

UNIVERSIDADE SANTO AMARO

Programa de Mestrado em Ciências da Saúde

Kevin Cezar Nascimento Silva

**PERFIL DE EXPRESSÃO DOS RETROVÍRUS
ENDÓGENOS HUMANOS K E W EM PACIENTES COM
DOENÇA VENOSA CRÔNICA**

São Paulo

2023

Kevin Cezar Nascimento Silva

**PERFIL DE EXPRESSÃO DOS RETROVÍRUS
ENDÓGENOS HUMANOS K E W EM PACIENTES COM
DOENÇA VENOSA CRÔNICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* da Universidade Santo Amaro – UNISA, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Henrique da Silva Nali

Coorientadora: Profa. Dra. Carolina Nunes França

São Paulo

2023

S58p Silva, Kevin Cezar Nascimento.

Perfil de expressão dos retrovírus endógenos humanos K e W em pacientes com doença venosa crônica. — São Paulo, 2023.

68 p.: il., color.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) — Universidade Santo Amaro, 2023.

Orientador: Prof. Me. Dr. Luiz Henrique da Silva Nali.
Coorientadora: Prof.^a Me. Dr.^a Carolina Nunes França.

1. Doença. 2. ERV. 3. Perfil da expressão gênica. I. Nali, Luiz Henrique da Silva, orient. II. França, Carolina Nunes, coorient. III. Universidade Santo Amaro. IV. Título.

Fernando Carvalho — CRB8/10122

Sumário

1	Introdução	14
1.1	Aspectos gerais da doença venosa crônica	14
1.2	Classificação	15
1.3	Fisiopatologia	16
1.4	Etiologia	17
2	Os retrovírus endógenos humanos (HERVs).....	18
2.1	Classificação dos HERVs	20
2.1.2	<i>Classificação (Famílias de HERVs)</i>	20
2.2	Genoma dos HERVs.....	21
2.3	Papel dos HERVs na fisiologia humana	22
2.4	Papel dos HERVs nas doenças.....	23
2.4.1	<i>Doenças autoimunes</i>	23
2.4.2	<i>Artrite reumatoide</i>	23
2.4.3	<i>Câncer</i>	24
2.4.4	<i>Vírus da imunodeficiência humana (HIV)</i>	24
2.5	<i>Papel dos HERVs na doença venosa crônica</i>	24
3	Justificativa.....	26
4	Objetivos	27
4.1	Objetivo geral	27
4.2	Objetivos específicos	27
5	Métodos	28
5.1	Critérios de Exclusão	28
5.2	Coleta e processamento das amostras	28
5.3	Aspectos éticos	29
5.4	Logística laboratorial	29
5.5	Obtenção e purificação do RNA	29
5.6	Detecção e nível de expressão diferencial dos HERVs	30
5.7	Análise de níveis de citocinas pró e anti-inflamatórias.....	31
5.8	ELISA indireto para a detecção de anticorpos anti-hervs	32
5.9	Análise estatística	32
6	Resultados	34
6.1	Dados demográficos dos participantes.....	34
6.1.2	<i>Grupo doença venosa crônica</i>	35
6.1.3	<i>Grupo Controle</i>	36
6.2	Expressão de HERVs W e K.....	37

6.2.2	HERV-W	37
6.2.3	HERV-K	39
6.3	Análises de citocinas pró e anti-inflamatórias	40
6.4	Peptídeos	42
7	Discussão	43
8	Conclusão	47

Agradecimentos

Um agradecimento especial ao meu orientador, Dr. Luiz Henrique da Silva Nali, por toda sua ajuda e comprometimento em me auxiliar nessa jornada do mestrado, você é meu exemplo de profissional e sempre serei muito grato, obrigado por tudo.

A minha co-orientadora Dra. Carolina Nunes França por toda sua ajuda no mestrado.

A Dra. Marina Tiemi Shio, por todo suporte no laboratório e ajuda nas coletas.

A Ma. Ana Paula Augusto da Cruz Ballerini, por disponibilizar sua clínica, classificação dos pacientes e por toda a ajuda e suporte necessário para o realizar da pesquisa.

Aos voluntários que aceitaram a participar do estudo.

Ao Dr. Jônatas Bussador do Amaral e ao Dr. André Luis Lacerda Bachi pela ajuda com as análises das citocinas.

Para todos os professores do programa de mestrado em ciências da saúde, pelos ensinamentos passados.

Aos meus queridos amigos, Bruna, Elaine, Estella, Gabriela, Graciela, Hannar, Lucas, Michelly, Samuel, Sara, Giovanna e Fernando, vocês foram essenciais para essa realização do mestrado.

A minha namorada Millena, por todo seu apoio e prestatividade, e sempre estar ao meu lado, muito obrigado.

Aos meus familiares Alain, Patrícia, Barbara, Sophia, Maria, Nathan, Guilherme e Vitor, sem o apoio de vocês isso provavelmente não seria possível.

E a CAPES pelo auxílio da bolsa concedida.

Lista de abreviações

Ad-veias profundas

Ap-veias perfurantes

AR-Artrite reumatoide

As-Veias superficiais

cDNA-Ácido Desoxirribonucleico complementar

CEAP-Classificação clínica, etiológica, anatômica e fisiopatológica

CEP-Comitê de ética em pesquisa

DNA-Ácido Desoxirribonucleico

DVC-Doença venosa crônica

EDTA-Ácido atilenodiamino tetra-acético

Ec-Congênito

Em-Nenhuma causa venosa identificada

EM-Esclerose múltipla

Ep-Primário

Es-Secundário

GAPDH-Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

HERVs-Retrovírus endógenos humanos

IVC-Insuficiência venosa crônica

In-Integrase

IL-6-Interleucina 6

IL-10-Interleucina 10

LTRs-Repetições terminais longas

Na-nenhuma localização localizada

ORFs-Quadros de leituras abertas

PBMC-Célula mononuclear de sangue periférico

PBS-Sítio de ligação de Primer

Pn-Nenhuma fisiopatologia identificada

PR-Enzima de protease

Po-Obstrução

Pr-Refluxo

Pr,o-Refluxo e obstrução

q-PCR-Reação de cadeia em polimerase em tempo real

RNA-Ácido ribonucleico

RNASEh-Ribonuclase H

RPMs-Rotação por minutos

RT-Transcriptase reversa

SFB-Soro Fetal Bovino

TCLE-Termo de consentimento livre e esclarecido

TEs-Elementos transponíveis

TM-Transmembrana

TNF- α -Fator de necrose tumoral-alfa

tRNA-Ácido ribonucleico transportador

UNISA-Universidade Santo Amaro

Lista de Tabelas

Tabela 1-Classificação das doenças venosas (CEAP).

Tabela 2-Classificação dos retrovírus endógenos (HERVs). Adaptador por Nelson, Balada, Tugnet

Tabela 3-Primers que foram utilizados em ensaios de PCR em tempo real

Tabela 4-Volume e concentração dos reagentes utilizados para amplificação e quantificação dos HERVs.

Tabela 5-Dados demográficos dos participantes

Tabela 6-Dados das expressões dos participantes do estudo.

Lista de figuras

Figura 1 -Curva de Melting para GAPDH.

Figura 2 –Curva de Melting para HERV-W.

Figura 3-PCR em tempo real para GAPDH. Curva de amplificação com os gráficos de fluorescências no decorrer dos ciclos.

Figura 1- Níveis das citocinas TNF- α , IL-6 e IL-10 entre o grupo controle e o grupo com doença venosa crônica. O grupo com DVC apresenta uma maior quantificação de citocinas pro-inflamatórias TNF- α e IL-6 em comparação ao grupo controle, em contrapartida a citocina anti-inflamatória IL-10 não houve diferença significativa.

Figura 2- Razão entre as citocinas IL-6/IL-10 e razão entre as citocinas TNF- α e IL-10 em comparação ao grupo controle e grupo doença venosa crônica. Não houve diferença significativa entre os grupos.

Figura 6-Resposta do ELISA anti-HERV-W.

Anexos

Anexo 1-Aprovação do comitê de ética da Universidade Santo Amaro–UNISA.

Anexo 2-Termo de consentimento livre e esclarecido fornecido aos participantes da pesquisa.

Resumo

Introdução: A doença venosa crônica (DVC), é uma doença de caráter inflamatório, na qual o sistema circulatório dos membros inferiores é afetado devido a uma hipertensão venosa, ocasionando um refluxo venosa, baixa oxigenação e inflamação do tecido. A etiologia para DVC ainda é pouco conhecida, mas sabendo que devido à inflamação crônica, ocorre acúmulos de leucócitos na parede do vaso ocasionam uma cascata inflamatória. Acredita-se que os retrovírus endógenos humanos (HERVs), estão envolvidos em alguns processos inflamatórios, em que a sua expressão pode ser facilitada por um processo inflamatório prévio, ou ainda, as presenças de suas proteínas virais podem ter um papel fundamental no estímulo da inflamação em determinadas doenças inflamatórias. Não há dados na literatura que mostrem se pacientes com DVC expressam HERVs. No entanto, pelo fato de pacientes com DVC apresentarem eventos inflamatórios consideráveis, a associação deste com a expressão dos HERVs pode estar presente na DVC. **Objetivos:** Avaliar o perfil de expressão de Retrovírus endógenos humanos W e K, avaliar a expressão de citocinas pró e anti-inflamatórias, e a resposta humoral anti-HERV-W em pacientes com DVC e controle. **Materiais e métodos:** célula mononuclear do sangue periférico (PBMC) e soro de pacientes com DVC e indivíduos saudáveis foram coletados. A análise da expressão de HERV-W e HERV-K foram analisadas a partir de PCR em tempo real, e as citocinas TNF- α , IL-6 e IL-10 foram analisadas utilizando ELISA. **Resultados:** Foram analisadas amostras de 39 pacientes do grupo DVC e 46 indivíduos do grupo controle. Os pacientes com DVC expressaram seis vezes mais HERV-W em relação ao grupo saudável, e o grupo DVC não teve expressão do HERV-K, em contrapartida 13 pacientes do grupo controle expressaram o HERV-K. A análise dos níveis de citocinas dos participantes, mostrou que o grupo DVC possui mais citocinas pro-inflamatórias TNF- α e IL-6 em comparação com o grupo saudável. **Conclusão:** O nível de expressão do HERV-W é maior nos pacientes com DVC em comparação a indivíduos saudáveis. O HERV-K não foi expresso em nenhum paciente com DVC, já, em contrapartida, alguns pacientes saudáveis expressaram o HERV-K. As citocinas IL- e TNF- α estão mais expressas em pacientes com DVC em relação ao grupo controle, e a IL-10 não houve diferença significativa entre os grupos. Os pacientes com DVC apresentaram uma resposta humoral contra o peptídeo de HERV-W env.

Palavras-chave: Doença venosa crônica, Retrovírus Endógenos Humano, Perfil de expressão.

Abstract

Introduction: Chronic venous disease (CVD), is an inflammatory disease which affects the circulatory system of the lower limbs due to venous hypertension, venous reflux, low oxygenation and inflammation of the tissue. The etiology for CVD is still poorly investigated, but it is documented that chronic inflammation can lead to an accumulation of leukocytes in the vessel wall which causes an inflammatory cascade. It has been reported that human endogenous retroviruses (HERVs) are involved in some inflammatory processes, where their expression can be facilitated by a previous inflammatory process, or the presence of its protein plays a key role in stimulating inflammation in certain inflammatory diseases. There are no data reporting the possibility of patients who are present with CVD may come to express HERVs. However, patients with CVD present with considerable inflammatory events that may be associated with expression of HERVs, such as diabetes. **Objectives:** To evaluate the expression profile of human endogenous retroviruses W and K, to evaluate the expression of pro- and anti-inflammatory cytokines, and the humoral anti-HERV-W response in patients with CVD and control. **Materials and methods:** PBMC and serum of patients with CVD and healthy individuals were collected. The expression analysis of HERV-W and HERV-K were assessed using real-time PCR, and the cytokines TNF- α , IL-6 and IL-10 were measured by indirect ELISA. **Results:** Sample from 39 patients from the CVD group and 46 healthy individuals were analyzed. Patients with CVD expressed six-fold more HERV-W than the healthy group, on the other hand, the CVD group did not express HERV-K. Analysis of participants' cytokine levels showed that the CVD group expressed more pro-inflammatory cytokines TNF- α and IL-6 compared to the healthy group. **Conclusion:** HERV-W expression level is higher in patients with CVD compared to healthy subjects. HERV-K was not expressed in any patient with CVD, on the other hand, some healthy patients expressed HERV-K. Cytokines IL- and TNF- α are more expressed in patients with CVD compared to the control group, and IL-10 was not significantly different between groups. CVD patients showed a humoral response against the peptide of HERV-W env.

Keywords: Chronic venous disease, Human Endogenous Retroviruses, Expression profile.

1 Introdução

1.1 Aspectos gerais da doença venosa crônica

A doença venosa crônica (DVC) é uma enfermidade que afeta o sistema circulatório, principalmente dos membros inferiores, decorrente de uma hipertensão venosa crônica e dilatação dos vasos. Essa hipertensão está relacionada a um refluxo venoso em função de uma incompetência das válvulas venosas, comprometendo o retorno venoso, seguido de um acúmulo de sangue, ocasionando uma baixa oxigenação nos vasos, desenvolvendo uma inflamação do tecido ¹. A hipertensão venosa crônica e a dilatação dos vasos sanguíneos, conduzem a uma abundância de mudanças fisiopatológicas no tecido sanguíneo, essas alterações levam a uma ocorrência de eventos inflamatórios e ativação das células endoteliais, além disso, devido à hemodinâmica anormal, eventos como hipóxia, apoptose desregulada e alterações da matriz extracelular são observadas, ocasionando o aparecimento de veias varicosas ².

