binding of catechol estrogens to glutathione catalyzed

by horseradish peroxidase, lactoperoxidase, or rat liver microsomes. *Chemical research in toxicology*, *11*(8), 917-924.

[35] Golime, R., Chandra, B., Palit, M., & Dubey, D. K. (2019). Adductomics: a promising tool for the verification of chemical warfare agents' exposures in biological samples. *Archives of toxicology*, 1-12.

[36] Törnqvist, M., Fred, C., Haglund, J., Helleberg, H., & Paulsson, B. (2002). Protein adducts: quantitative and qualitative aspects of their formation, analysis and applications. *Journal of chromatography. B, Biomedical Sciences and Applications*, *778*(1-2), 279-308.

[37] Yang, X., & Bartlett, M. G. (2016). Identification of protein adduction using mass spectrometry: Protein adducts as biomarkers and predictors of toxicity mechanisms. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, *30*(5), 652-664.

[38] Nunes, J., Charneira, C., Morello, J., Rodrigues, J., Pereira, S. A., & Antunes, A. M. (2019). Mass spectrometry-based methodologies for targeted and untargeted identification of protein covalent adducts (Adductomics): current status and challenges. High-throughput, 8(2), 9.

[39] Sabbioni, G., & Turesky, R. J. (2017). Biomonitoring human albumin adducts: the past, the present, and the future. *Chemical research in toxicology*, *30*(1), 332-366.

[40] Charneira, C. (2020)., Lupus Eritematoso Sistémico: desenvolvimento de metodologias baseadas na técnica de espectrometria de massa para o diagnóstico/prognóstico da doença. (Unpublished doctoral dissertation).

7. Apêndice

Tabela 7.1 - Valores de concentração de proteína obtidos a partir das respetivas equações da reta e respetivos cálculos para a digestão aos aminoácidos. Os valores a laranja não se encontram aptos para a digestão. Três das amostras (LES105; AR108; AR109) foram repetidas as absorvâncias, mas continuava a existir o mesmo erro.

Amostras	*Média abs-valor do branco*	*Concentração (µg/µl)*	*Fator de diluição*	*Volume de proteína (µl)*	*Volume de tampão ABIC 50mM (µl)*
LES103	0,346	0,2317	2,3172	64,73	85,27
LES104	0,3735	0,2570	2,5695	58,38	91,62
LES105	0,1325	0,0358	0,3579	419,12	-269,12
LES106	0,221	0,1170	1,1700	128,20	21,80
LES107	0,2985	0,1881	1,8813	79,73	70,27
LES108	0,186	0,0849	0,8489	176,71	-26,71
LES109	0,312	0,2005	2,0051	74,81	75,19
LES110	0,374	0,2574	2,5741	58,27	91,73
LES111	0,3335	0,2202	2,2024	68,11	81,89
LES112	0,332	0,2189	2,1887	68,53	81,47
AR101	0,431	0,3097	3,0972	48,43	101,57
AR103	0,1895	0,0881	0,8810	170,27	-20,27
AR104	0,2895	0,1799	1,7987	83,40	66,60
AR105	0,339	0,2253	2,2529	66,58	83,42

AR106	0,223	0,1188	1,1884	126,22	23,78
AR107	0,2145	0,1110	1,1104	135,09	14,91
AR108	0,104	0,0096	0,0964	1556,71	-1406,71
AR109	0,0255	-0,0624	-0,6240	-240,38	390,38
AR110	0,3355	0,2221	2,2208	67,54	82,46
AR111	0,366	0,2501	2,5007	59,98	90,02
BS3	0,7395	0,5928	5,9282	25,30	124,70
BS5	0,2335	0,1285	1,2848	116,75	33,25
BS6	0,3495	0,2349	2,3493	63,85	86,15
BS9	1,2115	1,0260	10,2597	14,62	135,38
BS12	0,3115	0,2001	2,0006	74,98	75,02
BS13	0,4325	0,3111	3,1109	48,22	101,78
BS14	0,452	0,3290	3,2899	45,59	104,41
BS15	0,3925	0,2744	2,7439	54,67	95,33
BS16	0,203	0,1005	1,0049	149,27	0,73
BS17	0,1755	0,0753	0,7525	199,34	-49,34
1aEA	0,303	0,1923	1,9225	78,02	71,98
5aEA	0,266	0,1583	1,5830	94,76	55,24
6aEA	0,317	0,2051	2,0510	73,13	76,87
7aEA	0,2535	0,1468	1,4683	102,16	47,84

