

## Desenvolvimento de método para análise do perfil esteroidal endógeno em plasma de pacientes com doença de Parkinson por GC-MS/MS

Jéssica G. B. Fontes<sup>1,2</sup> (PG), Andressa C. S. Marques<sup>1</sup> (PG), Bruna Brito<sup>1</sup> (IC), Bruna L. Fadel<sup>2</sup> (PG), Gabriela Poralla<sup>2</sup> (PG), Ana L. Z. Rosso<sup>3</sup> (PQ), Luciana Pizzatti<sup>2</sup> (PQ), Monica C. Padilha<sup>1</sup> (PQ)\*

\*e-mail: monicapadilha@iq.ufrj.br

<sup>1</sup>Universidade Federal do Rio de Janeiro, LAPAA/LADETEC/Instituto de Química, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

<sup>2</sup>Universidade Federal do Rio de Janeiro, LABMOPS/LADETEC/Instituto de Química, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

<sup>3</sup>Universidade Federal do Rio de Janeiro, HUCFF/Departamento de Neurologia, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

Palavras Chave: Esteroides endógenos, Cromatografia gasosa, Espectrometria de massas, Doença de Parkinson

### Introdução

A doença de Parkinson (DP) é uma desordem neurodegenerativa, caracterizada pela perda progressiva dos neurônios dopaminérgicos da *substantia nigra*.<sup>1</sup> Atualmente, é conhecida a existência de diferenças sexuais no desenvolvimento da DP, onde a incidência e prevalência da doença nos homens são maiores. Evidências mostram que estrogênios são neuroprotetores para o sistema dopaminérgico, o que sugere uma possível proteção para as mulheres.<sup>2</sup> Alguns andrógenos também parecem ter efeito neuroprotetor, por isso a terapia androgênica tem sido estudada para o tratamento da DP.<sup>3</sup> Além disso, embora ainda controversos, os níveis de colesterol, molécula precursora dos hormônios esteroidais, tendem a ser reduzidos em pacientes com DP.<sup>4</sup> Dessa forma, o estudo do perfil esteroidal de pacientes com DP é relevante para a compreensão dos mecanismos da doença que levam a novas estratégias de tratamento. Este projeto tem, então, como objetivo, desenvolver e validar um método para quantificar a fração total de 11 esteroides endógenos no plasma de pacientes com DP e controles saudáveis e correlacionar os dados obtidos com as características clínicas desses pacientes.

### Resultados e Discussão

Foram testadas diferentes formas de extração e solventes, e ainda a necessidade de desproteinização do plasma. Utilizou-se planejamento fatorial a três níveis variando-se tempo e volume de enzima para otimizar o processo de hidrólise. Diferentes colunas cromatográficas, modos de injeção, e rampas de temperatura foram testados em um sistema TSQ 8000 Evo Triplo Quadrupolo GC-MS/MS operando no modo de monitoramento de reações múltiplas (MRM). Como resultado, o método desenvolvido consiste na hidrólise de 500 µL de amostras de plasma a 50°C por 1h utilizando 100µL de enzima seguida de uma extração líquido-líquido em pH básico utilizando TBME e, finalmente, derivatização. No modo *splitless*, 2 µL são injetados no sistema mencionado anteriormente. Os melhores resultados em relação à

intensidade de sinal e resolução de pico foram observados utilizando a coluna DB-5HT contendo 5%-fenil-metilpolissiloxano (30 m x 0,25 mm x 0,10 µm). A construção da curva analítica foi feita em SBF (*simulated body fluid*) com 7% de albumina bovina, após outras matrizes sintéticas terem sido testadas. A validação do método foi feita de acordo com a RDC 166/17 da Anvisa. Os LD e LQ obtidos foram inferiores a 0,3 e 0,5 ng/mL, respectivamente, na maioria dos analitos. Seletividade, linearidade, precisão, exatidão e robustez satisfatórias foram alcançadas, e nenhum efeito de matriz foi observado na maior parte dos casos. O método foi então aplicado à 133 amostras de pacientes com DP e 39 controles saudáveis que foram classificadas por sexo e de acordo com o fenótipo da doença, grau de severidade e idade de início. Em relação à coorte masculina, todos os analitos puderam ser detectados em quase 100% das amostras. Esse resultado foi obtido para mais da metade dos analitos considerando a coorte feminina. Diferenças estatisticamente significativas foram observadas em alguns casos, como entre grupos de pacientes com diferentes idades de início da doença, nos níveis de androstenediona e DHEA e entre pacientes e controles saudáveis, nos níveis de androsterona. Além disso, níveis de estrogênios se mostraram mais altos na coorte masculina.

### Conclusões

Em conclusão, o método mostrou-se capaz de quantificar os analitos propostos em amostras de plasma seguindo os critérios pré-estabelecidos. As diferenças observadas nos níveis de alguns esteróides estão sendo mais amplamente investigadas, mas indicam possíveis alterações em vias metabólicas.

### Agradecimentos

Ao LBCD, Laboratório Brasileiro de Controle de Dopagem, por todo o apoio em infraestrutura fornecido.

<sup>1</sup> Emamzadeh, F. N.; Surguchov, A., *Frontiers in Neuroscience*. **2018**, 12, 1.

<sup>2</sup> Smith, K. M.; Dahodwala, N. *Experimental Neurology*, **2014**, 259, 44.

<sup>3</sup> Bianchi, V. E, et al. *Journal of the Endocrine Society*, **2020**, 4, 1.

<sup>4</sup> Paul, R.; Choudhury, A; Borah, A. *Neurochemistry International*, **2015**, 90, 125.