Dentre os principais fatores de riscos para DVC, podemos destacar: sexo feminino, fatores genéticos, hábitos de vida, sedentarismo ³, idade, etnia, índice de massa corporal elevado, número de gestações, tempo prolongado em pé ou sentado e tabagismo⁴.

Cerca de metade dos indivíduos adultos apresentam alguma forma da DVC ⁵, podendo se manifestar desde a forma simples da doença, sendo assintomático, ou de forma mais grave com as úlceras abertas ⁶. Sendo que, no Brasil, uma das principais causas de afastamento no trabalho são em decorrência das varizes ⁵. Sendo responsável por um impacto sócio econômico considerável ^{7,8}.

A prevalência de DVC na população mundial varia de 83,6% a 63,9% nos enfermos com a classificação C1 a C6, e quanto a indivíduos com a classificação C0, essa prevalência foi de 19,7% ⁹.

1.2 Classificação

Em 1994, foi criada a classificação clínica, etiológica, anatômica e fisiopatológica CEAP para doenças venosas, permitindo uma avaliação mais precisa sobre as doenças venosas. Essa classificação passou por alterações em 2004, seguindo os critérios descritos a seguir: ¹⁰⁻¹²

Os acontecimentos patológicos relacionados a classe clínica (C) da classificação CEAP, se apresentam da seguinte maneira: quando as veias não são visíveis ou palpáveis, sendo geralmente casos assintomáticos, porém, um refluxo venoso já é observado, são classificados como quadro clínico C0. Pequenos vasos ou veias reticulares, são classificados como quadro C1. Quando as veias são varicosas, sendo a exposição mais comum nos enfermos, se enquadra como classificação C2. No momento em que as veias varicosas sofrem uma ação devido ao edema, esse quadro é classificado como C3. Alterações na pele e no tecido subcutâneo se enquadram na classificação C4. Pigmentação e eczema são alterações da pele colocadas no quadro C4a. A presença de atrofia branca são classificadas como C4b. Nos casos mais graves da doença, porém, como uma quantidade menor de pacientes, uma úlcera venosa se desenvolve, quando essa úlcera é cicatrizada ela é classificada como C5, e quando ela ainda está presente é classificada como C6 ¹³. Uma descrição de cada uma das classificações encontra-se na **tabela 1**.

Tabela 1 - Classificação das doenças venosas (CEAP). A tabela a seguir resume a classificação de distúrbios venosos crônicos, descrevendo os aspectos do CEAP. Definições das siglas: Ec: congênito, Ep: primário, Es: secundário, Em: nenhuma causa venosa identificada, As: veias superficiais, Ad: veias profundas, Ap: veias perforantes, Na: nenhuma localização localizada, Pr: refluxo, Po: obstrução, Pr,o: refluxo e obstrução e Pn: nenhuma fisiopatologia identificada.

Classificação clínica (C)	Etiológica (E)	Anatômica (A)	Fisiopatológica (F)
C0: Sem sinais visíveis ou palpáveis da doença;	Ec: Congênito;	As: Veias superficiais;	Pr: Refluxo;

C1: Telangiectasias ou veias reticulares;	Ep: Primário;	Ad: Veias profundas;	Po: Obstrução;
C2: Veias varicosas, distinguindo das veias reticulares por um diâmetro de 3mm ou mais;	Es: Secundário (pós-trombolítico)	Ap: Veias perfurantes;	Pr,o : Refluxo e obstrução;
C3: Edema;	Em: Nenhuma causa venosa identificada;	Na: Nenhuma localização venosa localizada;	Pn: Nenhuma fisiopatologia venosa identificada;
C4: Alteração na pele e no tecido subcutâneo e secundário a DCV;			
C4a: Pigmentação e eczema;			
C4b: Atrofia branca;			
C5: Úlcera venosa cicatrizada;			
C6: Úlcera venosa ativa;			

Fonte: Revision of the CEAP classification for chronic venous disorders ¹²

1.3 Fisiopatologia

O surgimento para a DVC inclui os diversos fatores de risco mencionados no tópico anterior, esses que geralmente ocasionam mudanças no endotélio venoso, parede dos vasos, e diversas biomoléculas inflamatórias. O conjunto de um refluxo venoso e uma obstrução, fazem com que ocorra uma falha na bomba

dos condutos musculares dos membros inferiores, deixando o fluxo venoso anormal, atrapalhando o fluxo venoso em direção ao coração ^{1,2,14}.

Sendo que, o sistema venoso dos membros inferiores é constituído por veias superficiais, onde se encontram as veias safenas maiores e menores. Elas são responsáveis por drenar o sangue que está em volta da área entre a pele e a fáscia muscular e, conduzir o sangue para o sistema venoso profundo. As veias do sistema venoso profundo estão situadas próximo das artérias, e sendo denominadas veias poplítea e femoral. E por fim, as veias perforantes que tem como função, juntar o sistema venoso superficial e o profundo ¹⁵.

O sangue toma direção da perna para o coração com o feito da bomba dos músculos da panturrilha, em conjunto das válvulas venosas, ao qual, vão efetuar o fluxo sanguíneo para o coração pela contração muscular. Às válvulas das veias profunda, superficial e perforante, em conjunto, se ativam em uma única direção, evitando a obstrução do fluxo sanguíneo ¹⁵.

Em pessoas que se encontram com doença venosa crônica, no decorrer da passagem do fluxo sanguíneo, ocorre uma baixa na pressão no sistema venoso profundo, levando a uma pressão no local que, aumenta a pressão no sistema venoso dos membros inferiores. Posto isso, a hipertensão venosa é resultante de uma insuficiência venosa, tornando-se como uma provável causa, uma perturbação valvar do sistema venoso dos membros inferiores. ¹⁶.

1.4 Etiologia

Apesar da DVC se manifestar em uma grande parcela da população, com uma prevalência alta em adultos, a etiologia para essa doença ainda é pouco conhecida ^{17,18}.

Sabemos que, nesta enfermidade ocorre uma elevada pressão venosa ^{19,20}, fazendo com que ocorra um defeito na aproximação na válvula sanguínea, levando a um relaxamento da parede venosa, sendo este, um marcador ao ponto inicial da doença ²⁰, essa válvula sanguínea consegue tolerar grandes pressões por um determinado tempo, caso ocorra uma exposição maior, a incidência de

acontecimentos inflamatórios são observados ²¹, enzimas proteolíticas, e a adesão de leucócitos no tecido valvar e na parede venosa, sendo direcionados a uma cascata inflamatória ²², porém, efeitos anteriores a essa causa, ainda continuam como uma indagação plausível.

O sistema venoso é composto por células endoteliais, as responsáveis pela homeostase vascular. Elas podem identificar e agregar estímulos hemodinâmicos e hormonais e secretar proteínas e moléculas mediadoras. Essas células realizaram ações biológicas da parede dos vasos sanguíneos, como adesão de leucócitos, normatização de lipoproteínas, condições protrombóticas e antitrombóticas, aspectos de crescimento e elementos vasoativos. Estes processos estão relacionados à doença inflamatória aterosclerose ¹⁴.

Acredita-se que os retrovírus endógenos humanos (HERVs) estão envolvidos em alguns processos inflamatórios, onde, os pacientes que se encontram com esse perfil inflamatório, expressam níveis elevados de HERVs ²³. Como descrito acima, a DVC, pode ser uma possível doença inflamatória, com tais informações, pacientes que se encontram com DVC, podem apresentar expressão dos HERVs no curso da doença.

2 Os retrovírus endógenos humanos (HERVs).

A descrição do primeiro retrovírus endógeno humano (HERV), ocorreu em 1981 ²⁴. Logo após, diversos grupos de HERVs foram descritos no genoma humano ²⁵.

O nosso genoma é composto por 3,2 bilhões de pares de bases, nos quais, os HERVs correspondem aproximadamente 8% do nosso material genético ^{26,27}. Os HERVs contêm um seguimento de ácido desoxirribonucleico (DNA) de origem retroviral que foram a ser adquiridos no decorrer dos últimos 100 milhões de anos, de inúmeras interatividades por retrovírus exógenos agora extintos, com células germinativas de nossos ancestrais. Surpreendentemente, os retrovírus que conhecemos tem as células somáticas como seu alvo principal, as contaminações no passado afligiram a linha germinativa dos primatas,

ocasionando a transmissão vertical de HERVs ao longo da sua descendência. Até o momento, não se sabe ao certo, se essas infecções a células germinativas no passado foram por uma estratégia de célula alvo, ou simplesmente pelo acaso²⁸.

Os retrovírus endógenos (ERVs) estão presentes em toda a linhagem dos vertebrados, compreendendo os humanos. Supõem-se que seu aparecimento ocorreu ao longo de inúmeras infecções por retrovírus exógenos do passado, em células germinativas, ocasionado sua integração no genoma. Sendo assim, os ERVs se fixaram no genoma dos vertebrados sendo transmitidas verticalmente entre as gerações de maneira mendeliana²⁹.

A maioria dos HERVs deixaram suas atividades de replicações e expressão, particularmente em razão de recombinação, ou devido a um excesso de mutações que impediram que as proteínas virais fossem expressas por completo que foram sendo acumuladas durante a evolução dos vertebrados. Em contrapartida, alguns HERVs permaneceram com sua estrutura viral antiga, sendo elas, os principais genes flanqueados por duas repetições terminais longas (LTRs), que possuem uma capacidade para realizar atividades transcricionais³⁰.

Os retrovírus em sua particularidade são retrógrados, e não seguem com via tradicional da biossíntese molecular, sendo ela, DNA-RNA-Proteína, a um todo, os retrovírus necessitam da modificação do RNA viral em um mediador de ácido desoxirribonucleico complementar (cDNA), canalizado pela enzima transcriptase reversa³¹.

Acreditasse que determinadas famílias de HERVs possam ser responsáveis por algumas doenças autoimunes e alguns tipos de câncer. Todavia, os HERVs fazem parte do nosso genoma e nem sempre são prejudiciais, são também benéficos para o organismo humano³¹.

2.1 Classificação dos HERVs

Os HERVs são classificados em três classes principais, classe I (*gammaretrovirus* e semelhante a *Epsilonretrovirus*), classe II (semelhantes a *betaretrovirus*) e classe III (*spumaretrovirus*)^{32,33}, com fundamentos no ácido ribonucleico transportador (tRNA) humano aparentemente reconhecidos pelo sítio de ligação do *primer* (PBS do inglês *Primer Binding Site*), ou conforme como o nome de um gene aproximado, ou até então, por algum aminoácido específico³³.

2.1.2 Classificação (Famílias de HERVs)

Os Hervis são classificados em três classes, com base na semelhança genética na região *pol*. Sendo a classe I, referente a *gammaretrovirus* e semelhante a *epsilonretrovirus*, classe II equivalente a *betaretrovirus* e classe III próximo a *spumaretrovirus*³⁴ representados na **tabela 2**.

Tabela 2. Classificação dos retrovírus endógenos humanos (HERVs).

Classe I	Classe II	Classe III
Grupo 1: HERV-HF HERV-H (RTL-H, RGH) HERV-F	Grupo 1: HML-1 HERV-K (HML-1.1)	HERV-L
GRUPO 2: HERV-RW HERV-W, HERV-R (ERV9) HERV-P (HuERS-P)	GRUPO 2: HML-2 HERV-K10 HERVK-18 HERV-K-HTDV HERV-K103 HERV-K111, K105	HERV-S
Grupo 3: HERV-ER1 HERV-E (4-1, ERVA, NP-2) 51-1 HERC-R (ERV3) RRHERV1	Grupo 3: HML-3 HERV-K (HML3.1)	HERV-U
Grupo 4: HERV-T HERV-T (S71, CRTK1, CRTK6)	Grupo 4: HML-4 HERV-K-T47D	HERV-U3
Grupo 5: HERV-IP (HERV-I RTVL-I) (HERV-IP-T47D 9ERV-FTD)	Grupo 5: HML-5 HERV-KNMWV2	
Grupo 6: HERV-FRD VER-FRD	GRUPO 6: HML-6 HERV-K (HML-6p)	

OUTROS: HRES-1	GRUPO 7: HML-7 HERV-K-NMWW3
	Grupo 8: HML-8 HERV-K-NMWW3
	Grupo 9: HML-9 HERV-K-NMWW9
	Grupo 10: HML-10 HERV-KC4

Fonte: Adaptador por Nelson ³¹, Balada ³⁵, Tugnet ³⁴

2.2 Genoma dos HERVs

Ao longo dos últimos anos, inúmeras pesquisas foram realizadas para disponibilizar a sequência completa do genoma humano, mostrando ser uma formação extraordinária e altamente repetitiva ³³. Isso mostrou que o genoma humano possui mais de 50% do nosso material genético de elementos transponíveis (TEs), similarmente denominado como “genes saltadores”, que são pequenos fragmentos de DNA que podem se locomover de um local para outro no genoma ³⁶. Sendo que, apenas 2% dele codificam proteínas. Os TEs são classificados em duas classes gerais, com ênfase da ocorrência de DNA ou RNA ajustar-se como mediador no processo de transposição. Os HERVs pertencem aos TEs de classe I, e se dão também o nome de retrotransposons, ele é caracterizado com um intermediário de RNA no qual é transcrito reversamente em um DNA de fita dupla (dsDNA) ³³.

Os HERVs encontram-se inseridos no genoma humano na forma de um provírus (genoma de vírus integrado no DNA) sendo herdados por transferência vertical de genes ³⁷.