8aEA	0,4095	0,2900	2,8999	51,73	98,27
16aEA	0,214	0,1106	1,1058	135,65	14,35
17aEA	0,4275	0,3065	3,0651	48,94	101,06
18aEA	0,545	0,4143	4,1433	36,20	113,80
LES113	0,32	0,1775	1,7753	84,48	65,51
LES114	0,3793	0,2276	2,2760	65,903	84,096
LES115	0,2946	0,1561	1,5616	96,054	53,945
LES116	0,2186	0,0920	0,9203	162,98	-12,987
LES117	0,3493	0,2022	2,0228	74,151	75,8488
LES118	0,4906	0,3215	3,2154	46,649	103,35
LES119	0,76	0,5488	5,4881	27,3316	122,668
AR112	0,2746	0,1392	1,39285	107,692	42,30715
AR113	0,345	0,1986	1,986	75,5161	74,4838
AR114	0,914	0,6787	6,7876	22,0990	127,9009
AR115	0,911	0,67622	6,7622	22,1818	127,8182
AR120	0,4246	0,2658	2,6586	56,4213	93,57861
AR119	0,594	0,40874	4,0874	36,6979	113,302
BS19	0,5506	0,3721	3,7217	40,3034	109,696
BS18	0,3643	0,21494	2,1494	69,7847	80,2152
BS20	0,3466	0,20003	2,0003	74,98524	75,01476

BS21	0,3476	0,2008	2,008	74,67026	75,3297
BS22	0,871	0,6424	6,4247	23,34712	126,652
BS24	0,4186	0,2607	2,607	57,51672	92,4832
21aEA	0,226	0,0982	0,982	152,7191	-2,7190
22aEA	0,4416	0,2802	2,802	53,53293	96,467
23aEA	0,3396	0,1941	1,9413	77,26673	72,73327
24aEA	0,3393	0,1938	1,938	77,37885	72,62115
25EA	0,4243	0,2655	2,655	56,48115	93,51885
Les105	0,1093	-0,000225016	-0,00225	-66661,9	66811,88
BS25	0,5176	0,3443	3,4433	43,5627	106,4373
BS26	0,093	-0,014007	-0,14007	-1070,87	1220,873
BS27	0,628	0,4374	4,3743	34,29109	115,7089
BS28	0,151	0,0349	0,3493	429,3841	-279,384
BS29	0,4133	0,2562	2,5629	58,52667	91,47333
BS30	0,7243	0,5187	5,1871	28,91742	121,0826
BS31	0,9803	0,7347	7,3473	20,41555	129,5844
BS120	0,4783	0,3111	3,1114	48,20964	101,7904
BS210	0,2036	0,0793	0,7937	188,9777	-38,9777
BS230	0,1963	0,0731	0,7318	204,9558	-54,9558

BS240	0,7793	0,5651	5,6512	26,5426	123,4573
BS250	0,3773	0,2259	2,2591	66,3962	83,6037
26aEA	0,3213	0,1786	1,7866	83,9570	66,0429
27aEA	0,4323	0,2723	2,7232	55,0810	94,9189
28aEA	0,2713	0,1364	1,3647	109,9124	40,0875
29aEA	0,2643	0,1305	1,3056	114,8847	35,1152
30aEA	0,366	0,2163	2,1635	69,3311	80,6688
31aEA	0,2776	0,1418	1,4181	105,7705	44,2294
101EA	0,1666	0,0481	0,4815	311,5041	-161,504
102EA	0,1333	0,0200	0,2002	749,001	-599,01
AR108	0,0646	-0,0379	-0,3791	-395,619	545,619
AR109	-0,115	-0,1895	-1,8952	-79,147	229,147
AR116	0,0456	-0,0539	-0,5394	-278,047	428,047
AR117	0,5246	0,3502	3,5023	42,82806	107,171
AR118	0,2413	0,1111	1,1115	134,9431	15,056

Tabela 7.2 - Resumo dos adutos padrão encontrados nas amostras modificadas in vitro

Amostra	*Aduto*	*Fórmula Química*	*Rt (min)*	*Ião ± erro (ppm)*	*MS/MS fragmentos ± erro (ppm)*
HSA1	16-OHE1-Lis Heyns	$C_{24}H_{34}N_2O_4$	5,5 min	415,2592 ± 0,2 ppm	352,2275 ± 1,14 ppm 286,1798 ± 1,05 ppm
Hb2	16-OHE1-Lis red	$C_{24}H_{36}N_2O_4$	5,5 min	417,2748 ± 0,2 ppm	399,2643 ± 1,25 ppm 354,2428 ± 1,41 ppm
Hb3	QM-E1-Lis	$C_{24}H_{32}N_2O_5$	6,6 min	429,2360 ± 2,9 ppm	383,2312 ± 5,74 ppm 366,2048 ± 5,73 ppm 302,1724 ± 10,6 ppm
Hb4	diQM-E1-Hist	$C_{24}H_{25}N_3O_5$	5,6 min	436,1875 ± 1,83 ppm	390,1814 ± 0,51 ppm
Hb5	diQM-E2-Hist	$C_{24}H_{28}N_3O_5$	5,3 min	438,2017 ± 3,98 ppm	392,1970 ± 1,02 ppm
Hb6	QM-E2-Lis	$C_{24}H_{34}N_2O_5$	6,4 min	431,2534 ± 139	368,2226 ± 0,27 ppm 304,1905 ± 2,30 ppm