HERVs essencialmente completo, manifestam sua ancestralidade retroviral endógena, com quatro quadros de leitura aberta (ORFs) sendo eles, *gag*, *pro*, *pol* e *env* ³². Contendo um sentido positivo 5' LTR–*gag-pro-pol-env*–3' LTR, nos quais, os quatro genes codificam proteínas estruturais e funcionais com finalidade de replicação, onde as LTRs abrangem sequências de regulação da transcrição ³⁸. O gene *gag* codifica a essencial poliproteína estrutural *gag*, além

de, elementos estruturais da matriz, capsídeo e nucleocapsídeo, ao qual, vão auxiliar na preparação de partículas virais não contagiosa e imatura. O gene *pro* codifica as enzimas de protease (PR) encarregadas de proporcionar a maturação dos elementos virais. O gene *pol* será o responsável de codificar enzimas envolvidas na replicação do genoma viral, tais como transcriptase reversa (RT), integrase (IN) e ribonuclease H (RNase H). O gene *env* codifica as glicoproteínas de superfície e subunidades de transmembrana (TM). São encontradas duas repetições terminais longas (LTRs), que cercam o seguimento interno proviral ^{38,39}.

Contudo, no decorrer de milhões de anos, os seguimentos do genoma dos HERVs acumularam inúmeras mutações em seus ORFs, ocasionando falhas de replicação, impedidos de se movimentarem no genoma ³².

2.3 Papel dos HERVs na fisiologia humana

Alguns dos processos fisiológicos e doenças em humano, são de certa forma motivados por determinados HERVs, realizados por transcrições virais de RNA ou alterações realizadas por retrotransposição ⁴⁰.

Não existem HERVs com potencial para replicação classificados. Porém, um pequeno número de HERV-K da espécie humana, apresentam um potencial de codificação de proteínas. Em alguns casos, podem produzir proteínas similares a vírus ²⁷.

Apesar disso, a permanência do HERV no DNA humano ao decorrer do tempo, pode ser considerada uma estabilidade de resultados “benéficos e prejudiciais” no organismo humano ²⁷.

Um grande exemplo benéfico, é o HERV-W, para a produção da proteína Sincitina 1, a responsável por realizar a agregação das células trofoblásticas durante a gestação ⁴¹. Durante o processo de gravidez, a placenta é o órgão fundamental para o desenvolvimento do embrião, responsável pela nutrição e oxigenação. A agregação das células trofoblásticas para a formação do sinciotrofoblasto é essencial para a formação do embrião, sendo ele,

imprescindível para a não interação do sangue materno, sendo também responsável por troca trófica, segregação de hormônios de crescimento e para o fator homeostático, pelo qual, o HERV-W está intimamente ligado a formação do sinciciotrofoblasto ⁴².

Outro HERV de importância na fisiologia humana é o HERV-E, o responsável pela expressão dos genes de amilase em glândulas salivares. Evidenciando que, os HERVs, apresentam um papel de grande significância da fisiologia humana ⁴³.

2.4 Papel dos HERVs nas doenças

2.4.1 Doenças autoimunes.

A maior quantidade de evidências encontradas com HERVs foram associações com doenças autoimunes em virtude da capacidade dos HERVs, de alguma maneira, estimular a resposta imune contra antígenos próprios. Um dos principais mecanismos de resposta proposta para ação imunopatogênica dos HERVs seria através do mimetismo molecular, no qual, ocorrem respostas cruzadas comuns através de epítomos invasores e antígenos existentes no corpo, fazendo com que o agente etiológico possa desencadear uma resposta autoimune nociva, no caso dos HERVs, uma proteína expressa pode desencadear uma resposta imune ^{38,44}. Menciona-se que os HERVs possam ser um potencial prejudicial em doenças reumáticas e cânceres, devido à elevação da expressão de HERVs ⁴⁵. Porém, mesmo com algumas evidências dessa elevada expressão o papel dos retrovírus em determinadas doenças permanece complexa ³⁴.

2.4.2 Artrite reumatoide

A artrite reumatoide (AR) é uma enfermidade autoimune que desencadeia uma inflação crônica da membrana sinovial, onde ocorre a perda da cartilagem e dos ossos nas articulações acometidas. A etiologia dessa doença ainda se encontra desconhecida, e as principais razões parecem ser predisposições

genéticas e fatores ambientais como vírus e bactérias. Estudos sugerem que os HERVs possam estar envolvidos na etiologia da AR, com a intensificação de anticorpos para proteínas de HERVs e atividades transcricionais. E o mecanismo de resposta imune é devido ao mimetismo molecular, já mencionado e descrito acima ^{46,47}.

2.4.3 Câncer

Altas expressões de HERVs foram relacionadas a alguns tipos de câncer, como em melanomas ⁴⁸, câncer de próstata ⁴⁹, bexiga ⁵⁰, sarcoma de tecidos mole ⁵¹. Os HERVs podem ser responsáveis pela intensificação de vias sinalizadoras oncogênicas, estimulam o crescimento de células cancerosa e limitam sua diferenciação e apoptose. As proteínas de HERV *env*, possuem ações de imunossupressão, induzindo a formação do câncer, sendo que, essa mesma proteína pode acionar o sistema imunológico nas células cancerígenas. ⁵²

2.4.4 Vírus da imunodeficiência humana (HIV)

Em pacientes vivendo com Vírus da imunodeficiência humana (HIV), também foi constatado uma elevada expressão de HERVs ⁵³, foi observado que no plasma sanguíneo desses pacientes, ocorreu uma grande expressão de RNA viral de HERV ⁵⁴. Alguns estudos sugerem que ocorre uma interferência de resposta celular contra as proteínas de HERVs em pacientes com HIV ^{55,56}. Porém, os efeitos da infecção em pacientes com HIV nos fragmentos reguladores de HERVs e seus impactos na expressão do gene celular ainda não são totalmente conhecidos ⁵⁷.

2.5 Papel dos HERVs na doença venosa crônica

A doença venosa crônica se caracteriza como uma anormalidade no qual o retorno venoso é comprometido, principalmente aos membros inferiores, e acaba sofrendo uma obstrução ou um refluxo venoso, comprometendo a volta do sangue venoso ao átrio direito ^{7,10,19}. Os vasos sanguíneos estão sujeitos aos fatores hormonais e mecânicos devido ao fluxo sanguíneo. Os fatores mecânicos

são apresentados em três tipos de forças, sendo elas, pressão, tensão circunferencial e tensão de cisalhamento ¹⁴.

Nos casos mais graves da doença, pode se desenvolver uma úlcera venosa ¹⁹. A ulceração é causada por uma lesão no capilar, por meio de uma aderência de leucócitos nas células endoteliais, radicais livres, catabólitos e elementos vaso-ativos. Esse acúmulo de leucócitos leva a uma inflamação do tecido ¹⁹.

Acredita-se que as expressões dos HERVs podem estar associadas a um fator inflamatório sistêmico, e sua expressão tem sido envolvida com uma série de outras doenças inflamatórias, como, por exemplo, cerca de 78% dos pacientes com Insuficiência venosa crônica (IVC) também apresentam quadros de diabetes ^{23,58,59}. Interessantemente, camundongos que apresentam diabetes tipo 1 exibem expressão dos HERVs em ilhotas pancreáticas, além da expressão dos antígenos *gag* e *env*. Notavelmente, os autores também descreveram um potencial imunopatogênico desses antígenos para com o desenvolvimento do diabetes, que poderiam estimular as células T autoreativas ⁶⁰. Além disso, um maior nível de expressão dos HERVs em pacientes com diabetes também foi observado em relação à pacientes que não apresentavam o diabetes. Adicionalmente, um estudo prévio descreveu que os HERVs podem induzir resposta inflamatória contra as células beta do pâncreas ⁶¹.

Não há descrições na literatura que investiguem o perfil de expressão dos HERVs em pacientes afetados pela DVC. Mas as condições inflamatórias dispostas pela DVC podem resultar em um efeito favorável sistêmico para expressão dos HERVs. Os papéis dos HERVs em possíveis doenças inflamatórias têm sido estudados consideravelmente. Sendo assim, a DVC fornece modelo interessante para observar o perfil de expressão de HERVs e possíveis comorbidades inflamatórias observadas na condição da doença.

3 Justificativa

A DVC é uma doença inflamatória que afeta o sistema circulatório, principalmente dos membros inferiores, afetando a qualidade de vida dos seus enfermos, levando a dores venosas, fadiga, sensação de inchaço e nos casos mais graves da doença, e os aparecimentos de úlceras venosas dificultam a capacidade de locomoção. A incidência de DVC na população mundial pode chegar até 83,3%, sendo que no Brasil, as mais comuns causas de afastamento no trabalho são em decorrência das varizes, responsável por um impacto socioeconômico elevado.

A etiologia para a Doença venosa crônica, ainda é pouco compreendida. Contudo, a DVC é uma doença inflamatória, e sabemos que, em situações onde a elevação da pressão venosa é crônica, há indicativos de inflamação, como ocorrência de enzimas proteolíticas, e a adesão de leucócitos no tecido valvar e na parede venosa, sendo direcionados a uma cascata inflamatória. Porém, a origem inflamatória e por consequência, o mau funcionamento circulatório e destruição das paredes e válvulas sanguíneas, ainda requerem uma explicação.

Acredita-se que os HERVs estão envolvidos em alguns processos inflamatórios, onde, os pacientes que se encontram com perfil inflamatório, expressam níveis elevados de HERVs, ainda não há nenhum tipo de comprovação, mas pacientes que se encontram com DVC podem a vir expressar HERVs. Portanto, é de grande valor que encontrem em que grau de expressão esses pacientes com DVC se apresentam, para avaliar o impacto que os HERVs possam apresentar no curso da doença, e talvez devido a uma elevada expressão possam estar estimulando uma resposta imune. Tudo isso para melhorar a percepção do conhecimento da doença e uma melhor compreensão da sua fisiopatologia.

4 Objetivos

4.1 Objetivo geral

Avaliar o perfil de expressão de Retrovírus endógenos humanos W e K, em pacientes com doença venosa crônica.

4.2 Objetivos específicos

Comparar a frequência de expressão de diferentes famílias de Retrovírus endógenos humanos em pacientes com Doença venosa crônica e no grupo controle.

Determinar quais famílias estão mais expressas.

Avaliar a expressão de citocinas pró e anti-inflamatórias TNF- α , IL-6 e IL-10, nos indivíduos com DVC e grupo controle.

Avaliar a resposta humoral anti-HERV-W em pacientes com DVC e indivíduos saudáveis.

5 Métodos

Trata-se de um estudo transversal prospectivo do tipo caso-controle.

Para a realização deste estudo, foram selecionados pacientes da Clínica Parque da Cidade e, que possuem doença venosa crônica constatada. Participaram deste estudo somente pacientes que assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) e responderem o questionário. A etapa de recrutamento, seleção e classificação das varizes dos pacientes com DVC contou com a colaboração da Prof. Ms Ana Paula Augusto da Cruz Ballerini, médica angiologista. Após a classificação das varizes, os pacientes foram separados por grupos de acordo com a classificação clínica, etiológica, anatômica e fisiopatológica (CEAP) para doenças venosas ¹².

Para a composição do grupo controle foram convidados voluntários pareados por sexo e idade, que não apresentam DVC e nem histórico de doenças autoimunes na família.

5.1 Critérios de Exclusão

Pacientes que apresentaram alguma doença autoimune ou histórico de doença autoimune na família foram excluídos do estudo.

5.2 Coleta e processamento das amostras

Para realizar às análises propostas foram coletados três 4 ml de sangue de cada um dos voluntários em um único momento do estudo. Sendo, dois tubos com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) para obtenção de célula mononuclear do sangue periférico (PBMC) para posterior análises moleculares e uma amostra em tubo seco com gel separador para obtenção de soro para a quantificação das citocinas.

As amostras foram encaminhadas para o laboratório de pesquisa da Universidade Santo Amaro (UNISA). As amostras de sangue foram centrifugadas a 2860 rotação por minutos (RPMs) durante 10 minutos, para separação das três fases sanguíneas. Em seguida, o *buffy coat* foi coletado para

tratamento com *buffer* de lise de eritrócito, seguindo instruções do fabricante (QIAGEN). E os *pellets* celulares com plaquetas foram armazenados em freezer -80 °C até o momento de sua utilização.

5.3 Aspectos éticos

O projeto foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa (CEP) da Universidade Santo Amaro (UNISA) e teve como instituição coparticipante a Clínica Parque da Cidade com o parecer número 5.152.962.

5.4 Logística laboratorial

5.5 Obtenção e purificação do RNA

Para a obtenção e purificação do RNA nas amostras, foi realizado a extração pelo método de Trizol. De início, foi adicionado ao pellet 1000µl de Trizol para cada amostra, sendo ela homogeneizada por 10s rompimento das células. Em sequência, foi adicionado 200µl de clorofórmio para ocorrer a separação dos ácidos nucleicos e fase orgânica. Logo após, as amostras foram centrifugadas a 15.000 RPMs a 15 minutos a 4 °C. Em seguida, cerca de 500µl do sobrenadante (fase aquosa) foi separada e adicionada em um tubo novo. Foi adicionado no mesmo tubo, 500µl de isopropanol gelado para auxiliar na etapa de precipitação dos ácidos nucleicos, e uma nova centrifugação a 15.000 RPMs a 10 minutos a 4° C. O *pellet* foi lavado com etanol a 70%, e centrifugação a 15.000 RPMs a 10 minutos a 4 °C foi realizado. O *pellet* de RNA com resíduos de DNA foi seco a temperatura ambiente a 10 minutos. O RNA com resíduos de DNA obtido foi resuspendido em 40µl de água *nuclease free*.

As amostras foram tratadas com DNase, seguindo o protocolo turbo. Os Reagentes de Remoção e Tratamento de DNase TURBO DNA-free™ (Thermofisher) foram projetados para remover DNA contaminante de preparações de RNA, e subsequentemente remova a DNase e os cátions.

5.6 Detecção e nível de expressão diferencial dos HERVs

A detecção da expressão foi realizada pelo sistema de reação de cadeia de polimerase em tempo real (q-PCR) usando o sistema de reação *Sybr Green* com genes complementares ao gene do envelope de HERV-W³¹ e ao gene pol do HERV-K³² que amplifica um total de 10 subfamílias do HERV-K, e como gene endógeno utilizamos o primers complementares ao controle endógeno Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH). Os primers utilizados estão descritos na **tabela 3**:

Tabela 3: Primers que foram utilizados em ensaios de PCR em tempo real

Oligonucleotídes	Primer Senso)	Primer Antissenso
HERV-W	CCAATGCATCAGGTGGGT AAC	GAGGTACCACAGACAAAAATA TTCCT
HERV-K	TCCCCTTGGAATACTCCT GTTTT	CATTCCTTGTGGTAAACTTTC CA
GAPDH	ACCCACTCCTCCACCTTT GAC	TGTTGCTGTAGCCAATTCGTT

As condições de ciclagem para detecção dos HERVs se iniciaram com o cDNA, com o kit One-step, com 44 °C a 30 minutos e 94 °C a 2 minutos. Seguido de 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos, 50 °C por um minuto e 60 °C por um minuto.

Com relação às condições de ciclagem do GAPDH utilizamos os seguintes parâmetros: 50 °C por dois minutos, 95 °C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95 °C por e 15s 60 °C por um minuto. Como todos os ensaios foram baseados no método de SYBR Green, adicionamos uma etapa final para obter a curva de Melting.

A atividade transcricional dos HERVs, foi avaliada de forma qualitativa (ausência ou presença) e também de forma quantitativa (nível de expressão), através de quantificação relativa dos HERVs com relação ao GAPDH do grupo com DVC e a relação dos HERVs com o GAPDH do grupo controle, esses dados foram expressos através do método de $-2\Delta\Delta Ct$. bivalentes da amostra.

Para a construção do cDNA utilizamos o kit One steps SYBR Green RT-qPCR, que realiza a etapa de cDNA com o PCR em tempo real.

A descrição do volume e das concentrações dos primers estão descritos na **tabela 4**.

Tabela 4. Volume e concentração dos reagentes utilizados para amplificação e quantificação dos HERVs.

Reagentes	Volume	Concentração Final
M-MLV transcriptase reversa	0,125 µl	1un/µL
SYBR Green Taq mix pronto para quantitativo	12,5 µl	1x
Reference Dye para quantitativos 100x solução	0,25 µl	1x
Solução de cloreto de magnésio	1 µl	2,5mM
Água ultrapura	6,2 µl	
Primer Foward e Reverse	1 µl cada	3,2pmol
RNA (Amostra)	3 µl	150ng
Volume Total	25 µl	

5.7 Análise de níveis de citocinas pró e anti-inflamatórias

Para a quantificação das citocinas séricas foi utilizado três kits de ELISA da Thermofisher (Invitrogen human IL-6 uncoated ELISA, human TNF alpha uncoated ELISA, human IL-10 uncoated ELISA) para IL-6, TNF- α e IL10 seguindo as recomendações do fabricante. Brevemente, o ensaio é de um ELISA indireto, sendo que a detecção foi dada na densidade de onda (DO) de 450nm. Esse valor foi utilizado para determinar a quantificação baseado em curva padrão fornecida pelo kit, onde os valores de regressão linear foram considerados a fim de determinar a exata quantificação em pg/mL.

5.8 Análise para síntese de peptídeos

Sequências de proteínas relacionadas a cartilagem e famílias de HERV K e W associadas a AR foram identificadas no banco de dados online do National Center for Biotechnology Information (NCBI) / GenBank (

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gquery/>). A análise in-silico foi realizada usando algoritmos disponíveis publicamente (<http://www.expasy.ch/cgi-bin/protscale.pl>).

Foi realizada uma análise das sequências de HERV-K e HERV-W, para identificar a localização dos peptídeos na estrutura da proteína, utilizando o TMHMM - 2.0 (Prediction of transmembrane helices in proteins) <https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?TMHMM-2.0>, o SignalP - 5.0 (Signal peptide and cleavage sites in gram+, gram- and eukaryotic amino acid sequences) <https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP-5.0>, o TMpred (Prediction of Transmembrane Regions and Orientation) https://embnet.vitalit.ch/software/TMPRED_form.html, além da análise da proteína em 3D por meio do Swiss Model <https://swissmodel.expasy.org/interactive>. Com a análise dos resultados obtidos, os peptídeos foram sintetizados em colaboração com a Dra. Maria Aparecida Juliano, Departamento de Biofísica, Infar - Universidade Federal de São Paulo.

5.8 ELISA indireto para a detecção de anticorpos anti-hervs

Os peptídeos foram diluídos em tampão carbonato/bicarbonato pH 9.6 (10 mg/ml) para revestir os poços de placa de 96 poços (Nunc MaxiSorp, Thermo), alternadamente com poços sem peptídeos (para controle de ligação inespecífica). Após 24 horas, os poços foram bloqueados, por uma hora, com Soro Fetal Bovino (SFB) 3% em tampão de lavagem (PBS com 0,1% Tween-20). As amostras de soro foram diluídas em PBS (1:400) e adicionadas aos poços em duplicata (dois poços revestidos) por uma hora à temperatura ambiente. As placas foram lavadas três vezes com tampão de lavagem (PBS- Tween 0,1%) e incubadas por 30 minutos à 37 °C com anticorpo anti-humano de caprino conjugado com peroxidase (sigma) diluídos em SFB (1:5000). Após das sete lavagens, o tampão de lavagem foi adicionado o substrato (ABTS – sigma) com peróxido de hidrogênio e parado com 1M de NH₄Cl e a absorbância determinada em leitor de placa (Loccus LMR-96)

5.9 Análise estatística

Para analisar a diferença estatística de expressão de HER-W, foi utilizado o teste t de student, utilizando o programa PRISM 8.3.

Um teste de probabilidade normal foi realizado para identificar desvios da normalidade, utilizando o programa PRISM 8.3.

6 Resultados

6.1 Dados demográficos dos participantes

Ao todo, foram incluídos neste estudo 85 participantes, dos quais, 39 foram pacientes com doença venosa crônica constada, e 46 voluntários para compor o grupo controle. Os dados sociodemográficos da população de estudo encontra-se descrito na **tabela 5**.

Tabela 5. Dados demográficos dos participantes

Dados demográficos	Grupo doença venosa crônica	Grupo controle
Sexo	Mulheres (37) Homens (2)	Mulheres (36) Homens (3)
Idade (Média)	26-72 (47,48)	29-62 (41,77)
Cirurgia relacionada a DVC	Revascularização do miocárdio (4)	Não se aplica
Medicamentos relacionados a DVC	- Nome genérico: Domperidona; Princípios ativos: cumarina e troxerrutina/ (1) -Nome genérico: diosmin; princípio ativo: diosmina (2)	Não se aplica
Outras doenças	- Refluxo gastresofágico (1) -Transtorno de ansiedade (2) -Hipotireoidismo (1) -Megaesôfago chagásico (1) -Pressão alta (2) -Diabetes (2) -Arritmia (1) -Hipertensão (2) -Trombose (1) -Síndrome de Klippel-Trenaunay (1)	- Osteoporose (1) -Depressão (1) -Transtorno da esclerótica (1)
Grau de escolaridade	-Fundamental incompleto-5 -Fundamental completo-6 -Ensino médio incompleto 2 -Ensino médio completo-14 -Ensino superior incompleto-2	-Fundamental incompleto-0 -Fundamental completo-3 -Ensino médio incompleto-1 -Ensino médio completo-5 -Ensino superior incompleto-15 -Ensino superior completo- 5

	-Ensino superior completo-8	-Pós-graduação incompleta-0
	-Pós-graduação incompleta-0	-Pós-graduação completa-17
	-Pós-graduação completa-2	
Classificação CEAP	C1-1 Mulher C2-35 mulheres, 2 homens C3-1 mulher	Não se aplica
Características Étnicas e sociais	17- Pardos (43,6%) 2- Negros (5,1%) 20- Brancos (51,3%)	Pardo- 19 Negros- 6 Brancos- 18 Oriental- 3

6.1.2 Grupo doença venosa crônica

Dentre os pacientes que compõem o grupo com DVC, 37 eram mulheres, correspondendo a 94,8%, e 2 eram homens correspondendo a 5,2%, com idade média de 47,4 anos, cuja amplitude variou de 26 aos 72 anos.

Quando perguntado em relação a características étnicas sociais dos participantes, 20 se auto-declararam brancos 51,3%, 17 eram pardos correspondendo a 43,6% e 2 eram negros correspondendo a 5,1%.

Paciente que realizaram alguma cirurgia relacionada a DVC, 35 deles (89,8%) não realizaram cirurgias nenhum tipo de cirurgia relacionada a DVC e 4 (10,2%) realizaram cirurgia, sendo a revascularização do miocárdio.

Em relação aos medicamentos utilizados, relacionados a DVC, 36 (92,3%) não utilizavam de nenhum medicamento relacionado a DVC, e 3 (7,7%) utilizam medicamentos relacionados a DVC, sendo eles, Vennalote e Diosmina.

A análise de presença de outras comorbidades que o pacientes auto-relataram mostrou que, 24 (61,5%) não apresentavam nenhuma outra doença além da DVC, e 15 (38,5%) possuíam outras doenças, sendo elas, refluxo gastresofágico (1), transtorno de ansiedade (2), hipotireoidismo (1), megaesôfago chagásico (1), pressão alta (2), diabetes (2), arritmia (1), hipertensão (2), trombose (1) e síndrome de Klippel-Trenaunay (1).

O maior grau de escolaridade relatada pelos participantes foi de ensino médio completo 14 (35,9%) e os menores graus de escolaridade foi ensino superior incompleto 2 (5,1%) e pós-graduação completa 2 (5,1%).

6.1.3 **Grupo Controle**

Dentre os participantes que fazem parte do o grupo controle, 43 (93,5%) eram mulheres, e 3 (6,5%) eram homens, com idade média de 41,77 anos, cuja amplitude variou de 29 a 62 anos.

Os participantes que não possuíam DVC constatada, tinham como outras doenças osteoporose, depressão e transtorno da esclerótica.

Quando perguntado em relação a características étnicas sociais dos participantes, 6 se autodeclararam negros, 19 eram pardos, 18 eram brancos e 3 orientais.

O maior grau de escolaridade relatada pelos participantes foi de pós-graduação completa correspondendo a 17 (36,9%) dos participantes e o menor grau de escolaridade foi 1 (2,1%) participante que relatou ensino médio incompleto.

6.2 Expressão de HERVs W e K

A detecção de transcritos de HERV W e K dos 85 participantes está descrito na **tabela 6**.

Tabela 6-Dados das expressões dos participantes do estudo.

	GAPDH- Positivo	GAPDH- Negativo	HERV-W- Positivo	HERV-W- Negativo	HERV-K- Positivo	HERV-K- Negativo
Grupo DVC	39 (100%)	-	34 (89,7%)	5 (10,3%)	-	39 (100%)
Grupo Controle	46 (100%)	-	46 (100%)		13 (28,3%)	33 (71,7%)

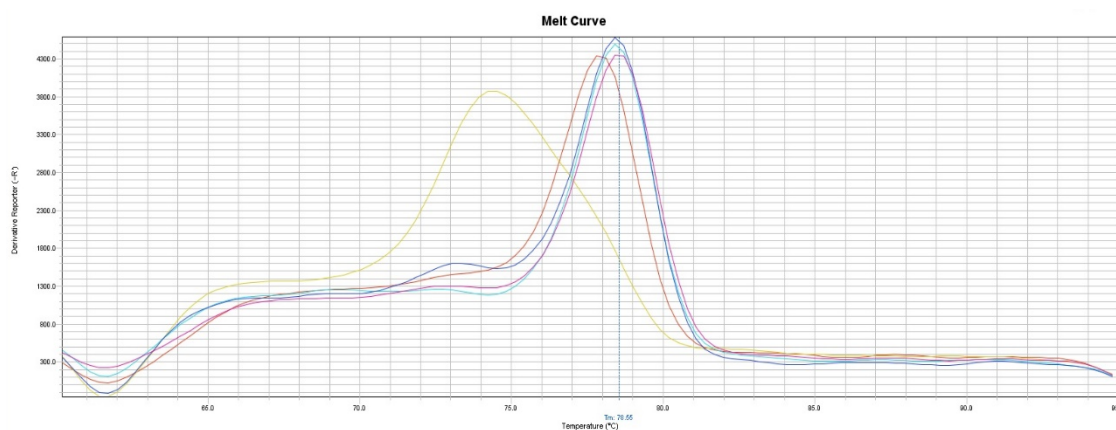


Figura 3 - Curva de Melting para GAPDH. A curva em azul-escuro mostra a amostra positiva para o gene GAPDH que está na temperatura de aproximadamente 78 °C, e a curva em laranja o controle negativo que se encontra na temperatura de aproximadamente 74 °C, sendo que as curvas nas cores vermelho, azul-claro e roxo são as amostras alvas, todas elas se encontram muito próximas à temperatura do controle positivo, evidenciando que estão testando positivo para o gene GAPDH.

6.2.2 HERV-W

A q-PCR no grupo DVC para HERV-W foi realizada, mostrando que 34/39 (89,7%), expressaram nas suas células, o HERV-W, sendo que, apenas 5 (10,3%) testaram negativo para o HERV-W, **figura 2**.

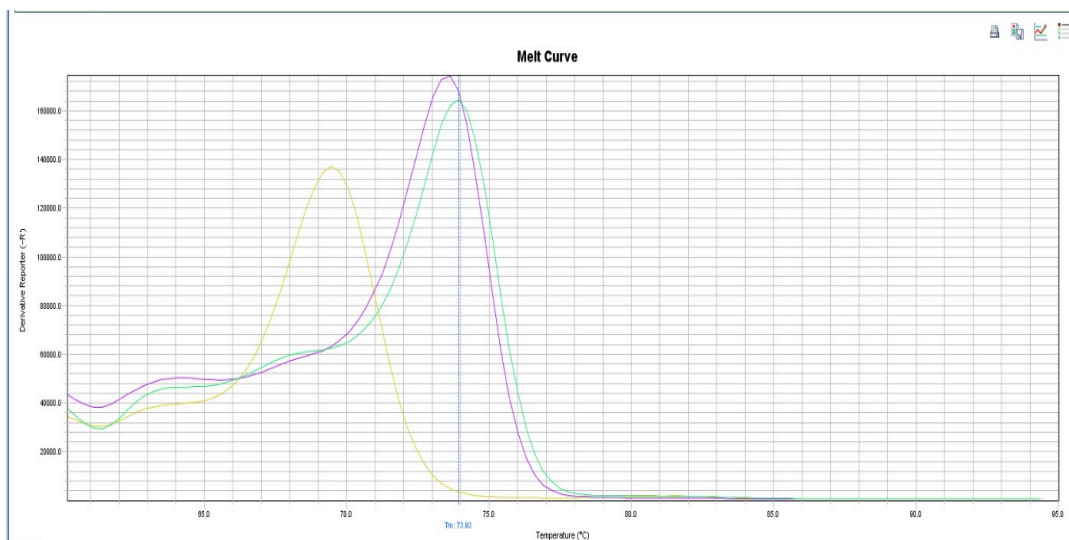


Figura 4 – Curva de Melting para HERV-W. A curva em azul-claro mostra a amostra positiva para o HERV-W que está na temperatura de aproximadamente 73 °C, e a curva em amarelo é o controle negativo que se encontra na temperatura de aproximadamente 69 °C, sendo que a curva na cor roxo é a amostra alvo, a amostra alvo está próxima à temperatura do controle positivo, evidenciando que estão testando positivo para o HERV-W.

Quase todos os participantes do nosso estudo apresentaram a expressão do HERV-W 34/39 (89,7%) . Contudo, a expressão dos participantes com DVC, foi em média 6 vezes maior em relação a mediana do grupo controle ($p < 0,01$), conforme **figura 5**.

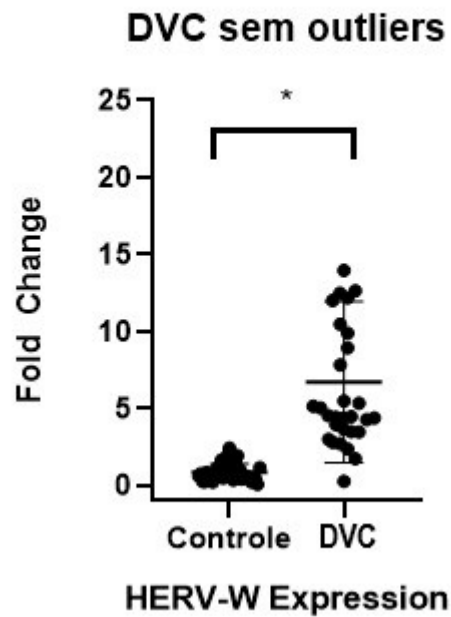


Figura 5 - Expressão de HERV-W em DVC e indivíduos saudáveis. A expressão de HERV-W revelou ser significativamente diferente quando comparada a indivíduos saudáveis ($p < 0,01$)

6.2.3 *HERV-K*

A PCR em tempo real para o HERV-K foi realizada, porém, os participantes que compõem o grupo DVC testados, foram todos negativos para a expressão do HERV-K, e no grupo controle 13 participantes testaram positivo para o HERV-K, sendo assim, não foi possível fazer uma análise de expressão diferencial.

6.3 Análises de citocinas pró e anti-inflamatórias

Observamos que as citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNF- α estavam significativamente elevadas no nosso grupo com DVC em comparação com o grupo controle, em contrapartida, a citocina anti-inflamatória IL-10 não houve diferença significativa no grupo com DVC e no grupo controle. Apesar do nível significativo de expressão de IL-6 e TNF- α em pacientes DVC em comparação aos indivíduos controles, quando comparado a razão entre IL-6 e TNF- α sobre a IL-10, não houve diferença significativa entre ambos os grupos, conforme **figuras 4 e 5**. E também o nível de IL-10 em ambos os grupos é maior em comparação as citocinas pró-inflamatórias.

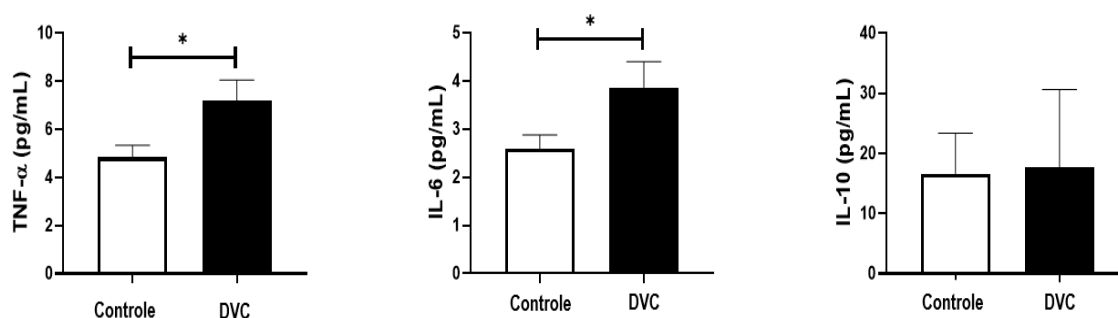


Figura 6- Níveis séricos de citocinas TNF- α , IL-6 e IL-10 em pacientes com DVC e indivíduos controle. IL-6 e TNF- α foram significativamente maiores em pacientes com DVC * $p < 0,01$.
Legenda: DVC: Doença Venosa Crônica

Analizamos a relação IL-6/IL10 e TNF- α /IL-10, as análises revelaram resultados semelhantes em pacientes com DVC e o grupo controle. Os achados podem ser observados na **figura 5**. Esse achado sugere que, embora os níveis de citocinas pró-inflamatórias sejam maiores em pacientes com DVC, a presença

de citocina anti-inflamatória IL-10 é alta e provavelmente pode interferir na cascata pró-inflamatória que pode ser observada em pacientes DVC C2.

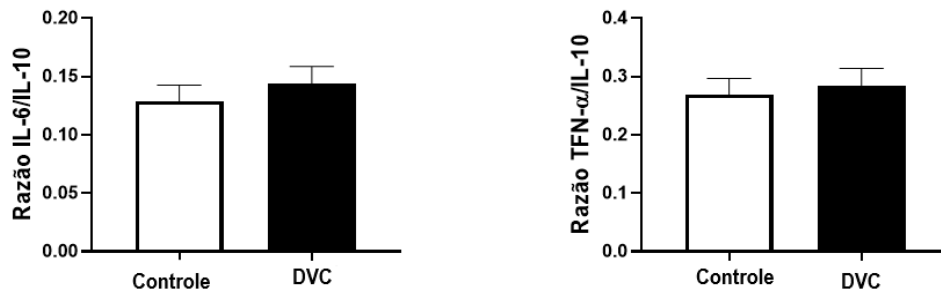


Figura 7- Razões dos níveis de IL-6/IL10 e TNF- α /IL-10 em pacientes com DVC e indivíduos controle. Nenhuma diferença estatística foi observada em ambas as análises.

Legenda: DVC: Doença Venosa Crônica

Também realizamos uma análise de correlação que revelou no grupo DVC possui uma correlação positiva (r de Spearman = 0,431) e significativa ($p < 0,01$) para TNF- α e IL-10. O que sugere o perfil de inflamação e tentativa de compensação com níveis mais elevados de IL-10.

6.4 Peptídeos

A análise in-silico, foi realizada utilizando um alinhamento das proteínas pol do HERV-K e Env do HERV-W com diversas proteínas próprias do organismo humano relacionado aos componentes da articulação, para essa análise teve um treinamento em parceria com o Prof. Dr. Thiago Souza Onofre. Os parâmetros utilizados foram: Matriz de comparação BLOSUM62, foram computados 100 alinhamentos. Foram selecionados peptídeos com mais de 50% de semelhança entre as sequências estudadas.

Utilizamos o soro de 31 pacientes do grupo DVC e 31 participantes do grupo controle para efetuar a análise.

A resposta ao ELISA anti-HERV-W, mostrou resposta maior humoral o peptídeo HERV-W no grupo DVC em relação ao grupo controle ($p < 0,01$), conforme **figura 6**.

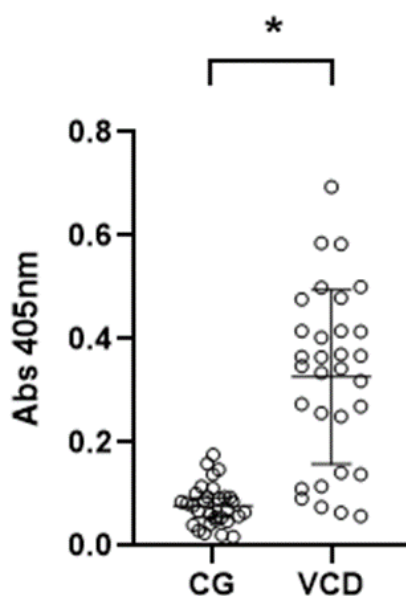


Figura 8-Absorvância da resposta env anti-HERV-W em pacientes com DCV e indivíduos saudáveis. Pacientes com DVC apresentam maior título de anticorpos anti-env-HERV-W do que indivíduos saudáveis ($p < 0,01$)

Legenda: Abs = Absorvância GC: Grupo Controle, DVC: Doença Venosa Crônica

7 Discussão

Até onde sabemos, este é o primeiro estudo a que teve como objetivo avaliar a expressão de HERVs em pacientes com DVC. Curiosamente, encontramos uma expressão de HERV-W consideravelmente alta 35/39 (89,7%). Embora todos os indivíduos do grupo controle tenham expressado HERV-W, todos eles apresentaram baixo nível de expressão de HERV-W, este achado vai ao encontro de estudos anteriores que demonstram que indivíduos saudáveis apresentam menor nível de expressão de HERV-W ⁶²⁻⁶⁶. Por outro lado, em pacientes com DVC, o nível de expressão de HERV-W é maior quando comparado ao estudo anterior que avaliou o nível de expressão na esclerose múltipla (EC) ^{62,63,67} e na síndrome da fadiga crônica ⁶⁸. Curiosamente, pacientes com DVC também apresentam maior nível de resposta humoral do que em indivíduos controle. Esses achados sugerem que a presença de HERV-W e alta atividade transcricional também pode estimular a resposta contra o retrovírus através da resposta de anticorpos.

Embora a etiologia da DVC seja desconhecida, existem muitos fatores de risco que contribuem para o desenvolvimento e agravamento do quadro clínico da DCV, o papel do HERV-W na doença ainda é pouco conhecido, e talvez não desempenhe um papel etiológico em DVC. No entanto, é consenso que os HERVs podem estimular o quadro inflamatório tanto em condições fisiológicas quanto patológicas. Acredita-se que os HERVs desempenhem um papel na inflamação necessária para o reparo tecidual. A sincitina-1, que é uma proteína codificada pelo gene HERV-W env, que promove a fusão de células em alguns tecidos ⁶⁹⁻⁷² e interage com filamentos de actina e proteínas caveolina em outras células para promover a diferenciação celular ⁶⁹⁻⁷². Por outro lado, a expressão diferencial de HERV-W foi amplamente explorada em doenças autoimunes ^{7,23,44} e, mais extensivamente, na esclerose múltipla ^{62,63,73-77}. Curiosamente, acredita-se que o HERV-W também desempenhe um papel no DM. Achados anteriores indicam maior expressão do retroviral no DM e talvez uma condição patológica necessária para o surgimento da doença ^{61,74,78,79}. É importante mencionar que algumas doenças inflamatórias, como DM, são mais frequentes em pacientes com insuficiência venosa crônica (VCI) do que na população em geral ³⁷. Curiosamente, existe um anticorpo monoclonal contra a proteína HERV-

W env que foi hipotetizado para ser usado uma ferramenta terapêutica para o DM ⁸⁰.

Considerando todos esses aspectos biológicos dos HERVs em condições saudáveis e patológicas, podemos vislumbrar dois cenários distintos, mas não situações paralelas, para esse perfil de expressão em DVC. O HERV-W é expresso devido ao quadro inflamatório crônico promovido pela hipertensão venosa comumente descrita na doença e pode potencialmente estimular a adesão de leucócitos ao tecido endotelial, sabe-se que a Sincitina-1 é capaz de promovê-la ⁸¹. E como mencionado, HERVs podem estimular a resposta inflamatória que pode contribuir para a condição inflamatória crônica de DVC e disfunção endotelial. Curiosamente e em sintonia com esse achado, descrevemos maior resposta humoral contra HERV-W em pacientes com DVC. Esse perfil de resposta imunológica também foi descrito em esclerose múltipla ^{50,82,83}54-56, e o nível de anticorpos anti-HERV-W pode ser modulado uma vez que as condições inflamatórias sejam reguladas ⁸⁴.

Paralelamente, as análises de expressão de HERV-K revelaram achados distintos, onde foi menos frequente que a expressão de HERV-W e não foi significativamente diferente do grupo controle. Este achado é surpreendente, uma vez que o HERV-K foi endogenizado mais recentemente e, portanto, poderia ser mais ativo do que outras famílias de HERV ^{33,85}. No entanto, isso pode ser esperado, especialmente porque o HERV-W tem sido mais profundamente associado em situações imunopatológicas do que o HERV-K, que se acredita estar mais ligado a outras condições, como câncer ⁸⁶⁻⁸⁸ e regulação da infecção pelo HIV ^{56,89}.

O perfil de citocinas revelou que pacientes com DCV apresentam níveis mais elevados de citocinas pró-inflamatórias do que indivíduos saudáveis. Nossos achados estão de acordo com os estudos anteriores que revelaram níveis mais elevados de citocinas pró-inflamatórias em pacientes com DCV ⁹⁰⁻⁹³. Mas, curiosamente, o nível de IL-10 é maior do que as citocinas pró-inflamatórias em pacientes saudáveis e com DCV. Esta condição revela que os pacientes podem apresentar um quadro inflamatório, porém pode ser contido devido a níveis mais elevados de IL10. Embora a IL-10 possa regular a condição pró-inflamatória, a superexpressão sérica de TNF- α e IL-6 pode representar uma baixa condição

pró-inflamatória que pode piorar ao longo da vida de pacientes com DCV. Em contato com essa hipótese, a análise de correlação revelou uma correlação positiva entre IL-10 e TNF- α em pacientes com DCV, este também é um perfil semelhante ao processo de inflammaging ⁹⁴, em que as citocinas pró-inflamatórias estão mais em níveis mais elevados, e um processo de compensação está presente para manter afastado um possível processo inflamatório elevado.

7.3 Limitações do estudo

Devido ao baixo número de participantes com DVC, não conseguimos recrutar pacientes com os casos mais graves, sendo eles o IVC, além disso, não conseguimos fazer a comparação de expressão de HERVs entre a classificação CEAP devido ao não recrutamento dos indivíduos do grau C4 a C6. Contudo, mais estudos são necessários para compreender melhor como os HERVs influenciam na DVC.

8 Conclusão

O nível de expressão do HERV-W é maior nos pacientes com DVC em comparação a indivíduos saudáveis.

O HERV-K não foi expresso em nenhum paciente com DVC, já, em contrapartida, alguns pacientes saudáveis expressaram o HERV-K.

As citocinas IL- e TNF- α estão mais expressas em pacientes com DVC em relação ao grupo controle, e a IL-10 não houve diferença significativa entre os grupos.

Os pacientes com DVC apresentaram uma resposta humoral maior contra HERV-W em relação a indivíduos saudáveis.

Referências bibliográficas

1. Mansilha A, Sousa J. Pathophysiological Mechanisms of Chronic Venous Disease and Implications for Venoactive Drug Therapy. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2018 Jun 1 [cited 2022 Jul 12];19(6). Available from: [/pmc/articles/PMC6032391/](#)
2. Labropoulos N. How Does Chronic Venous Disease Progress from the First Symptoms to the Advanced Stages? A Review. *Adv Ther* [Internet]. 2019 Mar 24 [cited 2022 Jul 12];36(Suppl 1):13. Available from: [/pmc/articles/PMC6824340/](#)
3. Nicolaidis AN, Labropoulos N. Burden and Suffering in Chronic Venous Disease. *Adv Ther* [Internet]. 2019 Mar 24 [cited 2022 Jul 12];36(Suppl 1):1. Available from: [/pmc/articles/PMC6824337/](#)
4. Zolotukhin IA, Seliverstov EI, Shevtsov YN, Avakiants IP, Nikishkov AS, Tatarintsev AM, et al. Prevalence and Risk Factors for Chronic Venous Disease in the General Russian Population. *Eur J Vasc Endovasc Surg* [Internet]. 2017 Dec 1 [cited 2022 Jul 12];54(6):752–8. Available from: <http://www.ejves.com/article/S1078588417305373/fulltext>
5. Da Coelho RM, Nunes MAP, Gomes CVC, Dos Viana IS, Da Silva ÂM. Time trends and social security burden of temporary work disability due to chronic venous disease in Brazil. *BMC Public Health* [Internet]. 2020 Apr 10 [cited 2022 Jul 12];20(1). Available from: [/pmc/articles/PMC7147047/](#)
6. Davies AH. The Seriousness of Chronic Venous Disease: A Review of Real-World Evidence. *Adv Ther* [Internet]. 2019 Mar 24 [cited 2022 Jul 12];36(Suppl 1):5. Available from: [/pmc/articles/PMC6824448/](#)
7. Lopes CR, Figueiredo M, Ávila AM, Soares LMBM, Dionisio VC. Avaliação das limitações de úlcera venosa em membros inferiores. *J Vasc Bras* [Internet]. 2013 [cited 2021 Apr 7];12(1):5–9. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1677-54492013000100003&lng=en&nrm=iso&tlng=pt
8. Salomé GM, Blanes L, Ferreira LM. Avaliação de sintomas depressivos em

- peessoas com úlcera venosa. Rev Bras Cir Plástica [Internet]. 2012 Mar [cited 2021 Apr 8];27(1):124–9. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1983-51752012000100021&lng=en&nrm=iso&tlng=pt
9. Epidemiology of chronic venous disorders in geographically diverse populations: results from the Vein Consult Program - International Angiology 2012 April;31(2):105-15 - Minerva Medica - Journals [Internet]. [cited 2022 Dec 1]. Available from: <https://www.minervamedica.it/en/journals/international-angiology/article.php?cod=R34Y2012N02A0105>
 10. Saliba Jr. OA, Giannini M, Rollo HA. Métodos de diagnóstico não-invasivos para avaliação da insuficiência venosa dos membros inferiores. J Vasc Bras [Internet]. 2007 Sep [cited 2021 Apr 7];6(3):266–75. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1677-54492007000300010&lng=en&nrm=iso&tlng=en
 11. Dos Santos VP, Queiroz AB. Venous disease classifications and generic and disease-specific quality of life questionnaires: Which, why, and when to use? [Internet]. Vol. 18, Jornal Vascular Brasileiro. Sociedade Brasileira de Angiologia e Cirurgia Vascular; 2019 [cited 2021 Apr 7]. Available from: <https://doi.org/10.1590/1677-5449.190114>
 12. Eklöf B, Rutherford RB, Bergan JJ, Carpentier PH, Gloviczki P, Kistner RL, et al. Revision of the CEAP classification for chronic venous disorders: Consensus statement. In: Journal of Vascular Surgery. Mosby; 2004. p. 1248–52.
 13. Zamboni P. The Big Idea: Iron-dependent inflammation in venous disease and proposed parallels in multiple sclerosis. J R Soc Med [Internet]. 2006 Nov 1 [cited 2021 Aug 10];99(11):589. Available from: </pmc/articles/PMC1633548/>
 14. Traub O, Berk BC. Laminar shear stress: Mechanisms by which endothelial cells transduce an atheroprotective force [Internet]. Vol. 18, Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. Lippincott Williams

- and Wilkins; 1998 [cited 2021 Jun 29]. p. 677–85. Available from: <http://ahajournals.org>
15. Balzer K. Chronic Venous Insufficiency. In: *Vascular Surgery* [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2007 [cited 2021 Apr 7]. p. 539–50. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-3-540-30956-7_47
 16. Aldunate JLCB, Isaac C, Ladeira PRS de, Carvalho VF, Ferreira MC. Úlceras venosas em membros inferiores. *Rev Med* [Internet]. 2010 Dec 19 [cited 2021 Apr 21];89(3/4):158. Available from: <https://www.revistas.usp.br/revistadc/article/view/46291>
 17. Fiebig A, Krusche P, Wolf A, Krawczak M, Timm B, Nikolaus S, et al. Heritability of chronic venous disease. *Hum Genet* [Internet]. 2010 Jun [cited 2022 Jul 12];127(6):669. Available from: [/pmc/articles/PMC2871097/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22871097/)
 18. Gastaldi G, Pannier F, Roztocil K, Lugli M, Mansilha A, Haller H, et al. Chronic venous disease and diabetic microangiopathy: pathophysiology and commonalities. *Int Angiol* [Internet]. 2021 Dec 1 [cited 2022 Jul 12];40(6):457–69. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34547884/>
 19. Júnior N, de Barros Júnior N. *Insuficiência Venosa Crônica*. 2003.
 20. Pocock ES, Alsaigh T, Mazor R, Schmid-Schönbein GW. Cellular and molecular basis of Venous insufficiency [Internet]. Vol. 6, *Vascular Cell*. BioMed Central Ltd.; 2014 [cited 2021 Jun 7]. p. 1–8. Available from: [/pmc/articles/PMC4268799/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24268799/)
 21. Bergan J. Molecular Mechanisms in Chronic Venous Insufficiency. *Ann Vasc Surg* [Internet]. 2007 May [cited 2021 Jun 29];21(3):260–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17484957/>
 22. Takase S, Lerond L, Bergan JJ, Schmid-Schönbein GW. Enhancement of reperfusion injury by elevation of microvascular pressures. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol* [Internet]. 2002 [cited 2021 Jun 7];282(4 51-4):1387–94. Available from: <http://www.ajpheart.org>

23. Dolei A. The aliens inside us: HERV-W endogenous retroviruses and multiple sclerosis. *Mult Scler* [Internet]. 2018 Jan 1 [cited 2021 Apr 22];24(1):42–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29307292/>
24. Martin MA, Bryan T, Rasheedt S, Khan AS. Identification and cloning of endogenous retroviral, sequences present in human DNA (endogenous primate proviruses/retrovirus evolution/cloned human DNA/recombinant DNA). Vol. 78, *Proc. NatL Acad. Sci. USA*. 1981.
25. Garcia-Montojo M, Doucet-O’Hare T, Henderson L, Nath A. Human endogenous retrovirus-K (HML-2): a comprehensive review [Internet]. Vol. 44, *Critical Reviews in Microbiology*. Taylor and Francis Ltd; 2018 [cited 2021 Apr 20]. p. 715–38. Available from: </pmc/articles/PMC6342650/>
26. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* [Internet]. 2001 Feb 15 [cited 2021 Apr 17];409(6822):860–921. Available from: www.nature.com
27. Vargiu L, Rodriguez-Tomé P, Sperber GO, Cadeddu M, Grandi N, Blikstad V, et al. Classification and characterization of human endogenous retroviruses mosaic forms are common. *Retrovirology* [Internet]. 2016 Jan 22 [cited 2021 Apr 19];13(1):7. Available from: </pmc/articles/PMC4724089/>
28. Grandi N, Tramontano E. Human endogenous retroviruses are ancient acquired elements still shaping innate immune responses [Internet]. Vol. 9, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A.; 2018 [cited 2021 Apr 19]. p. 2039. Available from: </pmc/articles/PMC6139349/>
29. Nexø BA, Villesen P, Nissen KK, Lindegaard HM, Rossing P, Petersen T, et al. Are human endogenous retroviruses triggers of autoimmune diseases? Unveiling associations of three diseases and viral loci. *Immunol Res* [Internet]. 2016 Feb 1 [cited 2022 Dec 29];64(1):55. Available from: </pmc/articles/PMC4726719/>
30. Pisano MP, Grandi N, Tramontano E. High-throughput sequencing is a crucial tool to investigate the contribution of human endogenous

- retroviruses (HERVs) to human biology and development [Internet]. Vol. 12, *Viruses*. MDPI AG; 2020 [cited 2021 Apr 20]. Available from: [/pmc/articles/PMC7354619/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3354619/)
31. Nelson PN, Carnegie PR, Martin J, Davari Ejtehad H, Hooley P, Roden D, et al. Demystified . . . Human endogenous retroviruses [Internet]. Vol. 56, *Journal of Clinical Pathology - Molecular Pathology*. Mol Pathol; 2003 [cited 2021 Apr 21]. p. 11–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12560456/>
 32. Morris G, Maes M, Murdjeva M, Puri BK. Do Human Endogenous Retroviruses Contribute to Multiple Sclerosis, and if So, How? [Internet]. Vol. 56, *Molecular Neurobiology*. Humana Press Inc.; 2019 [cited 2021 Apr 20]. p. 2590–605. Available from: [/pmc/articles/PMC6459794/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3354619/)
 33. Grandi N, Tramontano E. Type W human endogenous retrovirus (HERV-W) integrations and their mobilization by L1 machinery: Contribution to the human transcriptome and impact on the host physiopathology [Internet]. Vol. 9, *Viruses*. MDPI AG; 2017 [cited 2021 Apr 19]. Available from: [/pmc/articles/PMC5537654/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3354619/)
 34. Tugnet N, Rylance P, Roden D, Trela M, Nelson P. Human Endogenous Retroviruses (HERVs) and Autoimmune Rheumatic Disease: Is There a Link? *Open Rheumatol J* [Internet]. 2013 Mar 26 [cited 2021 Apr 21];7(1):13–21. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23750183/>
 35. Balada E, Vilardell-Tarrés M, Ordi-Ros J. Implication of human endogenous retroviruses in the development of autoimmune diseases [Internet]. Vol. 29, *International Reviews of Immunology*. Int Rev Immunol; 2010 [cited 2021 Apr 21]. p. 351–70. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20635879/>
 36. Cordaux R, Batzer MA. The impact of retrotransposons on human genome evolution [Internet]. Vol. 10, *Nature Reviews Genetics*. NIH Public Access; 2009 [cited 2021 Apr 19]. p. 691–703. Available from: [/pmc/articles/PMC2884099/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3354619/)

37. Lezhnyova VR, Martynova E V., Khaiboullin TI, Urbanowicz RA, Khaiboullina SF, Rizvanov AA. The relationship of the mechanisms of the pathogenesis of multiple sclerosis and the expression of endogenous retroviruses [Internet]. Vol. 9, Biology. MDPI AG; 2020 [cited 2021 Apr 20]. p. 1–17. Available from: [/pmc/articles/PMC7764762/](#)
38. Zhang M, Liang JQ, Zheng S. Expressional activation and functional roles of human endogenous retroviruses in cancers [Internet]. Vol. 29, Reviews in Medical Virology. John Wiley and Sons Ltd; 2019 [cited 2021 Apr 21]. Available from: [/pmc/articles/PMC6590502/](#)
39. Grandi N, Tramontano E. HERV envelope proteins: Physiological role and pathogenic potential in cancer and autoimmunity [Internet]. Vol. 9, Frontiers in Microbiology. Frontiers Media S.A.; 2018 [cited 2021 Apr 19]. p. 462. Available from: [/pmc/articles/PMC5861771/](#)
40. Cegolon L, Salata C, Weiderpass E, Vineis P, Palù G, Mastrangelo G. Human endogenous retroviruses and cancer prevention: Evidence and prospects. BMC Cancer [Internet]. 2013 Jan 3 [cited 2021 Apr 21];13:4. Available from: [/pmc/articles/PMC3557136/](#)
41. Grandi N, Cadeddu M, Blomberg J, Tramontano E. Contribution of type W human endogenous retroviruses to the human genome: Characterization of HERV-W proviral insertions and processed pseudogenes. Retrovirology [Internet]. 2016 Sep 9 [cited 2021 Jun 27];13(1):67. Available from: [/pmc/articles/PMC5016936/](#)
42. Mangeney M, Renard M, Schlecht-Louf G, Bouallaga I, Heidmann O, Letzelter C, et al. Placental syncytins: Genetic disjunction between the fusogenic and immunosuppressive activity of retroviral envelope proteins. Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]. 2007 Dec 18 [cited 2021 Jun 27];104(51):20534–9. Available from: [/pmc/articles/PMC2154466/](#)
43. Ting CN, Rosenberg MP, Snow CM, Samuelson LC, Meisler MH. Endogenous retroviral sequences are required for tissue-specific expression of a human salivary amylase gene. Genes Dev [Internet]. 1992 [cited 2021 Jun 27];6(8):1457–65. Available from:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1379564/>

44. Rose NR. Molecular Mimicry and Clonal Deletion: A Fresh Look. *J Theor Biol* [Internet]. 2015 Jun 1 [cited 2021 Aug 10];375:71. Available from: </pmc/articles/PMC4344433/>
45. Katsura Y, Asai S. Evolutionary Medicine of Retroviruses in the Human Genome [Internet]. Vol. 358, *American Journal of the Medical Sciences*. Elsevier B.V.; 2019 [cited 2021 Apr 20]. p. 384–8. Available from: </pmc/articles/PMC7093845/>
46. Freimanis G, Hooley P, Ejtehadi HD, Ali HA, Veitch A, Rylance PB, et al. A role for human endogenous retrovirus-K (HML-2) in rheumatoid arthritis: investigating mechanisms of pathogenesis. *Clin Exp Immunol* [Internet]. 2010 [cited 2021 Aug 10];160(3):340. Available from: </pmc/articles/PMC2883104/>
47. Ejtehadi HD, Freimanis GL, Ali HA, Bowman S, Alavi A, Axford J, et al. The potential role of human endogenous retrovirus K10 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis: a preliminary study. *Ann Rheum Dis* [Internet]. 2006 May [cited 2021 Aug 10];65(5):612. Available from: </pmc/articles/PMC1798125/>
48. Büscher K, Trefzer U, Hofmann M, Sterry W, Kurth R, Denner J. Expression of human endogenous retrovirus K in melanomas and melanoma cell lines. *Cancer Res* [Internet]. 2005 May 15 [cited 2021 Jun 3];65(10):4172–80. Available from: www.aacrjournals.org
49. Wallace TA, Downey RF, Seufert CJ, Schetter A, Dorsey TH, Johnson CA, et al. Elevated HERV-K mRNA expression in PBMC is associated with a prostate cancer diagnosis particularly in older men and smokers. *Carcinogenesis* [Internet]. 2014 [cited 2021 Jun 7];35(9):2074–83. Available from: </pmc/articles/PMC4146419/>
50. Kreimer U, Schulz WA, Koch A, Niegisch G, Goering W. HERV-K and LINE-1 DNA methylation and reexpression in urothelial carcinoma. *Front Oncol* [Internet]. 2013 [cited 2021 Jun 7];3 SEP. Available from: </pmc/articles/PMC3783855/>

51. Giebler M, Staeger MS, Blauschmidt S, Ohm LI, Kraus M, Würfl P, et al. Elevated HERV-K expression in soft tissue sarcoma is associated with worsened relapse-free survival. *Front Microbiol* [Internet]. 2018 Feb 13 [cited 2021 Jun 7];9(FEB). Available from: [/pmc/articles/PMC5816752/](#)
52. Gao Y, Yu XF, Chen T. Human endogenous retroviruses in cancer: Expression, regulation and function (Review) [Internet]. Vol. 21, *Oncology Letters*. Spandidos Publications; 2021 [cited 2021 Jun 7]. Available from: [/pmc/articles/PMC7798031/](#)
53. Brinzevich D, Young GR, Sebra R, Ayllon J, Maio SM, Deikus G, et al. HIV-1 Interacts with Human Endogenous Retrovirus K (HML-2) Envelopes Derived from Human Primary Lymphocytes. *J Virol* [Internet]. 2014 Jun 1 [cited 2021 Jun 8];88(11):6213–23. Available from: [/pmc/articles/PMC4093866/](#)
54. Contreras-Galindo R, Kaplan MH, Contreras-Galindo AC, Gonzalez-Hernandez MJ, Ferlenghi I, Giusti F, et al. Characterization of Human Endogenous Retroviral Elements in the Blood of HIV-1-Infected Individuals. *J Virol* [Internet]. 2012 Jan 1 [cited 2021 Jun 8];86(1):262–76. Available from: [/pmc/articles/PMC3255917/](#)
55. Jones RB, John VM, Hunter D V., Martin E, Mujib S, Mihajlovic V, et al. Human endogenous retrovirus K(HML-2) Gag- and Env-specific T-cell responses are infrequently detected in HIV-1-infected subjects using standard peptide matrix-based screening. *Clin Vaccine Immunol* [Internet]. 2012 Feb [cited 2021 Jun 8];19(2):288–92. Available from: [/pmc/articles/PMC3272926/](#)
56. Garrison KE, Jones RB, Meiklejohn DA, Anwar N, Ndhlovu LC, Chapman JM, et al. T cell responses to human endogenous retroviruses in HIV-1 infection. *PLoS Pathog* [Internet]. 2007 Nov [cited 2021 Jun 8];3(11):1617–27. Available from: [/pmc/articles/PMC2065876/](#)
57. Srinivasachar Badarinarayan S, Shcherbakova I, Langer S, Koepke L, Preising A, Hotter D, et al. HIV-1 infection activates endogenous retroviral promoters regulating antiviral gene expression. *Nucleic Acids Res*

- [Internet]. 2020 Nov 4 [cited 2021 Jun 8];48(19):10890–908. Available from: [/pmc/articles/PMC7641743/](#)
58. E B, K S-S, J B, S P, A L. Innovative biodegradable dibutrylchitin dressing for the treatment of ulcers occurring during chronic venous insufficiency in patients with type 2 diabetes. *Int J Occup Med Environ Health* [Internet]. 2021 Aug 5 [cited 2021 Aug 10];34(4):565–73. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33559646/>
 59. V F, K R, A S, H Č, M D, R B, et al. The relationship between chronic venous insufficiency and diabetes mellitus. *Int Angiol* [Internet]. 2017 Feb 1 [cited 2021 Aug 10];36(1):90–1. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28124879/>
 60. Dai YD, Dias P, Margosiak A, Marquardt K, Bashratyan R, Hu W-Y, et al. Endogenous Retrovirus Gag Antigen and Its Gene Variants Are Unique Autoantigens Expressed in the Pancreatic Islets of Non-obese Diabetic Mice. *Immunol Lett* [Internet]. 2020 Jul 1 [cited 2021 Aug 18];223:62. Available from: [/pmc/articles/PMC7328525/](#)
 61. Levet S, Charvet B, Bertin A, Deschaumes A, Perron H, Hober D. Human Endogenous Retroviruses and Type 1 Diabetes. *Curr Diab Rep* [Internet]. 2019 Dec 1 [cited 2021 Aug 18];19(12). Available from: [/pmc/articles/PMC6872510/](#)
 62. Nali LH, Olival GS, Montenegro H, da Silva IT, Dias-Neto E, Naya H, et al. Human endogenous retrovirus and multiple sclerosis: A review and transcriptome findings. *Mult Scler Relat Disord* [Internet]. 2022 Jan 1 [cited 2023 Feb 10];57. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34922254/>
 63. Do Olival GS, Faria TS, Nali LHS, de Oliveira ACP, Casseb J, Vidal JE, et al. Genomic analysis of ERVWE2 locus in patients with multiple sclerosis: absence of genetic association but potential role of human endogenous retrovirus type W elements in molecular mimicry with myelin antigen. *Front Microbiol* [Internet]. 2013 [cited 2023 Feb 10];4(JUN). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23805135/>

64. PJ B, JD K, KF F. Analysis of Human Endogenous Retrovirus Expression in Multiple Sclerosis Plaques. *J Emerg Dis Virol* [Internet]. 2017 [cited 2023 Feb 10];3(2). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28868516/>
65. Balestrieri E, Minutolo A, Petrone V, Fanelli M, Iannetta M, Malagnino V, et al. Evidence of the pathogenic HERV-W envelope expression in T lymphocytes in association with the respiratory outcome of COVID-19 patients. *EBioMedicine* [Internet]. 2021 Apr 1 [cited 2022 Nov 28];66. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33867312/>
66. Balestrieri E, Pica F, Matteucci C, Zenobi R, Sorrentino R, Argaw-Denboba A, et al. Transcriptional Activity of Human Endogenous Retroviruses in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Biomed Res Int* [Internet]. 2015 [cited 2023 Feb 10];2015. Available from: </pmc/articles/PMC4334862/>
67. Rasmussen HB, Geny C, Deforges L, Perron H, Tourtelotte W, Heltberg A, et al. Expression of endogenous retroviruses in blood mononuclear cells and brain tissue from multiple sclerosis patients. *Mult Scler* [Internet]. 1995 [cited 2023 Feb 10];1(2):82–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9345457/>
68. Rodrigues LS, Da Silva Nali LH, Leal COD, Sabino EC, Lacerda EM, Kingdon CC, et al. HERV-K and HERV-W transcriptional activity in myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome. *Autoimmun Highlights* [Internet]. 2019 Nov 15 [cited 2023 Feb 10];10(1):1–5. Available from: <https://autoimmunhighlights.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13317-019-0122-8>
69. Søe K, Andersen TL, Hobolt-Pedersen AS, Bjerregaard Bolette B, Larsson LI, Delaissé JM. Involvement of human endogenous retroviral syncytin-1 in human osteoclast fusion. *Bone* [Internet]. 2011 Apr 1 [cited 2023 Feb 10];48(4):837–46. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21111077/>
70. Aguilar PS, Baylies MK, Fleissner A, Helming L, Inoue N, Podbilewicz B, et al. Genetic basis of cell-cell fusion mechanisms. *Trends Genet* [Internet].

- 2013 Jul [cited 2023 Feb 10];29(7):427–37. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23453622/>
71. Frese S, Ruebner M, Suhr F, Konou TM, Tappe KA, Toigo M, et al. Long-Term Endurance Exercise in Humans Stimulates Cell Fusion of Myoblasts along with Fusogenic Endogenous Retroviral Genes In Vivo. *PLoS One* [Internet]. 2015 Jul 8 [cited 2023 Feb 10];10(7). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26154387/>
 72. Bjerregard B, Ziomkiewicz I, Schulz A, Larsson LI. Syncytin-1 in differentiating human myoblasts: relationship to caveolin-3 and myogenin. *Cell Tissue Res* [Internet]. 2014 [cited 2023 Feb 10];357(1):355–62. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24902667/>
 73. Perron H, Germe R, Bernard C, Garcia-Montojo M, Deluen C, Farinelli L, et al. Human endogenous retrovirus type W envelope expression in blood and brain cells provides new insights into multiple sclerosis disease. *Mult Scler* [Internet]. 2012 Dec 1 [cited 2023 Feb 10];18(12):1721–36. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22457345/>
 74. Küry P, Nath A, Créange A, Dolei A, Marche P, Gold J, et al. Human Endogenous Retroviruses in Neurological Diseases. *Trends Mol Med* [Internet]. 2018 Apr 1 [cited 2023 Feb 10];24(4):379–94. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29551251/>
 75. Charvet B, Pierquin J, Brunel J, Gorter R, Quétard C, Horvat B, et al. Human Endogenous Retrovirus Type W Envelope from Multiple Sclerosis Demyelinating Lesions Shows Unique Solubility and Antigenic Characteristics. *Virol Sin* [Internet]. 2021 Oct 1 [cited 2023 Feb 10];36(5):1006–26. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33770381/>
 76. Perron H, Dougier-Reynaud HL, Lomparski C, Popa I, Firouzi R, Bertrand JB, et al. Human Endogenous Retrovirus Protein Activates Innate Immunity and Promotes Experimental Allergic Encephalomyelitis in Mice. *PLoS One* [Internet]. 2013 Dec 6 [cited 2023 Feb 10];8(12):e80128. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0080128>

77. Garcia-Montojo M, Dominguez-Mozo M, Arias-Leal A, Garcia-Martinez Á, de las Heras V, Casanova I, et al. The DNA Copy Number of Human Endogenous Retrovirus-W (MSRV-Type) Is Increased in Multiple Sclerosis Patients and Is Influenced by Gender and Disease Severity. *PLoS One* [Internet]. 2013 Jan 15 [cited 2023 Feb 10];8(1):e53623. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0053623>
78. Brodziak A, Ziółko E, Muc-Wierzgoń M, Nowakowska-Zajdel E, Kokot T, Klakla K. The role of human endogenous retroviruses in the pathogenesis of autoimmune diseases. *Med Sci Monit* [Internet]. 2012 [cited 2023 Feb 10];18(6):RA80. Available from: [/pmc/articles/PMC3560723/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23560723/)
79. Tovo PA, Rabbone I, Tinti D, Galliano I, Trada M, Daprà V, et al. Enhanced expression of human endogenous retroviruses in new-onset type 1 diabetes: Potential pathogenetic and therapeutic implications. *Autoimmunity* [Internet]. 2020 Jul 3 [cited 2023 Feb 10];53(5):283–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32586158/>
80. Curtin F, Bernard C, Levet S, Perron H, Porchet H, Médina J, et al. A new therapeutic approach for type 1 diabetes: Rationale for GNbAC1, an anti-HERV-W-Env monoclonal antibody. *Diabetes Obes Metab* [Internet]. 2018 Sep 1 [cited 2023 Feb 10];20(9):2075–84. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29749030/>
81. Duperray A, Barbe D, Raguenez G, Weksler BB, Romero IA, Couraud PO, et al. Inflammatory response of endothelial cells to a human endogenous retrovirus associated with multiple sclerosis is mediated by TLR4. *Int Immunol* [Internet]. 2015 Nov 1 [cited 2023 Feb 10];27(11):545–53. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25957268/>
82. Mameli G, Cossu D, Cocco E, Frau J, Marrosu MG, Niegowska M, et al. Epitopes of HERV-Wenv induce antigen-specific humoral immunity in multiple sclerosis patients. *J Neuroimmunol* [Internet]. 2015 Mar 15 [cited 2023 Feb 10];280:66–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25773158/>
83. Meier UC, Cipian RC, Karimi A, Ramasamy R, Middeldorp JM. Cumulative

- Roles for Epstein-Barr Virus, Human Endogenous Retroviruses, and Human Herpes Virus-6 in Driving an Inflammatory Cascade Underlying MS Pathogenesis. *Front Immunol* [Internet]. 2021 Nov 1 [cited 2023 Feb 10];12. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34790199/>
84. Arru G, Caggiu E, Leoni S, Mameli G, Pugliatti M, Sechi G Pietro, et al. Natalizumab modulates the humoral response against HERV-Wenv73-88 in a follow-up study of Multiple Sclerosis patients. *J Neurol Sci* [Internet]. 2015 Oct 15 [cited 2023 Feb 10];357(1–2):106–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26190523/>
85. Chabukswar S, Grandi N, Tramontano E. Prolonged activity of HERV-K(HML2) in Old World Monkeys accounts for recent integrations and novel recombinant variants. *Front Microbiol*. 2022 Dec 1;13:4803.
86. Golan M, Hizi A, Resau JH, Yaal-Hahoshen N, Reichman H, Keydar I, et al. Human endogenous retrovirus (HERV-K) reverse transcriptase as a breast cancer prognostic marker. *Neoplasia* [Internet]. 2008 [cited 2023 Feb 10];10(6):521–33. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18516289/>
87. Zhao J, Rycaj K, Geng S, Li M, Plummer JB, Yin B, et al. Expression of Human Endogenous Retrovirus Type K Envelope Protein is a Novel Candidate Prognostic Marker for Human Breast Cancer. *Genes Cancer* [Internet]. 2011 Sep [cited 2023 Feb 10];2(9):914–22. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22593804/>
88. Katoh I, Mírová A, Kurata S ichi, Murakami Y, Horikawa K, Nakakuki N, et al. Activation of the long terminal repeat of human endogenous retrovirus K by melanoma-specific transcription factor MITF-M. *Neoplasia* [Internet]. 2011 [cited 2023 Feb 10];13(11):1081–92. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22131883/>
89. Contreras-Galindo R, Almodóvar-Camacho S, González-Ramírez S, Lorenzo E, Yamamura Y. Short communication: Comparative longitudinal studies of HERV-K and HIV-1 RNA titers in HIV-1-infected patients receiving successful versus unsuccessful highly active antiretroviral

- therapy. *AIDS Res Hum Retroviruses* [Internet]. 2007 Sep [cited 2023 Feb 10];23(9):1083–6. Available from: <https://experts.umn.edu/en/publications/short-communication-comparative-longitudinal-studies-of-herv-k-an>
90. Nicolaidis AN. Chronic venous disease and the leukocyte-endothelium interaction: from symptoms to ulceration. *Angiology* [Internet]. 2005 [cited 2023 Feb 10];56 Suppl 1(SUPPL. 1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16193221/>
91. Raffetto JD. Pathophysiology of Chronic Venous Disease and Venous Ulcers. *Surg Clin North Am* [Internet]. 2018 Apr 1 [cited 2023 Feb 10];98(2):337–47. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29502775/>
92. Castro-Ferreira R, Cardoso R, Leite-Moreira A, Mansilha A. The Role of Endothelial Dysfunction and Inflammation in Chronic Venous Disease. *Ann Vasc Surg* [Internet]. 2018 Jan 1 [cited 2023 Feb 10];46:380–93. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28688874/>
93. Zamboni P, Spath P, Tisato V, Tessari M, Dalla Caneva P, Menegatti E, et al. Oscillatory flow suppression improves inflammation in chronic venous disease. *J Surg Res* [Internet]. 2016 Sep 1 [cited 2023 Feb 10];205(1):238–45. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27621026/>
94. Franceschi C, Bonafè M, Valensin S, Olivieri F, De Luca M, Ottaviani E, et al. Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann N Y Acad Sci* [Internet]. 2000 [cited 2023 Feb 10];908:244–54. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10911963/>

Anexos

Anexo 1- Aprovação do comitê de ética da Univerisidade Santo Amaro – UNISA.

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Perfil de expressão dos retrovírus endógenos K e W em pacientes com insuficiência venosa crônica

Pesquisador: KEVIN CEZAR NASCIMENTO SILVA

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 52571821.5.0000.0081

Instituição Proponente: OBRAS SOCIAIS E EDUCACIONAIS DE LUZ

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.152.962

Apresentação do Projeto:

- Idem a relatoria anterior.

Objetivo da Pesquisa:

- Idem a relatoria anterior.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

- Idem a relatoria anterior.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

- Idem a relatoria anterior.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

- Questionário - ok

- Carta de Anuência: assinado pela responsável técnica da clínica.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Endereço: Rua Prof Enéas de Siqueira Neto, 340
Bairro: Jardim das Imbuías **CEP:** 02.450-000
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2141-8687 **E-mail:** pesquisaunisa@unisa.br

Continuação do Parecer: 5.152.962

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMACOES_BASICAS_DO_PROJETO_1805929.pdf	30/11/2021 12:37:33		Aceito
Outros	carta_ao_cep1.docx	30/11/2021 12:37:19	Luiz Henrique da Silva Nali	Aceito
Outros	Carta_anuencia_nova.pdf	30/11/2021 12:31:17	Luiz Henrique da Silva Nali	Aceito
Outros	Questionario_HERV_novo.docx	30/11/2021 12:30:19	Luiz Henrique da Silva Nali	Aceito
Outros	Termo_de_compromisso_confidencialidade_novo.pdf	19/11/2021 12:16:45	Luiz Henrique da Silva Nali	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_MODELO_UNISA_KEVIN_ajustado.docx	19/11/2021 12:15:10	Luiz Henrique da Silva Nali	Aceito
Folha de Rosto	folhaRosto_Kevin.pdf	14/10/2021 15:46:59	Luiz Henrique da Silva Nali	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Perfil_de_Expressao_dos_Retrovirus_Endogenos_K_e_W_em_pacientes_com_Insuficiencia_Venosa_Cronica.docx	13/10/2021 16:50:50	Luiz Henrique da Silva Nali	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 08 de Dezembro de 2021

Assinado por:
Ana Paula Ribeiro
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Profª Enéas de Siqueira Neto, 340
Bairro: Jardim das Imbuías CEP: 02.450-000
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)2141-8687 E-mail: pesquisaunisa@unisa.br

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO

PROTOCOLO: EXPRESSÃO DE RETROVÍRUS ENDÓGENO HUMANOS EM PACIENTES COM INSUFICIÊNCIA VENOSA CRÔNICA

Estes esclarecimentos estão sendo apresentados para solicitar sua participação livre e voluntária no projeto **EXPRESSÃO DE RETROVÍRUS ENDÓGENO HUMANOS EM PACIENTES COM INSUFICIÊNCIA VENOSA CRÔNICA** do programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Santo Amaro – UNISA, que será realizado pelo pesquisador **Kevin Cezar Nascimento Silva** como dissertação para obtenção do título de mestre sob orientação do prof. Dr. **Luiz Henrique da Silva Nali**.

1. Descrição do estudo e objetivos

Estamos realizando um estudo de caráter observacional em pacientes com insuficiência venosa crônica com o objetivo de observar a manifestação de um vírus que se encontra inserido no DNA humano, ao qual, o denominamos como retrovírus endógenos humanos, em pacientes da zona sul de São Paulo. Gostaríamos de observar e comparar qual frequência esses vírus se manifestam e analisar as diferentes famílias presentes, em pacientes com insuficiência venosa crônica, para melhor compreender como o nosso organismo responde a essa infecção. Vale destacar que a sua participação ou não, não acarretará nenhuma interferência em seu atendimento médico ou em seu tratamento. Sendo assim, o objetivo deste termo é convidá-lo a participar do nosso estudo.

2. Procedimentos da pesquisa

Após ter sido esclarecido sobre o estudo, você poderá ou não participar do estudo. Caso aceite, você será solicitado a assinar esse termo de consentimento Livre e Esclarecido, uma cópia deste documento lhe será fornecida. O seu acompanhamento médico não será afetado no decorrer do estudo, além disso, você poderá optar por não participar mais do estudo a qualquer momento, sem que quaisquer implicações para si. Caso aceite participar, coletaremos uma amostra de sangue. O material biológico coletado durante esse projeto será utilizado apenas para o objetivo desse estudo.

3. Benéficos e obrigações do participante

Você não terá despesas pessoais por participar deste estudo, e nem quaisquer obrigações. Também não haverá compensação financeira por sua participação. A princípio, este estudo não trará nenhum benefício imediato para você. Entretanto, as informações obtidas nesse estudo poderão servir de base para a compreensão da expressão

do retrovírus endógeno humano na população em que se encontram com insuficiência venosa crônica e a ajudar a compreender melhor o curso da doença.

4. Desconfortos e riscos

Por ser um estudo observacional, ou seja, sem quaisquer tipos de intervenções, esse estudo não fornece riscos aos voluntários. A coleta de sangue é pouco invasiva e oferece riscos mínimos, onde há um desconforto por conta da coleta e pode, no máximo, gerar alguns hematomas.

5. Garantia de acesso aos pesquisadores

É garantido o acesso, em qualquer etapa do estudo, aos profissionais responsáveis pela pesquisa para **esclarecimento de eventuais dúvidas, ou informações** sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores.

Os pesquisadores responsáveis são o biólogo **Kevin Cezar Nascimento Silva** e **prof. Dr. Luiz Henrique da Silva Nali**, podem ser encontrados na Universidade Santo Amaro no endereço Rua Prof. Enéas de Siqueira Neto, 340, Jardim das Imbuías, SP, campus I, telefone 11 2141-8702 no setor Pós-graduação em Ciências da Saúde.

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o comitê de Ética em pesquisas (CEP-UNISA) – Rua prof. Enéas de Siqueira Neto, 340, Jardim das Imbuías, SP – tel.: 2141-8687.

Em caso de dano pessoal, diretamente relacionado aos procedimentos deste estudo (nexo causal comprovado), a qualquer tempo, fica **assegurado ao participante o respeito a seus direitos legais**, bem como procurar obter **indenizações** por danos eventuais.

Uma via deste Termo de Consentimento ficará em seu poder.

São Paulo, ____/____/____

(Kevin Cezar Nascimento Silva)

(Prof Dr. Luiz Henrique Da Silva
Nali)

Se você concordar em participar desta pesquisa assine no espaço determinado abaixo e coloque seu nome e o nº de seu documento de identificação.

Nome: (do participante):

Doc. Identificação:

Ass:

Nome: (do representante legal)

Doc. Identificação:
Nível de representação: (genitor, tutor, curador, procurador.)
Nome do participante:

Declaro (amos) que obtive (mos) de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste participante (ou do representante legal deste participante) para a participação neste estudo, conforme preconiza a Resolução CNS 466, de 12 de dezembro de 2012, IV.3 a 6.

Assinatura do pesquisador responsável pelo estudo Data / /

Ficha Inicial

Nº

TENTE PREENCHER TODOS OS CAMPOS ABAIXO, CASO NÃO SAIBA RESPONDER ALGUM DELES, NÃO SE PREOCUPE, COVERSAREMOS PESSOALMENTE

DATA: _____ IDADE: _____

ETINIA: NEGRA PARDA BRANCA ORIENTAL INDIGENA

ANO DE DIAGNÓSTICO DA DOENÇA: _____

JÁ REALIZOU ALGUMA CIRURGIA RELACIONADA A DOENÇA VENOSA VENOSA CRÔNICA?

UTILIZA DE ALGUM MEDICAMENTO PARA DOENÇA VENOSA CRÔNICA?

HISTÓRICO FAMILIAR DE DOENÇAS AUTOIMUNES?

POSSUI ALGUMA OUTRA DOENÇA?

ESCOLARIDADE:

Fundamental Incompleto

Fundamental Completo

Ensino Médio Incompleto

Ensino Médio Completo

Superior Incompleto

Superior Completo

Pós Graduação Incompleto

Pós Graduação Completo

PROFISSÃO OU ULTIMA PROFISSÃO:

OBSERVAÇÕES RELEVANTES: