

**UNIVERSIDADE SANTO AMARO**  
**Programa de Mestrado em Ciências da Saúde**

**Bruna Reimberg Flose**

**PERFIL DE EXPRESSÃO DE RETROVÍRUS ENDÓGENOS  
HUMANOS E RESPOSTA HUMORAL ANTI HERV-K E W EM  
PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE**

**São Paulo**

**2023**

**Bruna Reimberg Flose**

**PERFIL DE EXPRESSÃO DE RETROVÍRUS ENDÓGENOS  
HUMANOS E RESPOSTA HUMORAL ANTI HERV-K E W EM  
PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE**

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. Marina Tiemi Shio

**São Paulo**

**2023**

F664p Flose, Bruna Reimberg.

Perfil de expressão de retrovírus endógenos humanos e resposta humoral anti-HERV-K e HERV-W em pacientes com artrite reumatoide. — São Paulo, 2023.

75 p.: il., color.

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

Orientador: Prof. Me. Dr. Luiz Henrique da Silva Nali.  
Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Me. Dr.<sup>a</sup> Marina Tiemi Shio.

1. Autoimunidade. 2. Bioinformática. 3. ERV. I. Nali, Luiz Henrique da Silva, orient. II. Shio, Marina Tiemi, coorient. III. Universidade Santo Amaro. IV. Título.

**BRUNA REIMBERG FLOSE**

**PERFIL DE EXPRESSÃO DE RETROVÍRUS ENDÓGENOS  
HUMANOS E RESPOSTA HUMORAL ANTI HERV-K E W EM  
PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE**

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. Marina Tiemi Shio

São Paulo 24 de Janeiro de 2023

**Banca Examinadora**

.....

Prof. Dra. Camila Romano

.....

Prof. Dr. André Bachi

.....

Prof. Dr. Luiz Henrique da Silva Nali

**Conceito Final:** \_\_\_\_\_

Dedico esse trabalho a minha família, principalmente os meus pais João Carlos Flose e Elizabete Christe Reimberg Flose.

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de agradecer meus orientadores Prof. Dr. Luiz Henrique da Silva Nali e a Prof. Dra. Marina Tiemi Shio por toda dedicação e apoio durante esses dois anos, além de todo o incentivo e aprendizado, sem dúvida foram de extrema importância para que esse projeto fosse desenvolvido.

Queria agradecer também a minha família, principalmente meus pais, que sempre me apoiaram em tudo até esse momento e tornaram isso possível, sem esse apoio eu não estaria aqui. Gostaria de agradecer o meu namorado por todo apoio e paciência

Gostaria de agradecer também os meus colegas de laboratório que foram fundamentais para que eu conseguisse realizar todas as etapas desse projeto, da coleta a realização dos resultados. Agradecer principalmente o aluno de iniciação científica vinculado ao projeto Samuel Nascimento Santos.

Gostaria de agradecer a Dra. Maria Aparecida Juliano, por ter cedido os peptídeos usados no projeto e ao Dr. Thiago Souza Onofre que me auxiliou durante a realização dos resultados de bioinformática. Além do Dr. Marcelo Corral que me ensinou a forma de analisar os resultados obtidos no ELISA indireto.

Gostaria de agradecer também Prof. Dra. Ana Paula Ribeiro e Prof. Dra. Virginia Trevisani que foram fundamentais para a captação de voluntários com Artrite Reumatoide no ambulatório da Universidade Santo Amaro (UNISA).

*“Nossa maior fraqueza está em desistir. A maneira mais segura de ter sucesso é sempre tentar mais uma vez”  
Thomas Edison.*

## RESUMO

**Introdução:** Os Retrovírus Endógenos Humanos (HERVs) são vírus que infectaram células germinativas dos nossos ancestrais há milhões de anos atrás. Esses vírus se integraram e se fixaram no genoma humano que chega a ser composto de 8% de sequências dos HERVs. Esses vírus têm sido associados com um possível papel na patogênese de doenças autoimunes, em especial a Esclerose Múltipla (EM) e em Lúpus Eritematoso Sistêmico, mas pouco se tem estudado na Artrite Reumatoide (AR). A AR não apresenta etiologia definida e os pacientes acometidos pela doença podem apresentar quadros graves e consideravelmente debilitantes. Desta forma, o objetivo desse estudo foi avaliar a expressão desses HERVs (em especial HERVs da família K e W) e uma possível resposta humoral anti HERV em pacientes com AR.

**Métodos:** As plataformas Genbank e expasy foram utilizados para selecionar os peptídeos com similaridade acima de 50%, comparando as sequências do HERV (K e W) com componentes articulares e a proteína Mielina Oligodendrócito Glicoproteína (MOG), componente da bainha de mielina e está relacionada a EM. Os peptídeos sintetizados foram utilizados no ensaio de ELISA para anticorpos anti-HERV-K e W. Para o ELISA, foram utilizados soros de pacientes com esclerose múltipla - EM (n= 31), com Artrite Reumatoide - AR (n= 31) e doadores saudáveis sem histórico de doenças autoimunes (n= 54). Os leucócitos dos pacientes com Artrite Reumatoide (n= 31) e doadores saudáveis (n= 31) foram processados e submetido à análise por PCR em Tempo Real para investigação da expressão de HERV-K (HML-1) e HERV-W (HERV-17) por quantificação relativa pelo método de  $-2\Delta\Delta Ct$ .

**Resultados:** Foram selecionados e sintetizados 2 peptídeos (pep) referentes ao HERV-W e 8 peptídeos de HERV-K. A validação do ELISA indireto com soros de pacientes com EM mostrou que houve imunoreatividade para todos os peptídeos comparados com os controles saudáveis ( $p < 0,0001$ ). Os peps 3 (HERV-W), 6 e 8 (HERV-K) apresentaram os maiores valores de sensibilidade e especificidade, bem como a acurácia diagnóstica apresentando 93,55%, 93,55% e 96,77%, respectivamente. Os cut off variaram de 0,08975 (W Pep 1) a 0,1758 (K Pep 10), valor usado para determinar quais amostras eram positivas e quais amostras eram negativas. Estes valores de corte foram utilizados para calcular o índice ELISA - IE, no qual divide-se a densidade óptica pelo cut off e os valores acima de 1 são considerados positivos. Surpreendentemente, os IE dos controles saudáveis deram mais positivos que os pacientes com AR, chegando

a ser, respectivamente, 16,13% vs 3,23% para o pep 1, 29,03 vs 0,00% para os peps 2 e 9 ; 64,52% vs 16,13% para o pep 4, 25,81 vs 0,0% para o pep 7, sendo todos estes estatisticamente diferentes ( $p < 0,008$ ). O PCR mostrou uma expressão em média 2 vezes maior no HERV-W em comparação com o grupo controle e o HERV-K não teve diferença significativa em relação ao grupo controle. **Conclusão:** Os pacientes com artrite reumatoide tiveram uma menor imunoreatividade aos peptídeos relacionados ao HERV-W e K em relação aos doadores saudáveis sem histórico de doenças autoimunes. Com os primers selecionados foi possível verificar a expressão 2 vezes maior de HERV-W, e uma expressão basal de HERV-K, nas amostras com pacientes com artrite reumatoide em comparação ao controle.

**Palavras chaves:** Autoimunidade, bioinformática, padronização, Retrovírus Endógenos Humanos.

## ABSTRACT

**Introduction:** Human Endogenous Retroviruses (HERVs) are viruses that infected germ cells of our ancestors millions of years ago. These viruses integrated and settled in the human genome, which is composed of 8% of HERV sequences. These viruses have been associated with a possible role in the pathogenesis of autoimmune diseases, especially Multiple Sclerosis (MS) and Systemic Lupus Erythematosus, but little has been studied in Rheumatoid Arthritis (RA). RA has no defined etiology and patients affected by the disease may have severe and considerably debilitating conditions. Thus, the aim of this study was to evaluate the expression of these HERVs (especially HERVs of the K and W family) and a possible anti-HERV humoral response in patients with RA. **Methods:** Genbank and expasy platforms were used to select peptides with similarity above 50%, comparing HERV sequences (K and W) with joint components and the protein Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein (MOG), a component of the myelin sheath and is related to MS. The synthesized peptides were used in the ELISA assay for anti-HERV-K and W antibodies. For the ELISA, sera from patients with multiple sclerosis - MS (n= 31), with Rheumatoid Arthritis - RA (n= 31) and healthy donors with no history of autoimmune diseases (n= 54). Leukocytes from patients with Rheumatoid Arthritis (n= 31) and healthy donors (n= 31) were processed and submitted to analysis by Real Time PCR to investigate the expression of HERV-K (HML-1) and HERV-W (HERV-W -17) by relative quantification by the  $-2\Delta\Delta C_t$  method. **Results:** Two peptides (pep) related to HERV-W and 8 peptides of HERV-K were selected and synthesized. Validation of the indirect ELISA with sera from patients with MS showed that there was immunoreactivity for all peptides compared to healthy controls ( $p < 0.0001$ ). Peps 3 (HERV-W), 6 and 8 (HERV-K) showed the highest values of sensitivity and specificity, as well as diagnostic accuracy with 93.55%, 93.55% and 96.77%, respectively. Cut offs ranged from 0.08975 (W Pep 1) to 0.1758 (K Pep 10), a value used to determine which samples were positive and which samples were negative. These cutoff values were used to calculate the ELISA - IE index, in which the optical density is divided by the cutoff and values above 1 are considered positive. Surprisingly, the EI of the healthy controls were more positive than the patients with RA, reaching respectively 16.13% vs 3.23% for pep 1, 29.03 vs 0.00% for pep 2 and 9; 64.52% vs 16.13% for pep 4, 25.81 vs 0.0% for pep 7, all of which are statistically different ( $p < 0.008$ ). PCR showed an expression on average 2 times higher in HERV-

W compared to the control group and HERV-K had no significant difference in relation to the control group. **Conclusion:** Patients with rheumatoid arthritis had a lower immunoreactivity to HERV-W and K-related peptides compared to healthy donors without a history of autoimmune diseases. With the selected primers, it was possible to verify a 2-fold higher expression of HERV-W, and a basal expression of HERV-K, in samples with patients with rheumatoid arthritis compared to the control.

**Keywords:** Autoimmunity, bioinformatics, standardization, Human Endogenous Retroviruses.

## Lista de Figuras

Figura 1: Resultado de TMHMM do HERV-K .....	38
Figura 2: Resultado de TMHMM do HERV-W.....	38
Figura 3: Resultados Signal P-5,0 HERV-K.....	39
Figura 4: Resultados Signal P-5,0 HERV-W.....	40
Figura 5: Figura 5: Resultado de TMpred do HERV-K.....	41
Figura 6: Resultado de TMpred do HERV-W.....	41
Figura 7: Diferença entre o pH.....	43
Figura 8: Diferença entre os bloqueios.....	44
Figura 9: Diferença entre as diluições nos diferentes peptídeos.....	45
Figura 10: Curvas ROC da técnica ELISA .....	49
Figura 11: Diferença do grupo controle com o grupo com esclerose .....	50
Figura 12: Comparação do grupo controle com o grupo AR HERV-W .....	52
Figura 13: Comparação do grupo controle com o grupo AR HERV-K.....	53
Figura 14: Amplificação do gene GAPDH .....	55
Figura 15: Figura 11: Curva de melting do gene GAPDH .....	55
Figura 16: PCR em tempo real para HERV-W.....	56
Figura 17: Comparação do grupo com AR e do grupo controle para HERV-W ( $p < 0,01$ ) .....	56
Figura 18: PCR em tempo real para HERV-K.....	57

Figura 19: Comparação do grupo com AR e do grupo controle para HERV-K.....57

## Lista de Tabelas

Tabela 1: Primers que foram utilizados em ensaios de PCR em tempo real .....	32
Tabela 2: Volume dos reagentes utilizados nas reações de PCR .....	33
Tabela 3: Comparação das proteínas dos HERVs K e W com as proteínas próprias do organismo e a identificação compartilhadas entre elas.....	35
Tabela 4: Peptídeos da comparação entre o HERV-W e o precursor da isoforma 1 da cadeia alfa-1 (II) do colágeno.....	36
Tabela 5: Peptídeos da comparação entre o HERV-W e o Precursor da proteína da matriz oligomérica da cartilagem.....	36
Tabela 6: Peptídeos da comparação entre o HERV-K e o precursor da isoforma 1 da cadeia alfa-1 (II) do colágeno.....	37
Tabela 7: Peptídeos da comparação entre o HERV-W e o Precursor da proteína da matriz oligomérica da cartilagem.....	37
Tabela 8: Tabela dos peptídeos que foram sintetizados.....	42
Tabela 9: Comparação entre a MOG e os peptídeos sintetizados.....	46
Tabela 10: Parâmetros de diagnósticos encontrados dos diferentes peptídeos realizados pela técnica de ELISA.....	48
Tabela 11: Respostas do questionário dos voluntários com artrite reumatoide.....	51
Tabela 12: Total de positivos em cada peptídeo nos diferentes grupos.....	54

## Lista de Abreviaturas

AR	Artrite Reumatoide
BSA	Albumina Sérica Bovina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ELA	Esclerose Lateral Amiotrófica
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
ERV	Retrovírus Endógeno
GAPDH	Gliceraldeídp 3 fosfato desidrogenase
H <sub>2</sub> O	Água
HCL	Ácido Clorídrico
HERVs	Retrovírus endógenos humanos
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HTLV	Vírus Linfotrópicos de Células T Humanas
IE	Índice ELISA
LTR	Repetição Terminal Longa
MLV	Vírus da Leucemia Murina
MOG	Mielina Oligodendrócito Glicoproteína
mRNAs	RNA mensageiro
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information (NCBI)</i>
PBS	<i>Primer Binding Site</i>
PBS	Tampão Fosfato Salino
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PEP	Peptídeo
RNA	Ácido Ribonucleico

ROC	<i>Receiver Operating Characteristic</i>
SFB	Soro Fetal Bovino
SignalP	Signal peptide and cleavage sites in gram+, gram- and eukaryotic amino acid sequences
TLR4	Receptor Toll Like 4
TMHMM	Prediction of transmembrane helices in proteins
TMpred	Prediction of Transmembrane Regions and Orientation
tRNA	RNA transportador
UNISA	Universidade Santo Amaro

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	19
1.1 OS RETROVÍRUS ENDÓGENOS HUMANOS (HERVs) .....	19
1.2 CLASSIFICAÇÃO DOS HERVs .....	20
1.3 HERVs NO GENOMA HUMANO .....	21
1.4 PAPEL DOS HERVs NA FISIOLOGIA HUMANA.....	21
1.5 PAPEL DOS HERVs EM DOENÇAS .....	22
1.5.1 CÂNCER.....	22
1.5.2 HIV.....	23
1.5.3 DOENÇAS AUTOIMUNES .....	24
1.6 ARTRITE REUMATOIDE .....	24
1.7 HERVs NA ARTRITE REUMATOIDE.....	26
2. JUSTIFICATIVA .....	28
3. OBJETIVOS .....	29
3.1 OBJETIVO GERAL.....	29
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
4. MÉTODOS .....	30
4.1 PACIENTE.....	30
4.2 LOGÍSTICA LABORATORIAL .....	31

4.3 OBTENÇÃO E PURIFICAÇÃO DO RNA.....	31
4.4 ANÁLISE PARA SÍNTESE DE PEPTÍDEOS .....	32
4.5 DETECÇÃO E NÍVEL DE EXPRESSÃO DOS HERVS .....	32
4.6 ELISA INDIRETO PARA A DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-HERVs.....	33
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	34
5. RESULTADOS .....	35
5.1 ANÁLISE <i>IN-SILICO</i> .....	35
5.2 SELEÇÃO DOS PEPTÍDEOS.....	37
5.3 PADRONIZAÇÃO DO ELISA INDIRETO.....	42
5.4 VALIDAÇÃO DO ELISA COM SOROS DE PACIENTES COM ESCLEROSE MULTIPLA .....	46
5.5 APLICAÇÃO DO ELISA.....	51
5.6 PCR EM TEMPO REAL.....	54
5.6.1 GAPDH .....	54
5.6.2 HERV-W.....	55
5.6.3 HERV-K .....	57
6. DISCUSSÃO .....	58
7. CONCLUSÃO.....	63
REFERÊNCIAS.....	64
ANEXOS .....	71

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 OS RETROVÍRUS ENDÓGENOS HUMANOS (HERVs)

O genoma humano é formado de 8% de elementos retrovirais, chamados de Retrovírus endógenos humanos (HERVs), esses elementos estão presentes nos humanos devido aos antigos eventos de infecção e integração retroviral nas células germinativas de nossos ancestrais. Essa integração ocorreu em vários momentos ao longo dos anos e da evolução dos vertebrados, há estimativas de que essas integrações tenham ocorrido há mais de 100 milhões de anos em alguns casos.<sup>1</sup> Quando houve a incorporação inicial no genoma hospedeiro, os HERVs, ainda em sua forma de replicação ativa, foram transmitidos de forma horizontal, porém posteriormente passaram a ser herdados de forma mendeliana (transmissão hereditária), além dos saltos dentro do genoma. Além disso, o HERV-K também foi submetido à mutações o que acabou impedindo a expressão de alguns ou de todos os genes provirais, como a presença de stop códons ou perda parcial dos genes.<sup>2</sup>

O primeiro Retrovírus Endógeno (VER) foi relatado em 1981 por Martin, MA. e colaboradores, usando sondas contra vírus da leucemia murina (MLV) em tecido humano.<sup>3</sup> Após essa descoberta vários outros grupos de HERVs foram descobertos no genoma humano. De todos os retrovírus endógenos humanos descobertos, o grupo denominado HERV-K é o grupo que foi adquirido mais recentemente e por consequência o mais transcricionalmente ativo, uma vez que houve um menor acúmulo de mutações no decorrer do tempo em comparação a outros grupos de HERV.<sup>4</sup> Esse grupo de HERV desempenham funções biológicas na fisiologia humana, muito embora seus genes estejam em sua maioria silenciados na maioria dos tipos de células em adultos saudáveis, mas ainda assim sua expressão pode ser mediada por alguns fenômenos intrínsecos e extrínsecos e que podem ser associados a vários tipos de câncer, transtornos neurodegenerativos, como esclerose lateral amiotrófica (ELA) e pode ser associado à imunopatologia em algumas doenças autoimunes como no caso da artrite reumatoide (AR).<sup>5</sup>

Os retrovírus fazem parte de uma família bem diversificada e amplamente distribuída de vírus RNA, que possuem a capacidade de realizar a transcrição reversa transformando o seu RNA em DNA. Esses vírus podem se apresentar de forma

exógenas e endógenas, os retrovírus exógenos permanecem infecciosos e podem ser transmitidos de forma horizontal entre indivíduos, já os retrovírus endógenos (ERVs) acabaram sendo incorporados pelo genoma e são herdados. A família viral *Retroviridae* é dividida entre os que possuem genoma simples (retrovírus alfa, beta, gama e epsilon), que contêm genes para as poliproteínas estruturais e funcionais Gag, Pro, Pol e Env, ou genomas complexos (lentivírus, deltaretrovírus e spumavírus).<sup>6</sup>

Existem duas explicações que são aceitas sobre os principais mecanismos utilizados para os ERVs se proliferarem nos genomas: reinfecção germinal e retrotransposição. A primeira consiste em um vírus endogenizado que pode se inserir diretamente em uma célula germinativa por meio da fase de replicação viral, já a retrotransposição consiste em um "modelo de gene mestre" no qual existem apenas alguns elementos virais ativos/funcionais, e por isso eles podem produzir muitas cópias independentes dentro do genoma. Esses mecanismos poderiam explicar a origem de muitas linhagens ERV com alto número de cópia, e há evidências de que a grande maioria dos HERVs emergiu após repetida duplicação de *locus* único em diferentes estágios na evolução dos primatas.<sup>4,6</sup>

## 1.2 CLASSIFICAÇÃO DOS HERVs

Antigamente a classificação do ERV baseava-se principalmente na similaridade sequências/genomas por meio da hibridização da sonda, análise de sequência e análise da transcriptase reversa. A utilização de ferramentas bioinformáticas para a detecção de elementos retrovirais em genomas vertebrados, possibilitou uma análise mais detalhada. Além disso, houve também utilização das ferramentas de análise molecular e análise filogenética, para uma classificação de ERV detalhada com base na relação evolutiva dos genes virais, considerado hoje em dia como o método padrão para classificação.<sup>4,6</sup> Os grupos de HERV são separados e identificados por letras de acordo com o aminoácido transportado pelo tRNA humano que vai se ligar ao sítio de vinculação de primer (PBS – *primer binding site*) durante a transcrição reversa.<sup>7</sup>

O grupo mais bem caracterizado de ERV são os HERVs, que inicialmente não poderiam ser diferenciados de outros ERVs por meio das propriedades estruturais ou até mesmo por meio do seu comportamento biológico e evolutivo. Historicamente houve uma separação dos HERVs sob a hipótese de que eles eram exclusividade

humana, mas com o passar do tempo foi possível observar e concluir que essa suposição estava equivocada, pois os HERVs também foram descritos em macacos e em outras espécies de mamíferos, apesar disso ainda se usa um H de "humano" na classificação ERV.<sup>6</sup> Eles são distribuídos em três grupos *gama-like*, *beta-like*, *epsilon-like* e *spuma-like* ERV.<sup>4,6</sup> A família K (HERV-K) compreende provirus completos e incompletos em humanos e é altamente conservada em macacos do Velho Mundo.<sup>9</sup>

### 1.3 HERVs NO GENOMA HUMANO

Os HERVs são formados por sequências de DNA de origem retroviral que foram adquiridos durante o processo de evolução por meio da integração dos retrovírus exógenos, existem poucos indícios que esses vírus possam ser transmitidos de maneira horizontal.<sup>4,8</sup> A classificação dos HERVs foi realizada por meio de um sistema de nomenclatura revisado, que foi introduzido pelo Comitê de Nomenclatura do Genoma da Organização do Genoma Humano. Eles são separados em três classes de acordo com sua similaridade com membros exógenos: classe I (semelhante a *gammaretrovirus* e *epsilonretrovirus*), classe II (semelhante a *betaretrovirus*) e classe III (semelhante a *spumaretrovirus*).

Essa classificação é feita se baseando nas relações filogenéticas entre os diferentes grupos, considerando acima de tudo o gene *pol* altamente conservado, além das características estruturais.<sup>10</sup> Os retrovírus endógenos e elementos retrovirais estão sendo associados a diversas atividades fisiológicas e a uma ampla variedade de doenças como câncer, distúrbios imunológicos e doenças neurodegenerativas.<sup>4</sup>

### 1.4 PAPEL DOS HERVs NA FISILOGIA HUMANA

Os HERVs possuem papel importante na fisiologia humana, isso porque um ou mais HERVs foram descritos em estudos de relação gênica na placenta e em células-tronco embrionárias.<sup>11,12</sup> Os HERVs acumularam uma série de mutações no decorrer da evolução humana. A grande maioria dos HERVs se encontra incompletos ou silenciados, com a presença de um stop códon por exemplo. Além disso, muitos dos genes virais encontram-se isolados e espalhados pelo genoma, e não é possível encontrar o genoma completo retroviral no genoma dos humanos atualmente. Apesar

do acúmulo sucessivo de mutações, o vírion pode ser formado através da combinação da expressão de seus genes oriundos de diferentes regiões do genoma humano. E de forma interessante os HERVs podem atuar na fisiologia humana de duas principais maneiras, com a expressão direta de suas proteínas virais ou com a ação promotora de suas LTRs presentes em genes adjacentes.<sup>7,8</sup>

O HERV-W tem um papel central na placentação como descrito Sha *et. al*, este HERV está relacionado com a sincitina-1 que auxilia as fusões célula-célula de citotrofoblastos em sinciciotrofoblastos. Além disso, ele contém uma região imunossupressora que pode prevenir a rejeição de um feto semi-alogênico pelo sistema imunológico da mãe.<sup>11,12</sup>

A inserção de HERVs no DNA cromossômico acabou influenciando de várias maneiras os genes do hospedeiro durante a evolução. Além de participar da evolução do genoma, HERVs e LTRs solitários suprimidos em processos biológicos acabam atuando no mecanismo de transcrição extra de genes celulares. Há indícios que a alta ativação de LTR possa desencadear efeitos patológicos relacionados ao ciclo celular, mas também um desbalanço da tolerância imune.<sup>13</sup>

## **1.5 PAPEL DOS HERVs EM DOENÇAS**

Os HERVs podem ser associados a inúmeras doenças, incluindo doenças infecciosas (HIV), doenças autoimunes (artrite reumatoide) e tumores malignos, sendo possível observar uma expressão elevada de HERVs.

### **1.5.1 CÂNCER**

Alguns estudos mostraram que em alguns estágios de câncer existe uma expressão de HERV, como por exemplo o de mama e carcinoma hepatocelular. Isso ocorre devido a capacidade dos HERVs de ativar/alterar múltiplas vias de sinalização oncogênica, resultando na proliferação de células cancerígenas e acabam suprimindo sua diferenciação e apoptose. Essa expressão mais elevada em tecidos comprometidos pode estar relacionada aos genes estruturais do HERV, que são expressos em diferentes níveis ou variantes, isso inclui mRNAs de comprimento completo, mRNAs emendados, RNAs não codificados, proteínas intactas e proteínas truncadas.

No câncer, as sequências provirais intactas ativadas podem ser transcritas em mRNAs de comprimento completo codificando e proteínas intactas. O splicing de RNA, também tem um papel importante na regulação pós-transcricional da expressão genética, porque ele consiste na retirada dos íntrons do RNA precursor, gerando um mRNA maduro e funcional. Sendo assim a expressão de HERV pode vir a desencadear células tumorais a se desenvolverem e se multiplicarem.<sup>14,15</sup>

Um estudo realizado por Cherkasova E. e colaboradores mostrou que os pacientes com câncer renal expressaram HERV-E e o sistema imunológico reconheceu este HERV e por este motivo seria possível a utilização de antígenos derivados do envelope do HERV-E restrito ao tumor, como alvos para a imunoterapia baseada em células T para o câncer renal. Isso porque o sistema imunológico acabaria combatendo as células que expressam o HERV-E, devido a já conhecer os antígenos que foram utilizados e assim por meio desse mecanismo acabaria também reconhecendo e combatendo as células carcinogênicas.<sup>15</sup>

### **1.5.2 HIV**

O HIV pode induzir a transcrição do HERV, isso acaba ocasionando à expressão de proteína HERV induzida. Um estudo realizado por Van der Kuyl, mostrou que as proteínas de HERV possuem a capacidade de complementar vírions defeituosos do HIV, assim como o HIV possui a capacidade de induzir transcrições de HERV, não está bem elucidado se a expressão dos HERVs possui alguma influência negativa, neutra ou até mesmo positiva na progressão da AIDS. Porém, existe uma descrição de um efeito positivo pela expressão específica de HERVs em pacientes cronicamente infectados pelo HIV, foi possível detectar presença de peptídeos derivados de HERV para células T CD8, isso poderia ser um novo mecanismo para controlar a replicação do HIV e resultar em uma baixa carga viral plasmática. O HIV tem mecanismos de escape ao sistema imunológico, as células T CD8 acabam não identificando o HIV dentro das células infectadas, mas por conta da presença do HERV as células T CD8 identificam o HERV e acabam eliminando as células infectadas pelo HIV, sendo assim o HIV perde um mecanismo de escape.<sup>16</sup>

### 1.5.3 DOENÇAS AUTOIMUNES

Na década de 1990, alguns pesquisadores perceberam que os pacientes que possuíam Esclerose Múltipla poderiam apresentar vírion com atividade de transcriptase reversa. Mas ao realizarem um ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção de antígenos específicos para HIV-1 e HTLV-1, esses pacientes não possuíam resposta aparente para esses vírus, além disso, também não apresentavam anticorpos contra esses dois vírus.<sup>17,18,19</sup>

Existem evidências que associam os HERVs as doenças autoimunes, essa ideia surgiu da descoberta de anticorpos antiretrovirais no soro de alguns pacientes ou da presença de antígenos de HERV em órgãos acometidos pelas doenças autoimunes. Seguindo esse modelo alguns estudos utilizaram primers retrovirais degenerados para amplificar sequências conservadas da região pol dos retrovírus, com isso foi possível perceber que os produtos que foram amplificados eram homólogos aos HERVs.<sup>20,21</sup>

Existem vários estudos que estão procurando evidências da atuação dos HERVs nas doenças autoimunes, podemos citar o caso do Lúpus Eritematoso Sistêmico, que é uma doença inflamatória que ocorre quando o sistema imunológico ataca os tecidos normais do próprio organismo.<sup>20,21,22</sup> O HERV foi associado a doença, após a observação da expressão aumentada do mRNA do HERV em pacientes com o Lúpus Eritematoso Sistêmico, também houve a detecção de anticorpos circulantes específicos para os elementos do HERV.<sup>1</sup>

Esclerose múltipla (EM) é uma doença desmielinizante, crônica e neurodegenerativa, sem uma etiologia definida, tendo fatores ambientais e genéticos envolvidos.<sup>23</sup> Existem estudos que mostraram um aumento da proteína env do HERV-W em pacientes com EM, além disso mostram uma super expressão do HERV-W nesses pacientes.<sup>24,25</sup>

### 1.6 ARTRITE REUMATOIDE

A artrite reumatoide (AR) é uma doença inflamatória que envolve pequenas e grandes articulações das extremidades (dedos das mãos e pés, punhos, ombros,

joelhos e tornozelos). É caracterizada por inflamação da sinóvia e está ligada à destruição da cartilagem articular e do osso, o que indica uma resposta imune local.<sup>26</sup>

A prevalência da AR é cerca 0,22%-1% da população mundial adulta, em todos os grupos étnicos, tem predomino entre as mulheres (duas a três vezes em relação ao gênero masculino).<sup>27</sup> Embora existam registros em todas as faixas etárias, as condições ocorrem principalmente em pacientes entre 40 e 60 anos.<sup>28</sup> Um estudo mais recente de 2021 mostrou que a prevalência na América do sul é 0,48%, sendo que no Brasil ela é de 0,22%.<sup>27</sup>

Ela foi considerada uma doença autoimune impulsionada por células B que produzem anti-IgG . Um estudo mostrou que a AR tem uma associação com genes de classe II HLA-DR do MHC, o que acabou sugerindo o envolvimento das células T na patogênese desta doença.<sup>29</sup> Portanto, ambas as respostas imunes, humoral e mediada por células, podem acabar por contribuir para o desenvolvimento de sinovite. Algumas células foram encontradas na inflamação sinovial, incluindo células TH1 CD4 + e TH17, linfócitos B ativados, plasmócitos e macrófagos, bem como outras células inflamatórias. Em alguns casos mais graves, pode haver a presença dos folículos linfoides bem formados com centros germinativos (os chamados órgãos linfoides terciários). Além das células há a presença de inúmeras citocinas que podem ser identificadas no líquido sinovial, incluindo IL-1, IL-8, TNF, IL-6, IL-17 e IFN- $\gamma$ . Uma hipótese é que as citocinas recrutem leucócitos, que por sua vez vão causar lesão dos tecidos, além de estimular células sinoviais residentes a produzirem enzimas proteolíticas (colagenase), que estão associadas a destruição das cartilagens, ligamentos e tendões das articulações.<sup>26</sup>

Essa especificidade das células B e T ainda é desconhecida, embora já se tenha bem esclarecido a existência de ambas as células B e T capazes de reconhecer peptídeos citrulinados. A suscetibilidade à AR está ligada ao haplótipo HLA-DR4. Alguns estudos de genoma total mostraram a existência de genes nos quais existem polimorfismos associados à AR. Existe uma correlação com o gene que codifica uma fosfatase de tirosina (PTPN22), que acontece quando a arginina na posição 620 é substituída por um triptofano. Ainda não é claro como essa alteração pode estar relacionada à autoimunidade, mas se sabe que ela acaba influenciando na resposta imune, gerando complexas alterações de sinalização em múltiplas populações de

células imunológica. As células TH17 e provavelmente o TH1, estão associadas a liberação de citocinas, que são responsáveis por fazer o recrutamento de leucócitos para a área de articulação e ativam células sinoviais para produzir colagenases e outras enzimas, isso acaba causando a destruição progressiva da cartilagem e do osso. A presença de uma resposta imune crônica nas articulações pode levar à formação de tecidos linfoides terciários na sinóvia, e esse tecido mantém e propaga a reação inflamatória local.<sup>30</sup> É importante salientar que os HERVs podem possuir regiões de similaridade com o organismo e um dos mecanismos relacionados as doenças autoimunes é o mimetismo molecular, que ocorre quando um microorganismo apresenta alguma região de similaridade com algum componente do corpo, gerando uma resposta cruzada.

### 1.7 HERVs NA ARTRITE REUMATOIDE

A Artrite Reumatoide (AR) possui etiologia desconhecida, existem algumas possíveis causas que incluem uma predisposição genética combinada com gatilhos ambientais (agentes virais e bacterianos), recentemente os retrovírus endógenos humanos foram implicados como potenciais agentes etiológicos. Vale destacar que as proteínas virais de HERV-W têm potencial imunopatogênico *in vitro*, e o principal mecanismo de resposta autoimune proposto é através de mimetismo molecular, onde uma proteína de HERV expressa pode ativar a resposta imune e essas proteínas virais apresentam regiões peptídicas similares ao proteínas *self* humanas.<sup>31,32</sup>

Estudos clínicos mostraram aumentos nos níveis de anticorpos para proteínas HERV e atividade transcricional HERV em pacientes com AR em comparação com grupos controles, que mostraram um aumento significativo nos níveis de atividade transcricional HERV-K e presença de anticorpos contra a proteína desse HERV. Também foi observado presença de partículas semelhante retrovírus na membrana sinovial e no seu fluido.<sup>30,33</sup>

Entretanto os dados que investigaram a expressão de HERV e que investigaram a resposta humoral anti HERV são escassos. Ainda, desconhecemos o perfil transcricional das famílias de HERV associadas as características clínicas dos pacientes com AR. Além disso, diversos são os *loci* e HERV-K e W que podem estar ativos em pacientes com AR, e desta diversidade proteica viral sendo expressa há a

possibilidade de ativação do sistema imune. Alguns estudos descreveram uma resposta humoral anti HERV em pacientes com AR<sup>5</sup>, que podem estar associados a essa resposta autoimune mediada por mimetismo molecular.

## 2. JUSTIFICATIVA

A Artrite Reumatoide (AR) tem uma prevalência que varia de 0,22 a 1% em relação a população mundial adulta, mas essa prevalência é mais expressiva se considerarmos a população entre 55 e 75 anos, sendo de 4,5 % no Brasil, cerca de 150 mil casos são registrados todos os anos.

A AR é uma doença crônica, progressiva e autoimune. Assim como as demais doenças autoimunes, existe um desconhecimento do papel dos efeitos ambientais sobre a etiologia dessas doenças. Dentre as principais opções que foram recentemente descobertas, os agentes infecciosos representam um importante elemento capaz de causar resposta autoimune em virtude da interação com as células hospedeiras, interferindo na capacidade de resposta imune bem como nos processos evolutivos. Sabidamente, os HERVs podem atuar em processos imunopatogênicos que foram evidenciados previamente em outras doenças autoimunes, como a Esclerose Múltipla. Os HERVs apresentam um papel importante na mediação de resposta imune com ativação do receptor TLR4 e apresentam capacidade de estimular processos inflamatórios bem como esses efeitos podem interferir na expressão dos HERVs. Infelizmente, existem poucos dados referente ao possível papel da expressão desses HERVs bem como possível resposta autoimune mediada por anticorpos através de mimetismo molecular na Artrite Reumatoide

Dessa forma compreender o possível papel dos HERVs, investigar a presença de anticorpos anti-HERV e a expressão deles em pacientes com artrite reumatoide torna-se fundamental para elucidar a etiologia da doença, gerando possibilidade de novos diagnósticos e tratamentos.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Investigar os níveis de expressão e os níveis de IgG anti-peptídeos de HERV-W e K em pacientes com artrite reumatoide.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Identificar regiões de similaridade entre HERVs e proteínas que compõem o sistema articular;
- Comparar os níveis de expressão das diferentes famílias de HERVs entre os pacientes com AR;
- Padronizar e validar um ensaio imunoenzimático (ELISA) contra peptídeos de HERV-K e HERV-W;
- Avaliar a presença e títulos de anticorpos contra peptídeos de HERV e proteínas que compõem o sistema articular.

## 4. MÉTODOS

Trata-se de um estudo prospectivo transversal do tipo caso controle, sob a aprovação do CEP UNISA 5.046.978 (Anexo 1).

### 4.1 PACIENTE

Para o estudo com pacientes com AR e validação do ELISA, foi realizado o cálculo amostral considerando os dados anteriores de expressão de Retrovírus Endógenos Humanos em indivíduos saudáveis e com doenças autoimunes como Esclerose Múltipla e doenças inflamatórias como Síndrome da Fadiga Crônica.<sup>34,35,36</sup> Desta forma, a proporção entre controles e pacientes foi considerada de 50% e efeito de força de 80%, foi utilizado o cálculo de estatística t que com esses parâmetros trouxe um cálculo amostral de 26 indivíduos em cada um dos grupos.

Para a validação do ELISA, foram utilizados soros de pacientes (com idade entre 18 e 60 anos) com esclerose múltipla do banco de soro utilizado para o estudo Perfil de expressão de Retrovírus Endógenos Humanos em pacientes com Esclerose Múltipla e coletados sob o CEP 896.341. Os soros de doadores saudáveis (com idade entre 18 e 62 anos) de dois diferentes bancos de soros coletados sob o CEP (5.152.962 e 056466/2020), foram utilizados como controles negativos.

Para o estudo com pacientes com diagnóstico de AR, os pacientes foram recrutados no Ambulatório da Universidade Santo Amaro. Ao todo foram incluídos no estudo cerca de 31 pacientes com laudo confirmatório para artrite reumatoide, que preencheram um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Anexo 2). Foram excluídos pacientes com outro tipo de doença autoimune, exemplo Lúpus Eritematoso Sistêmico, e outro tipo de doença reumatoide. Dados demográficos dos pacientes bem como do quadro clínico também foram coletados questionário (Anexo 3).

Para compor o grupo controle 31 indivíduos saudáveis sem histórico de doenças autoimune na família foram incluídos no estudo.

## 4.2 LOGÍSTICA LABORATORIAL

De cada paciente foram coletadas 2 amostras de sangue (uma em tubo EDTA e uma em tubo seco). Amostras foram encaminhadas para o laboratório de pesquisa da Universidade Santo Amaro (UNISA). O tubo com EDTA foi centrifugado a 1500 x g para separação das três fases sanguíneas. Em seguida o *buffy coat* (300 µL) foi coletado para tratamento com *buffer* de lise de eritrócitos (*Buffer EL*, Qiagen), seguindo instruções do fabricante. Os *pellets* de PBMC foram armazenados em freezer -80°C até o momento de sua utilização. Para as amostras do tubo seco, as amostras foram centrifugadas em 1500 x g para separação do soro, o qual foi aliquoteado e armazenado em freezer -20°C até o momento de sua utilização.

## 4.3 OBTENÇÃO E PURIFICAÇÃO DO RNA

As amostras foram submetidas a extração de RNA pelo método de Trizol (Thermo). Brevemente, aproximadamente 1000 µL de Trizol foram adicionados ao *pellet* de cada amostra a qual foi homogeneizada até a completa rompimento das células. Em seguida foi adicionado 200 µl de clorofórmio a mistura. Para que fosse possível quebra/ separação das fases após essa etapa, então as amostras foram centrifugadas a 15000 rpm a 15 minutos. Em seguida, toda a fase aquosa (600µl) foi separada em novo tubo. A etapa de precipitação foi iniciada com auxílio de isopropanol (500 µl), e uma nova centrifugação a 15000 rpms a 15 minutos. O *pellet* foi lavado com etanol a 70%, uma centrifugação foi realizada a 15000 rpms a 10 minutos . O *pellet* de RNA foi secado a temperatura ambiente 15 minutos. E o RNA foi resuspendido em 40µl de H<sub>2</sub>O *nuclease free*. Todas as etapas da extração foram realizadas a 4°C.

Após a extração o DNA genômico foi removido com auxílio do *kit Turbo DNA-free* (Thermo), seguindo instruções do fabricante, em seguida a confirmação da ausência de DNA genômico contaminante foi realizada por PCR em Tempo Real através com genes complementares ao gene endógeno GAPDH, conforme descrito anteriormente.<sup>34</sup>

#### 4.4 ANÁLISE PARA SÍNTESE DE PEPTÍDEOS

Sequências de proteínas relacionadas a cartilagem, como o colágeno do tipo II, 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](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.

#### 4.5 DETECÇÃO E NÍVEL DE EXPRESSÃO DOS HERVS

O PCR em Tempo Real foi realizado baseado na plataforma *Sybr Green* com primers complementares ao gene do envelope de HERV-W<sup>37</sup> e ao gene pol do HERV-K<sup>38</sup> que amplifica um total de 10 subfamílias do HERV-K, e como gene endógeno utilizaremos o primers complementares ao gene endógeno de GAPDH. Os primers a serem utilizados estão descritos na tabela 1:

Oligonucleotides	<i>Forward</i> (Primer Senso)	<i>Reverse</i> (Primer Antissenso)
HERV-W	CCAATGCATCAGGTGGGTAAC	GAGGTACCACAGACAAAAATATTCCT
HERV-K	TCCCCTTGGAACTCCTGTTTT	CATTCCTTGTGGTAAACTTTCCA
GAPDH	ACCCACTCCTCCACCTTTGAC	TGTTGCTGTAGCCAAATTCGTT

**Tabela 2:: Primers que foram utilizados em ensaios de PCR em tempo real**

As condições de ciclagem para detecção dos HERVs se iniciaram com o cDNA, devido ao *kit One-step* (Sigma), com 44°C a 30 minutos e 94°C a 2 minutos. Seguido

de 40 ciclos de 95°C por 15s, 50°C por 1 minuto e 60°C por 1 minuto. Para a ciclagem do GAPDH utilizamos os seguintes parâmetros: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C por e 15s 60°C por 1 minuto. uma etapa final para obter a Temperatura de *Melting*. A atividade transcricional dos HERVs, foi avaliada de forma qualitativa (ausência ou presença) e de forma quantitativa (nível de expressão), através de quantificação relativa dos HERVs com relação ao GAPDH do grupo com AR e a relação dos HERVs com o GAPDH do grupo controle, esses dados foram expressos através do método de  $-2\Delta\Delta Ct$ .<sup>39</sup>

A descrição do volume e das concentrações estão descritos na tabela 2.

Reagentes	Concentração	Volume
<i>M-MLV Reverse Transcriptase</i>	1U	0,125 µL
<i>SYBR Green Taq Ready Mix for Quantitative</i>	1x	12,5 µL
<i>Reference Dye for Quantitative 100x Solution</i>	1x	0,25 µL
<i>Magnesium Chloride Solution</i>	3mM	1 µL
Água Ultrapura		6,2 µL
<i>Primer Ford</i>	3.2pmol	1 µL
<i>Primer Reverse</i>	3.2pmol	1 µL
Amostra (RNA)	150ng	3 µL
Volume Total		25 µL

**Tabela 2: Volume dos reagentes utilizados nas reações de PCR**

#### 4.6 ELISA INDIRETO PARA A DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-HERVs

Os peptídeos foram inicialmente dissolvidos (0,5 mg/ml) em DMSO (Sigma) e, na hora do uso, diluídos à 10 µg/ml em tampão carbonato/bicarbonato pH 9.6 para revestir os poços de placa de 96 poços (Nunc MaxiSorp, Thermo). Após 24hs, 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 (1:500) e adicionada aos poços em duplicata por 1 hora à 37°C. As placas foram lavadas três vezes com tampão de lavagem (PBS - Tween 0,1%) e incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente, cerca de 27°C, com anticorpo anti-humano de bode conjugado com peroxidase (Sigma) diluídos em tampão de Soro Fetal Bovino (1:5000). Depois das três lavagens tampão de lavagem (PBS – Tween 0,1%), foi adicionado o substrato (ABTS – sigma) com peróxido de hidrogênio e parado com 1M

de HCL e a absorbância determinada em leitor de placa (Loccus LMR-96) a 405 nanômetros.<sup>40,41</sup>

#### 4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados coletados foram inseridos em banco de dados construído no programa GraphPad Prism (La Jolla, California) e avaliados por meio de estatística descritiva com cálculos percentuais, frequências e médias assim como a elaboração dos gráficos.

Para a comparação dos escores de dois grupos foi utilizado o test-t de student, seguido do teste de Wilcoxon ou Mann Whitney. Todos os testes foram realizados sob a admissão de probabilidade de erro de primeira espécie (alfa) de 5%.

Para a análise da validação do ensaio de ELISA foram utilizados os valores de corte para cada peptídeo foi elaborada a partir da análise da curva *receiver operating characteristic* (ROC) e medidas de diagnóstico (sensibilidade, especificidade e acurácia) considerando  $p < 0,05$ .<sup>42</sup>

Os resultados da reatividade dos soros estão expressos em índice ELISA (IE) – valores de absorbância dividido pelo *cut-off* (determinado pela curva ROC), sendo consideradas positivas as amostras com  $IE > 1,0$ .

## 5. RESULTADOS

### 5.1 ANÁLISE IN-SILICO

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, como o colágeno do tipo II. Para realizar essa análise foi necessário um treinamento em parceria com o Dr. Thiago Souza Onofre, UNIFESP. 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, porque quanto mais similares, melhor seria a resposta imunológica gerada pelo organismo.<sup>43</sup> Além disso, não foi possível selecionar sequências de aminoácidos próximos de 100% de similaridade, porque eram pequenas em torno de 3-5 aminoácidos, não sendo possível sintetizar devido ao tamanho.

HERV/ Proteína	Referência/ Sequência	Auto-Proteína	Referência/Seq uência	I
HERV W	AAI37382.1 (538 resíduos)	Pré-proteína da proteína 1 da camada intermediária de cartilagem	NP_003604.4 (1182 resíduos)	5
HERV W	AAI37382.1(538 resíduos)	Precursor da isoforma 1 da cadeia alfa-1 (II) do colágeno	NP_001835.3 (1487 resíduos)	10
HERV W	AAI37382.1 (538 resíduos)	Precursor da proteína da matriz oligomérica da cartilagem	NP_000086.2 (757 resíduos)	4
HERV W	AAI37382.1 (538 resíduos)	Proteína de cartilagem GP-39	Y08374.1 (383 resíduos)	4
HERV W	AAI37382.1 (538 resíduos)	Precursor da proteína 2 da camada intermediária de cartilagem	NP_694953.2 (1157 resíduos)	4
HERV K	M14123.1(1361 resíduos)	Pré-proteína da proteína 1 da camada intermediária de cartilagem	NP_003604.4 (1182 resíduos)	6
HERV K	M14123.1(1361 resíduos)	Precursor da isoforma 1 da cadeia alfa-1 (II) do colágeno	NP_001835.3 (1487 resíduos)	7
HERV K	M14123.1(1361 resíduos)	Precursor da proteína da matriz oligomérica da cartilagem	NP_000086.2 (757 resíduos)	4
HERV K	M14123.1(1361 resíduos)	Proteína de cartilagem GP-39	Y08374.1 (383 resíduos)	6
HERV K	M14123.1(1361 resíduos)	Precursor da proteína 2 da camada intermediária de cartilagem	NP_694953.2 (1157 resíduos)	3

**Tabela 3: Comparação das proteínas dos HERVs K e W com as proteínas próprias do organismo e a identificação compartilhadas entre elas.** I= ou seja, o número de regiões com similaridade entre as proteínas virais e humanas.

A análise realizada utilizando bioinformática mostrou uma série de regiões antigênicas, compartilhadas entre os HERVs e os autoantígenos do hospedeiro, que podem estar relacionados desenvolvimento da Artrite Reumatoide (Tab. 3). Como foi possível observar tanto o HERV W como o HERV K possuem regiões de similaridade com as proteínas próprias do organismo humano que estão relacionadas a cartilagem e articulações, locais mais afetados pela AR. Podemos citar proteínas com uma principal semelhança o Precursor da isoforma 1 da cadeia alfa-1 (II) do colágeno, que possui 4 peptídeos com mais de 50 % de semelhantes ao HERV- W e o Precursor da proteína da matriz oligomérica da cartilagem, que possui 4 peptídeos com mais de 50% de semelhança (Tab.4 e 5).

HERV-W posição	HERV-W Sequencia	Cadeia alfa-1 posição	Cadeia alfa-1 sequência	% similar e #aa
85	HYWTGKMIN	1346	<b>HIWFGETIN</b>	55,6 e 9
93	NPSCPGGLGVT	226	<b>NPGEPEGPGVS</b>	54,5 e 11
437	GPWGLLSQ	972	<b>GPQGLAGQ</b>	62,5 e 8
93	NPSCPGGLG	160	<b>NPGPPGPPG</b>	55,6 e 9

**Tabela 4: Peptídeos da comparação entre o HERV-W e o precursor da isoforma 1 da cadeia alfa-1 (II) do colágeno.** A tabela mostra a posição do resíduo inicial da sequência do HERV ou da proteína humana, a % de similaridade (similar), o número (#) de aminoácidos (aa) e os resíduos similares em negrito.

HERV-W posição	HERV-W Sequencia	Cadeia alfa-1 posição	Proteína da matriz oligomérica	% similar e #aa
115	SDGGGVQD	398	<b>SDGDGIGD</b>	62,5 e 8
360	ERVADSLVTL	704	<b>ELVADSNVVL</b>	70,0 e 10
455	PLAAIILLI	3	<b>PDTACVLLL</b>	55,6 e 9
111	QTGMSDGG	562	<b>QTMNSDPG</b>	62,5 e 8

**Tabela 5: Peptídeos da comparação entre o HERV-W e o Precursor da proteína da matriz oligomérica da cartilagem.** A tabela mostra a posição do resíduo inicial da sequência do

HERV ou da proteína humana, a % de similaridade (similar), o número (#) de aminoácidos (aa) e os resíduos similares em negrito.

Também observamos que o Precursor da proteína da matriz oligomérica da cartilagem possui 4 peptídeos com mais de 50 % de semelhança ao HERV- K e o Precursor da isoforma 1 da cadeia alfa-1 (II) do colágeno, que possui 8 peptídeos com mais de 50 % de semelhança ao HERV- K (Tab. 6 e 7).

HERV-K posição	HERV-K Sequencia	Cadeia alfa-1 posição	Cadeia alfa-1 sequência	% similar e #aa
974	PWEWGEKGISTP	227	<b>PGEPGEPGVSGP</b>	58,3 e 12
6	PGLPSPAMIP	995	<b>PGLPGPSGEP</b>	60,0 e 10
9	PSPAMIPK	1326	<b>PNPANVPK</b>	62,5 e 8
3	PLQPGLPSA	1070	<b>PGPPGSPGPA</b>	60,0 e 10

**Tabela 6: Peptídeos da comparação entre o HERV-K e o precursor da isoforma 1 da cadeia alfa-1 (II) do colágeno.** A tabela mostra a posição do resíduo inicial da sequência do HERV ou da proteína humana, a % de similaridade (similar), o número (#) de aminoácidos (aa) e os resíduos similares em negrito.

HERV-K posição	HERV-K Sequencia	Cadeia alfa-1 posição	Proteína da matriz oligomérica	% similar e #aa
295	LCGNDDP	265	<b>LCGRDTD</b>	71,4 e 7
1014	WSGNQTLETRD	259	<b>WAGNGILCGRD</b>	54,5 e 11
570	VTVDYSHFIW	591	<b>VTDDDYAGFIF</b>	54,5 e 11
907	ECVANSAVIL	704	<b>ELVADSNVVL</b>	60,0 e 10

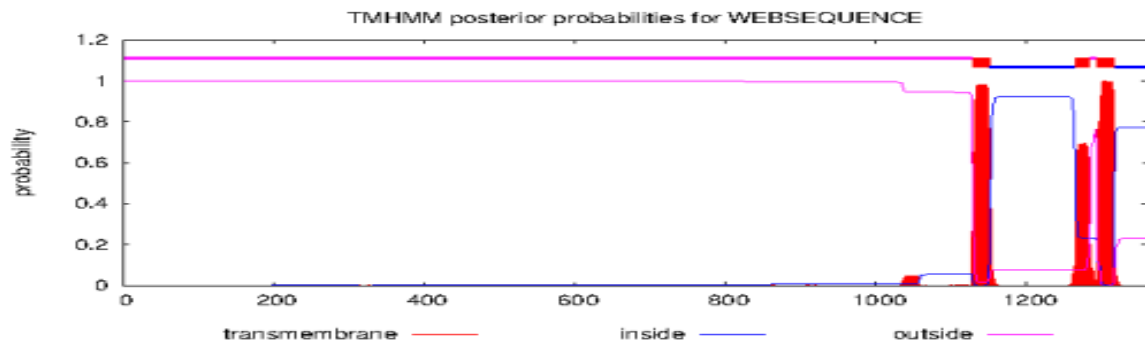
**Tabela 7: Peptídeos da comparação entre o HERV-W e o Precursor da proteína da matriz oligomérica da cartilagem.** A tabela mostra a posição do resíduo inicial da sequência do HERV ou da proteína humana, a % de similaridade (similar), o número (#) de aminoácidos (aa) e os resíduos similares em negrito.

## 5.2 SELEÇÃO DOS PEPTÍDEOS

Os peptídeos foram analisados no programa TMHMM - 2.0, para ver a sua localização na estrutura das proteínas pol do HERV-K (M14123.1) e env do HERV-W (AAI37382.1). Foram priorizados os peptídeos localizados externamente à estrutura da proteína na forma nativa, pois estes peptídeos serão utilizados para o teste de ELISA indireto.

## TMHMM result *Herv K*

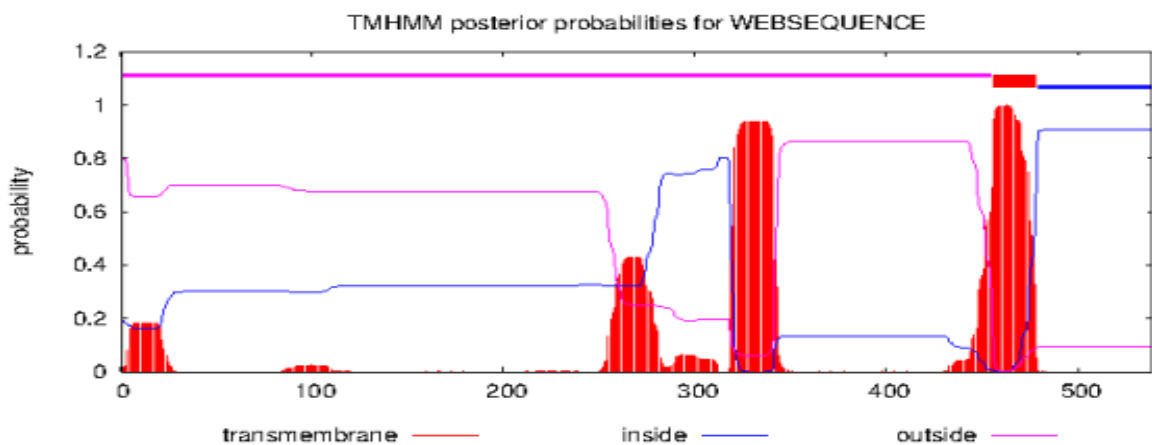
```
# WEBSEQUENCE Length: 1361
# WEBSEQUENCE Number of predicted TMHs: 3
# WEBSEQUENCE Exp number of AAs in TMHs: 60.04477
# WEBSEQUENCE Exp number, first 60 AAs: 0
# WEBSEQUENCE Total prob of N-in: 0.00008
WEBSEQUENCE TMHMM2.0 outside 1 1128
WEBSEQUENCE TMHMM2.0 TMhelix 1129 1151
WEBSEQUENCE TMHMM2.0 inside 1152 1264
WEBSEQUENCE TMHMM2.0 TMhelix 1265 1284
WEBSEQUENCE TMHMM2.0 outside 1285 1293
WEBSEQUENCE TMHMM2.0 TMhelix 1294 1316
WEBSEQUENCE TMHMM2.0 inside 1317 1361
```



**Figura 1: Resultado de TMHMM do HERV-K.** A linha rosa mostra o que está exposto externamente na membrana, enquanto a linha azul mostra o que está exposto internamente a membrana e em vermelho são regiões transmembrana.

## TMHMM result *HERV W*

```
# WEBSEQUENCE Length: 539
# WEBSEQUENCE Number of predicted TMHs: 1
# WEBSEQUENCE Exp number of AAs in TMHs: 60.56034999999999
# WEBSEQUENCE Exp number, first 60 AAs: 3.53931
# WEBSEQUENCE Total prob of N-in: 0.20340
WEBSEQUENCE TMHMM2.0 outside 1 455
WEBSEQUENCE TMHMM2.0 TMhelix 456 478
WEBSEQUENCE TMHMM2.0 inside 479 539
```

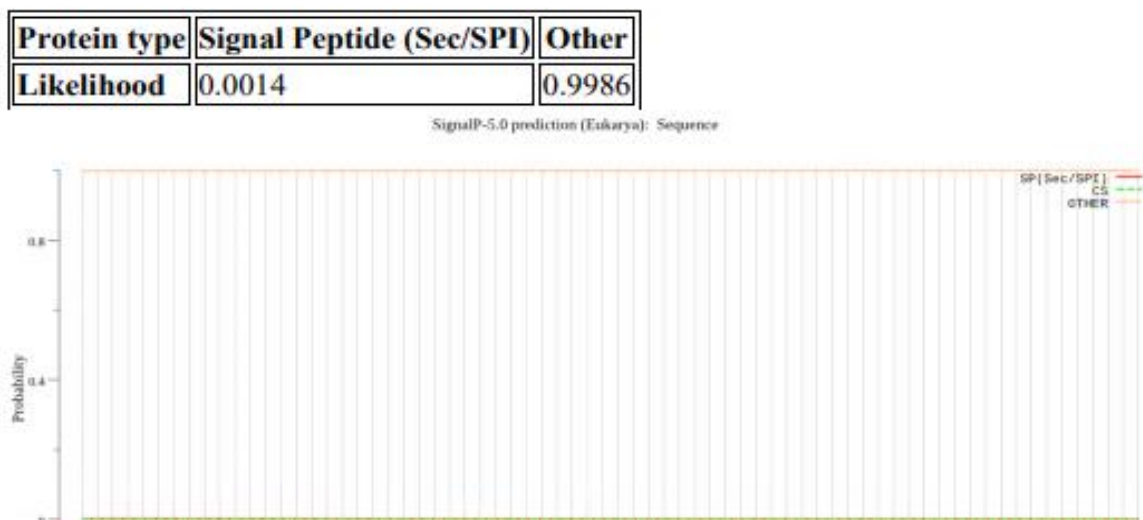


**Figura 2: Resultado de TMHMM do HERV-W.** A linha rosa mostra o que está exposto externamente na membrana, enquanto a linha azul mostra o que está exposto internamente a membrana e em vermelho são regiões transmembrana.

Podemos observar que o HERV-K (Fig.1) apresenta menos regiões transmembrana e regiões internas do que o HERV-W (Fig.2), mas há a predição de regiões transmembranas na porção C-terminal da proteína. Essas regiões envolvem os aminoácidos nas posições 1129-1361, já o HERV-W, há regiões que são transmembrana, na posição 456-478. Assim, os resíduos com aminoácidos 479-539 também foram excluídos, visto que são regiões que estão internas na membrana.

Para confirmação do resultado obtido do TMHMM, foi utilizado mais algumas ferramentas de bioinformática como o *SignalP - 5.0*, usado para observar a presença de peptídeos sinais e sítios de clivagem (Fig. 3 e 4) e o *TMpred* (Fig. 5 e 6), que é uma ferramenta utilizada para localizar o peptídeo na membrana, onde estão e qual a orientação deles dentro da sequência estudada, no caso HERV-K e HERV-W.

Para a análise de SignalP - 5.0 foram utilizadas as sequências de HERV-K (M14123.1) e do HERV-W (AAI37382.1) (Fig. 3 e 4), porque os peptídeos sinais, que são encontrados geralmente na extremidade da proteína<sup>44</sup> e estão relacionados a entrada na via de transporte intracelular, faz a translocação de proteína e acaba sendo clivado, por isso as sequências que apresentam esse tipo de peptídeos acabaram sendo excluídas. Na sequência de HERV-K não havia presença teste tipo de peptídeo,



**Figura 3: Resultados Signal P-5,0 HERV-K.** Nesta sequência não tem a presença de peptídeo sinal.



```

TMPred prediction output for : TMPRED.21106.7770.seq

Sequence: MGP...VSV length: 1361
Prediction parameters: TM-helix length between 17 and 33

1.) Possible transmembrane helices
=====
The sequence positions in brackets denominate the core region.
Only scores above 500 are considered significant.

Inside to outside helices : 6 found
  from to score center
182 ( 182) 198 ( 198) 47 190
233 ( 239) 256 ( 256) 878 247
314 ( 316) 334 ( 334) 1114 325
822 ( 822) 848 ( 841) 79 833
1129 (1129)1153 (1146) 2511 1138
1300 (1300)1318 (1318) 2406 1310

Outside to inside helices : 8 found
  from to score center
180 ( 180) 198 ( 198) 281 188
240 ( 240) 256 ( 256) 415 248
315 ( 315) 334 ( 332) 297 324
730 ( 733) 751 ( 751) 170 741
822 ( 824) 840 ( 840) 49 832
902 ( 902) 925 ( 922) 222 912
1128 (1130)1148 (1148) 2176 1138
1301 (1301)1319 (1319) 2761 1310

```

**Figura 5: Resultado de TMpred do HERV-K.** HERV-K são 6 locais encontrados que estão localizados de dentro para fora e 7 locais que estão localizados de fora para dentro.

```

TMPred prediction output for : TMPRED.21099.5256.seq

Sequence: MAL...GSS length: 539
Prediction parameters: TM-helix length between 17 and 33

1.) Possible transmembrane helices
=====
The sequence positions in brackets denominate the core region.
Only scores above 500 are considered significant.

Inside to outside helices : 7 found
  from to score center
2 ( 2) 21 ( 19) 1332 10
94 ( 94) 115 ( 115) 778 105
180 ( 180) 202 ( 200) 31 189
262 ( 265) 283 ( 281) 1220 273
280 ( 283) 303 ( 300) 953 291
320 ( 323) 339 ( 339) 1785 331
457 ( 457) 474 ( 474) 2305 466

Outside to inside helices : 7 found
  from to score center
2 ( 2) 22 ( 22) 1390 12
91 ( 91) 110 ( 110) 862 100
210 ( 212) 228 ( 228) 155 220
262 ( 262) 278 ( 278) 1408 270
280 ( 283) 302 ( 302) 877 291
324 ( 324) 341 ( 341) 1824 332
449 ( 458) 477 ( 474) 2563 466

```

**Figura 6: Resultados de TMpred do HERV-W.** Na sequência de HERV-W, foram encontradas 7 regiões de dentro para fora e 7 de fora para dentro.

Foram utilizados todos os resultados para excluir na sequência da proteína tudo o que não estava externo a membrana tanto do HERV-K como do HERV-W, por isso na sequência do HERV-K, foram usados os resíduos de 1 a 1127, por não ser transmembrana e não existir presença de peptídeo sinal. Na sequência do HERV-W foram removidos os resíduos de 1 a 20 (peptídeo sinal), também foram removidos os resíduos 446-538, baseado no TMHMM. Foram usados os resíduos 21-445, que são

os resíduos que estão localizados fora da membrana plasmática e não são transmembrana, só foram utilizados resíduos que estão localizados externamente na proteína. A sequência de HERV-K, após a realização dos testes descritos anteriormente, ficou com mais peptídeo se comparado a sequência de HERV-W (Tabela 8), o que explica termos selecionado e sintetizado mais peptídeos relacionados a sequência de HERV-K (8 peptídeos), do que ao HERV-W (2 peptídeos).

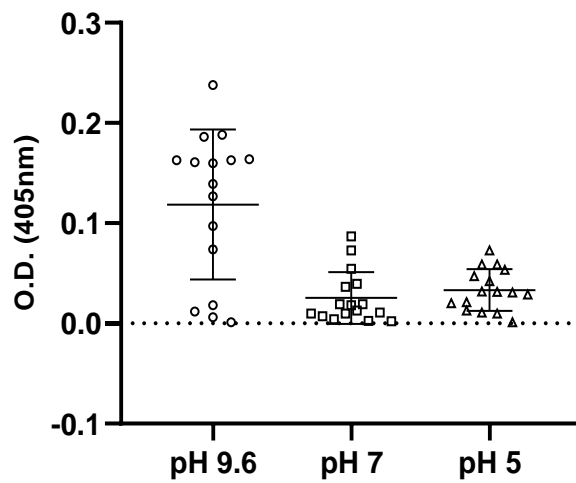
Para fazer a validação dos resultados utilizamos *Swiss Model* (<https://swissmodel.expasy.org/interactive>) e assim observar qual a localização dos peptídeos dentro da estrutura da proteína e, assim, foram sintetizados os peptídeos da tabela 8. Os peptídeos sintetizados foram utilizados para realização do ensaio imunoenzimático (ELISA).

<b>HERV-W</b>	<b>HERV-K</b>
TSSSPYQQ	TIPLAEQDCE
LVGPLVSNL	LGIPTYAMS
	STVKTFTLYLD
	VTHVPSFGR
	ECVANSAVIL
	PWEWGEKGISTP
	SPVSGPEHP
	WSGNQTLETRD

**Tabela 8: Peptídeos sintetizados**

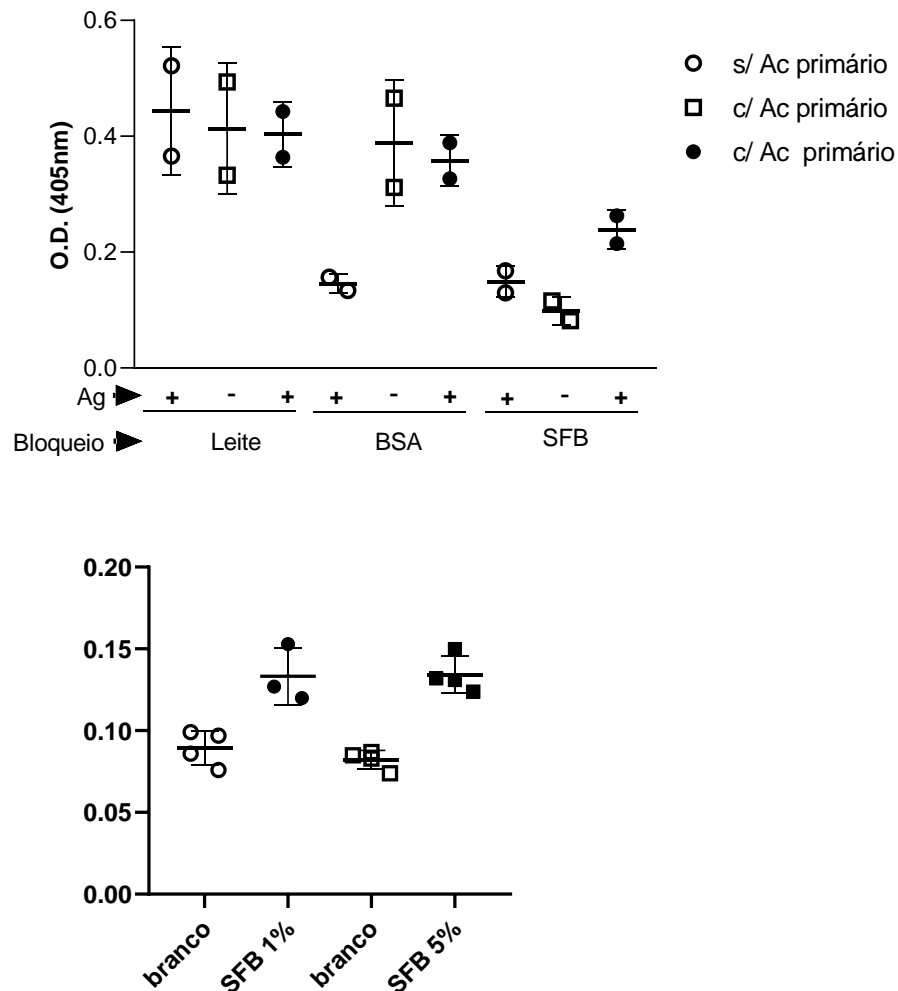
### 5.3 PADRONIZAÇÃO DO ELISA INDIRETO

Para padronizar o ELISA indireto foi utilizado inicialmente a MOG (Mielina Oligodendrócito Glicoproteína), cedido pela Profa. Dr. Maria Aparecida Juliano da UNIFESP e soro de pacientes com Esclerose Múltipla<sup>40</sup>, que já está bem descrito na literatura.<sup>41,42</sup> Foram testados três tampões para o revestimento da placa, sendo eles o tampão Carbonato/Bicarbonato pH 9.6, Tampão de Fosfato pH 5.0 e PBS pH 7.0, com soros de pacientes com esclerose múltipla na diluição de 1:10, 1:50, 1:500. A utilização do tampão Carbonato/Bicarbonato pH 9.6 com a concentração da MOG de 10 µg/poço resultou na maior OD (Fig. 7). O Tampão de Carbonato/ Bicarbonato, que é o mais estabelecido na literatura.<sup>45,46,47,48</sup>



**Figura 7: Diferença entre o pH.** Comparação do tampão Carbonato/Bicarbonato pH 9.6, Tampão de Fosfato pH 7,0 e PBS pH 5.0 para cobrir a placa com antígeno MOG. Amostras soros negativos ou positivos para EM na diluição de 1:10, 1:50 e 1:500.

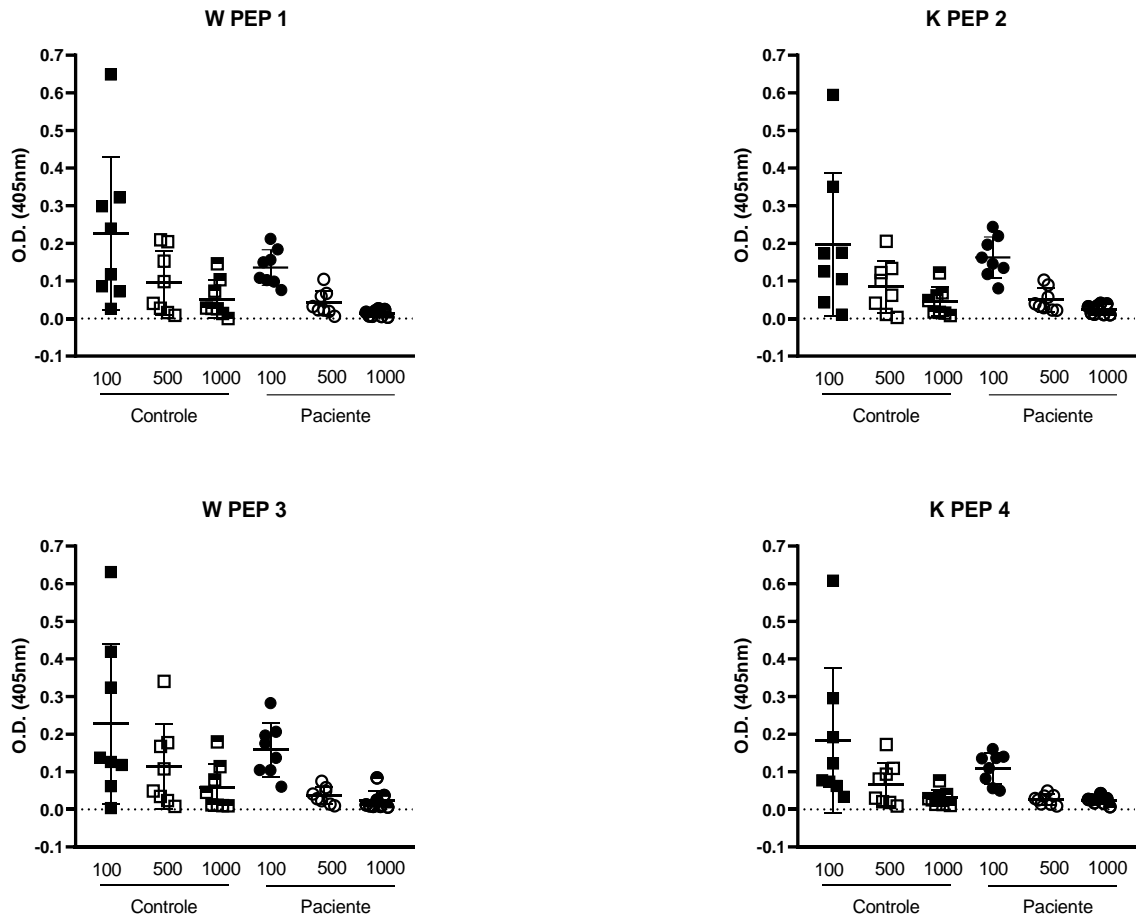
Foram testados também os bloqueios com leite desnatado 5%, Albumina Sérica Bovina (BSA) 5% e o Soro Fetal Bovino 5%. O leite desnatado 5% e BSA 3%, não foram suficientes para evitar a ligação inespecífica (na ausência de antígeno na placa), visto pelo alto valor do branco com estes bloqueios (Fig.8). Como a Densidade ótica com SFB 5% foi baixa, foi testado o bloqueio com 5% e 3% de FBS (Fig. 8b) e não teve diferença, assim, para os próximos ensaios foi utilizado o bloqueio com SFB 3% em tampão de lavagem.



**Figura 8: Diferença entre os bloqueios.** Em A: poço foram revestidos ou não com antígeno MOG (Ag), bloqueio com leite o leite desnatado 10%, BSA 3% e Soro fetal bovino 5% e presença ou ausência do soro de pacientes com EM (Ac primário). Em B: poço foram revestidos com antígeno MOG, bloqueio com Soro fetal bovino 1 ou 5%, e incubado com soro de pacientes com EM.

Após a realização de todos esses testes com MOG, foi realizado a padronização da diluição do soro dos pacientes com AR (1:100, 1:500 e 1:1000) em placas cobertas com 20 ug/ml dos peptídeos em tampão de Carbonato/ Bicarbonato pH 9.6, o bloqueio com soro fetal bovino 3% e o anticorpo secundário utilizado foi o IgG anti-humano de bode conjugado com peroxidase em diluição 1:5000 também em 1% SFB com PBS- Tween 0,1%. A leitura de todas as placas foi feita em 405 nm. Podemos observar na figura 9, as melhores diluições do soro foram de 1:100 e 1:500.

O grupo controle teve mais resposta humoral do que o grupo com AR e isso ocorreu em todos os peptídeos testado, este resultado nos levou a validar o ELISA com soros de pacientes que sabidamente reagem com os HERVs, no caso pacientes com EM.



**Figura 9: Diferença entre as diluições nos diferentes peptídeos.** Diferença entre o grupo controle e grupo com artrite reumatoide em diferentes diluições para o peptídeo de HERV-K e HERV-W

## 5.4 VALIDAÇÃO DO ELISA COM SOROS DE PACIENTES COM ESCLEROSE MÚLTIPLA

Para validar os peptídeos usados foi necessário realizar Curva ROC determinar especificidade e sensibilidade de cada peptídeo, assim conseguimos estabelecer um *cut-off*, utilizamos amostras positivas para Esclerose Múltipla, pois é uma doença autoimune que tem presença de anticorpos anti-MOG e anti-HERV no soro dos voluntários, já bem discutido na literatura na literatura.<sup>40, 41,47</sup>

		Peptídeo	% de similaridade	Aminoácidos Similares
1	HERV-W	LVGPLVSNL	57,1%	VLG <b>PLVA</b> LVGPLV <b>S</b>
2	HERV-K	PWEWGEKGISTP	50%	LSRP ISTP
3	HERV-W	TSSSPYQQ	75%	SSSY SSPY
4	HERV-K	TIPLAEQDCE	57,1%	LAGQFLE LAEQDCE
			71,4%	VIGPRHP VSGPEHP
5	HERV-K	PSVSGPEHP	50%	SLSRPSLP SVSGPEHP
6	HERV-K	WSGNQTLETRD	50%	GDQ <b>APEYR</b> GNQTLETR
7	HERV-K	LGIPTYAMS	50%	PFYW <b>VS</b> PTYAMS
8	HERV-K	ECVANSAVIL	50%	ALII AVIL
			60%	PPFSR PSFGR
9	HERV-K	VTHVPSFR	60%	VPV <b>LG</b> VPS <b>FG</b>
			50%	TFDPHFLR THVPSFGR
10	HERV-K	STVKTFTYLD	50%	FTCF FTLY

**Tabela 9: Comparação entre a MOG (CAA52617.1) e os peptídeos sintetizados.** A tabela mostra valores de similaridade e os aminoácidos similares

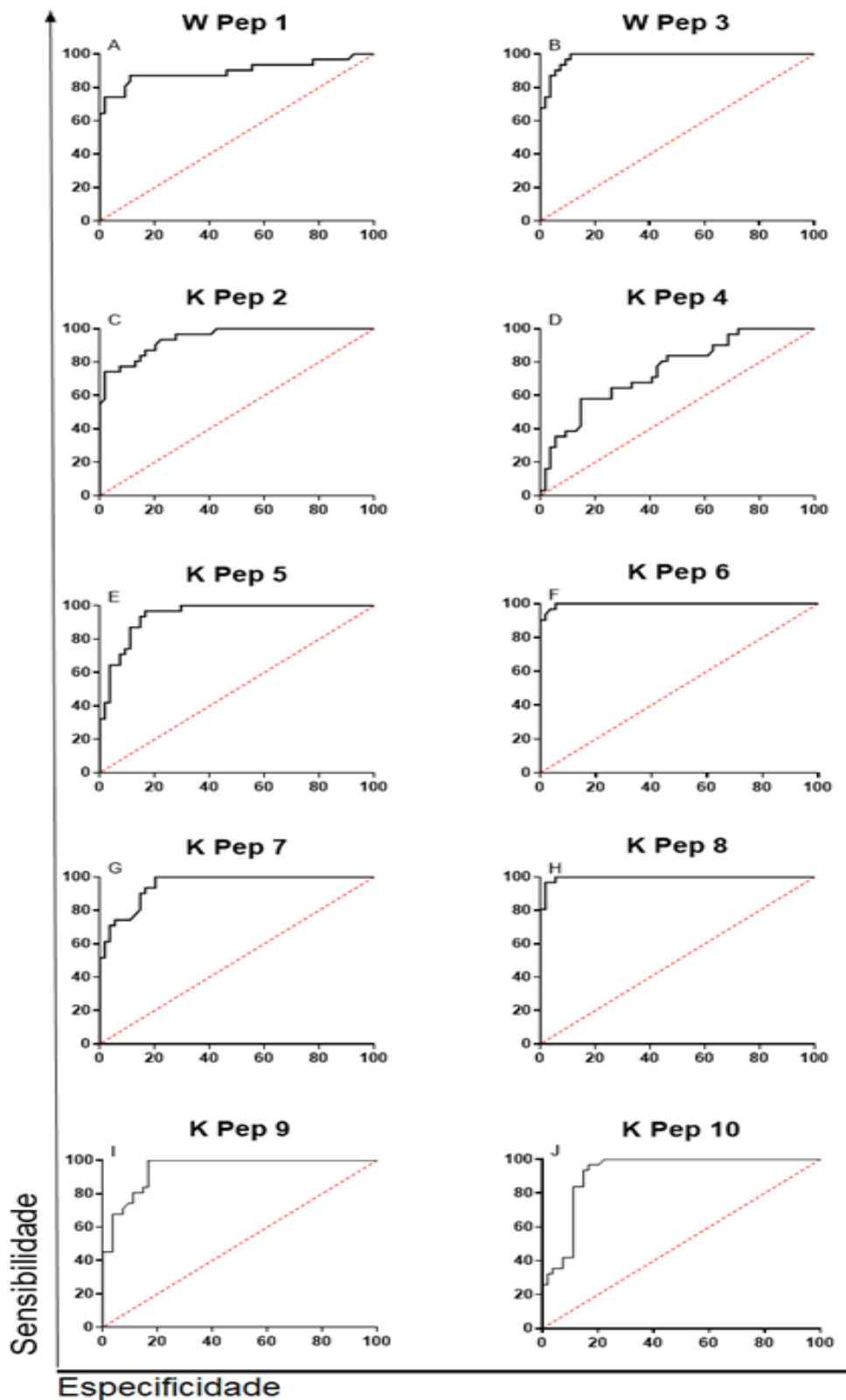
Os peptídeos sintetizados foram comparados com a sequência Glicoproteína da Mielina de Oligodendrócitos (MOG) (CAA52617.1), para visualizar a presença de região de similaridade (Tab.9). Para realização dessa análise foi selecionada a sequência da MOG no GenBank e analisado no ExPASy. Os parâmetros utilizados

foram: Matriz de comparação BLOSUM62, foram computados 100 alinhamentos, mesmo parâmetros utilizados anteriormente. Podemos observar que houve presença de similaridade entre os peptídeos e a sequência da MOG.

Foram utilizados 31 soros de pacientes diagnosticados com esclerose múltipla (com idade  $18 \pm 60$ ) e 54 soros de doadores saudáveis (com idade  $18 \pm 62$ ). O número de doadores sadios foi maior que de EM para aumentar a especificidade do teste. O ELISA foi realizado com 10 ug/ml dos peptídeos e com a diluição 1:500 dos soros. Os parâmetros diagnósticos (cut off, área sobre a curva, sensibilidade, especificidade, acurácia e valor de p) para o ELISA nas condições estabelecidas estão dispostos na tabela 11 e na figura 7. Os cut off variaram de 0,08975 (W Pep 1) a 0,1758 (K Pep 10) já desconsiderando o branco da reação (tabela 10). A área sobre a curva variou de 0,753 (K Pep 4) a 0,9967 (K Pep 6). Como pode-se observar (tab. 10), os peptídeos 3, 6 e 8 apresentaram os maiores valores de sensibilidade e especificidade, bem como a acurácia diagnóstica apresentando 93,55%, 93,55% e 96,77%, respectivamente.

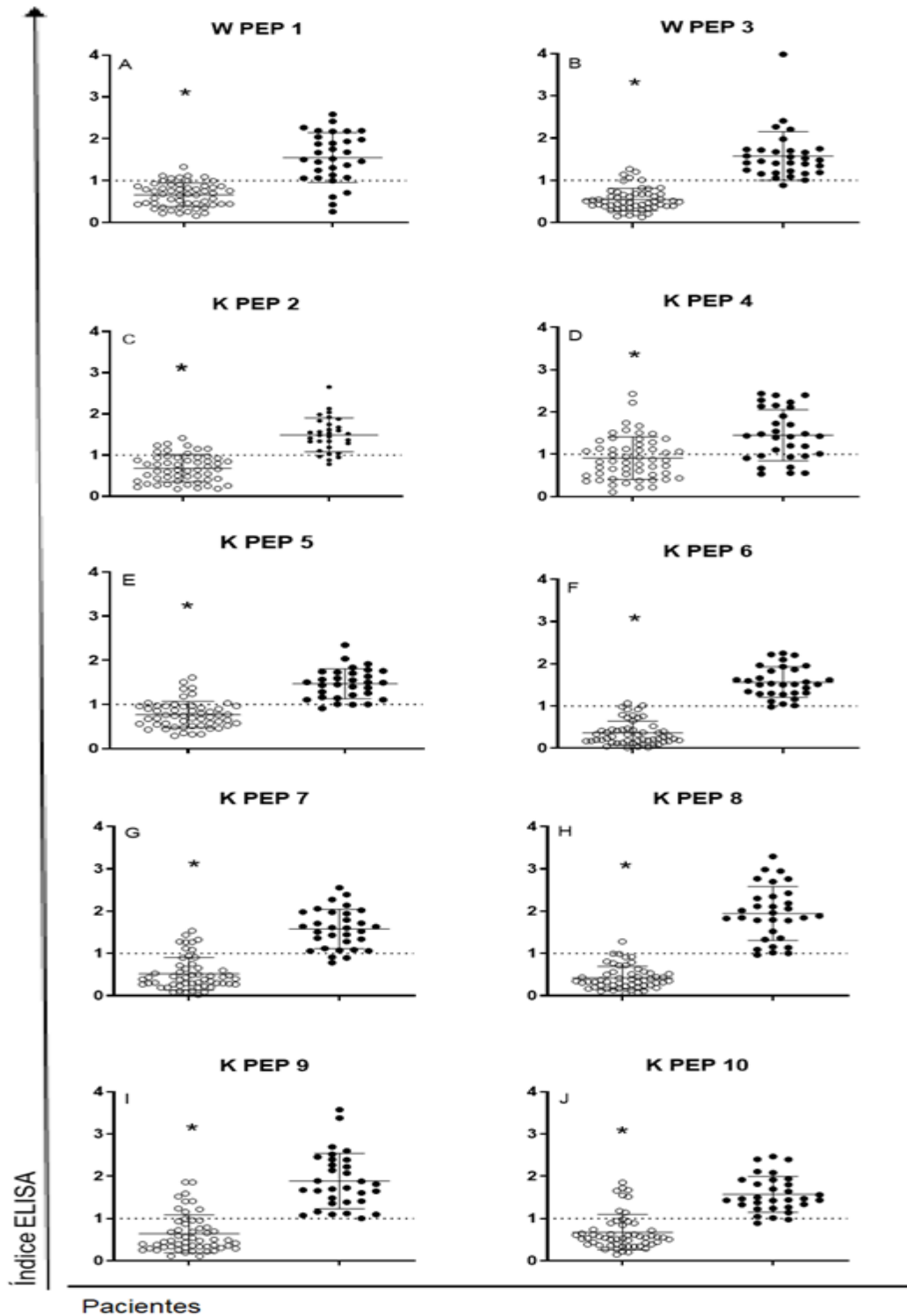
Peptídeo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>Cut off</i>	0,08975	0,1158	0,1393	0,1153	0,1288	0,1258	0,1068	0,1208	0,1273	0,2115
Área sobre a curva	0,8757	0,9058	0,9813	0,6238	0,9251	0,9943	0,9178	0,9917	0,9089	0,8621
Sensibilidade (%)	87,10	80,65	96,77	64,52	93,55	96,77	90,32	96,77	80,65	83,87
Especificidade (%)	83,87	77,72	90,32	54,84	80,65	93,55	74,19	96,77	80,65	80,65
Acurácia (%)	85,48	79,03	93,55	59,68	87,10	95,16	82,26	96,77	80,65	82,26
Valor de p	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0939	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001

**Tabela 10: Parâmetros de diagnósticos encontrados dos diferentes peptídeos realizados pela técnica de ELISA.**



**Figura 10: Curvas ROC segundo o programa Graph Pad Prism, versão 8.0 da técnica ELISA, utilizando os 10 peptídeos sintéticos diferentes. As curvas ROC foram obtidas a partir de amostras de soro de indivíduos com esclerose múltipla em relação aos indivíduos saudáveis com idades pareadas.**

Utilizando os valores de cut-off foi determinado o índice ELISA <sup>44</sup> que consiste na divisão da densidade óptica obtida pelo cut-off. Como mostra a figura 11, os valores acima de 1 são positivos e abaixo de 1 negativo, assim, foi possível observar a diferença entre o grupo controle e o grupo com esclerose múltipla.



**Figura 11: Diferença entre grupo controle (bolinha aberta) e grupo com esclerose (bolinha fechada).** A figura mostra o índice ELISA entre os diferentes grupos, onde o grupo com EM mostrou um IE estatisticamente maior do que o grupo controle.  $P < 0,0001$  teste de Mann Whitney

Com esta validação foi possível verificar que o ELISA com os peptídeos que apresentam similaridades com a MOG e HERVs pode ser aplicado para determinar a reatividade sorológica de pacientes com esclerose múltipla e a mesma metodologia será aplicada para os pacientes de artrite reumatoide.

## 5.5 APLICAÇÃO DO ELISA

Para avaliar a presença e títulos de anticorpos contra peptídeos de HERV, foram utilizados dois grupos, sendo um grupo formado por voluntários que possuem artrite reumatoide e um grupo controle (indivíduos sem doença pré-existente), todos foram selecionados após a realização de um questionário, voluntários do grupo controle que possuíam alguma doença autoimune ou reumática foram excluídos. Além disso também levamos em conta o tempo de diagnóstico e os medicamentos utilizados para o tratamento (Tab.11).

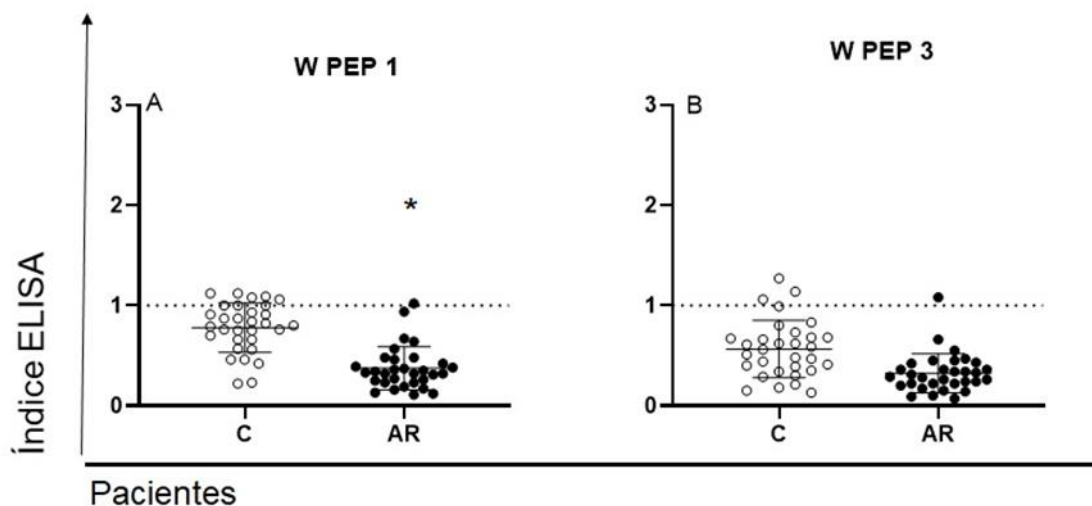
Variáveis	Categoria	AR	S	Variáveis	Categoria	
Idade	30 -39	1	6	Comorbidades ou Doenças	sem	15
	40-49	4	11		hipertensão/pressão	10
	50-59	8	10		diabetes	3
	60-69	9	4		hipotireoidismo	1
	>70	9	0		chagas	1
Raça	negra	8		ansiedade/depressão	1	
	parda	8		Efizema pulmonar	1	
	branca	10				
	oriental	1				
Tempo de Diagnóstico	NI	4		Medicamentos	Adalimumabe	4
	0-4	2			Upadacitinibe/Metotrexato	9
	5-9	2			Citrato de tofacitibe/Prednisona	15
	10-19	5			Adalimumabe/Tocilizumabe	9
	20-29	9				
	30-39	5				
	>40	1				
NI	7					

**Tabela 11: Respostas do questionário dos voluntários com artrite reumatoide.** A tabela mostra os dados sobre idade, raça, tempo de diagnóstico da AR, outras comorbidades ou doenças e medicamentos. NI = não informado, AR = artrite reumatoide, S =saudáveis.

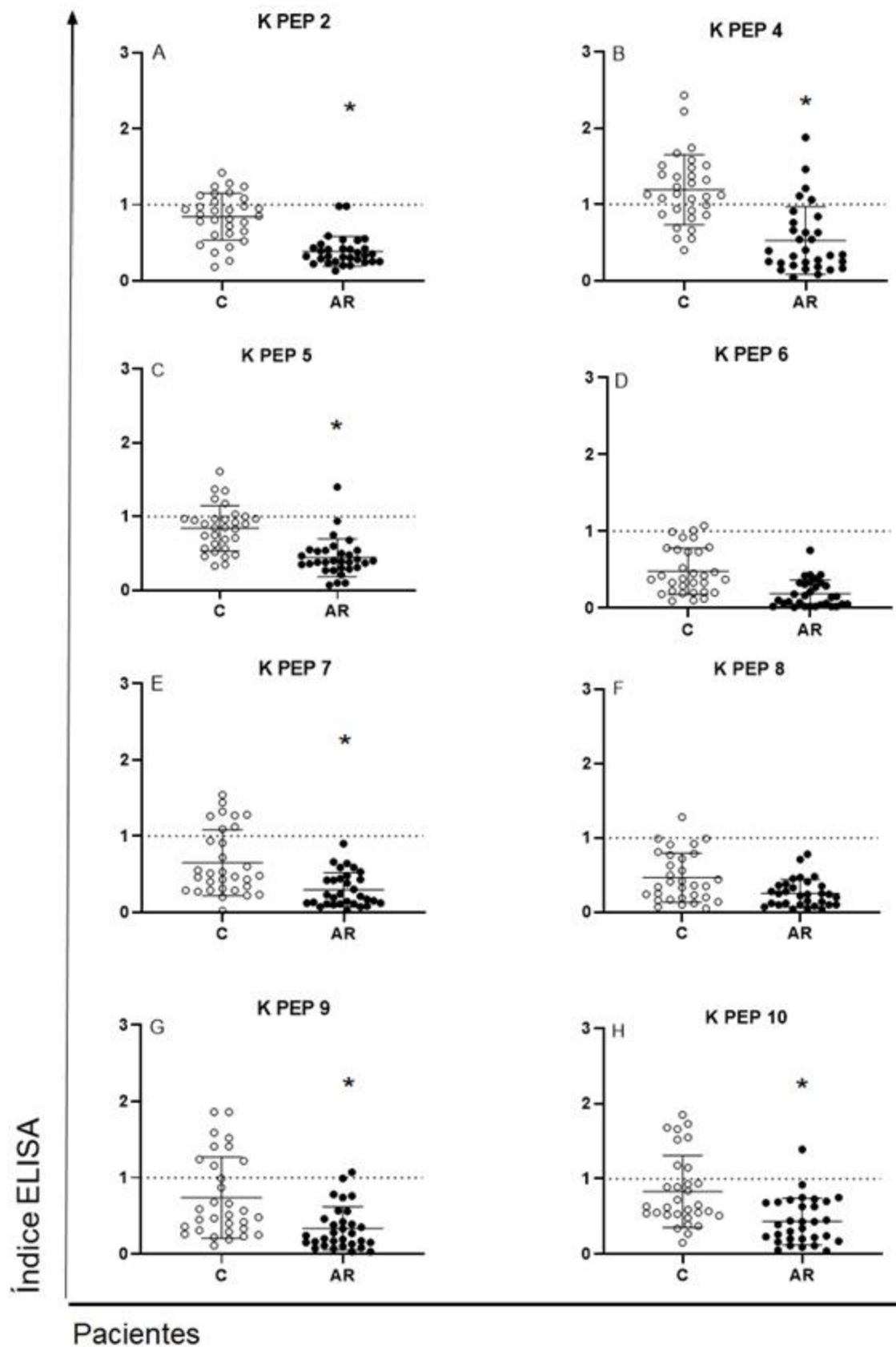
Conforme a Tabela 11, podemos observar que a metade dos pacientes tiveram o diagnóstico há mais de 20 anos, cerca de 50%. Em relação a raça houve um

equilíbrio entre branca, parda e negra. Em relação a idade dos voluntários cerca de 80,65% possuía mais de 50 anos. Quase a metade dos voluntários não possuíam uma outra doença pré-existente, cerca de 48,4%, cerca de 32,26% possuem hipertensão/pressão e cerca de 9,68% possuem diabetes. Os medicamentos utilizados são medicamentos que agem no sistema imunológico, cerca de 42% tomam Prednisona. No grupo controle temos mais voluntários entre a faixa etária de 40-59 anos cerca de 71%.

Após a validação do ELISA foi realizado o teste sorológico para verificar se os soros dos pacientes com AR reagiriam com os diversos peptídeos de HERV. Na tabela 12 estão os índices de positividade para cada peptídeo e na figura 12 e 13 pode-se perceber individualmente como se comportou cada paciente no teste comparativamente, a partir do cálculo do índice ELISA.



**Figura 12: Comparação do grupo controle com o grupo AR HERV-W.** Bolinha aberta grupo controle, bolinha fechada grupo AR. Os pacientes com AR tiveram o IE estatisticamente menor que os indivíduos saudáveis em resposta ao peptídeo 1,  $p < 0,008$ .



**Figura 13: Comparação do grupo controle com grupo AR HERV-K.** Bolinha aberta grupo controle, bolinha fechada grupo AR. Os pacientes com AR tiveram o IE estatisticamente menor que os indivíduos saudáveis em resposta aos peptídeos 2, 4, 5, 7, 9 e 10,  $p < 0,008$ .

	W PEP 1		W PEP3						
	C	AR	C	AR					
+	5	1	3	1					
T	31	31	31	31					
%	16,13%	3,23%	9,68%	3,23%					
		K PEP2		K PEP 4		K PEP5		K PEP6	
	C	AR	C	AR	C	AR	C	AR	
	9	0	20	5	6	1	2	0	
	31	31	31	31	31	31	31	31	
	29,03%	0,00%	64,52%	16,13%	19,35%	3,23%	6,45%	0,00%	
		K PEP7		K PEP8		K PEP9		K PEP10	
	C	AR	C	AR	C	AR	C	AR	
	8	0	1	0	9	1	8	1	
	31	31	31	31	31	31	31	31	
	25,81%	0,00%	3,23%	0,00%	29,03%	3,23%	25,81%	3,23%	

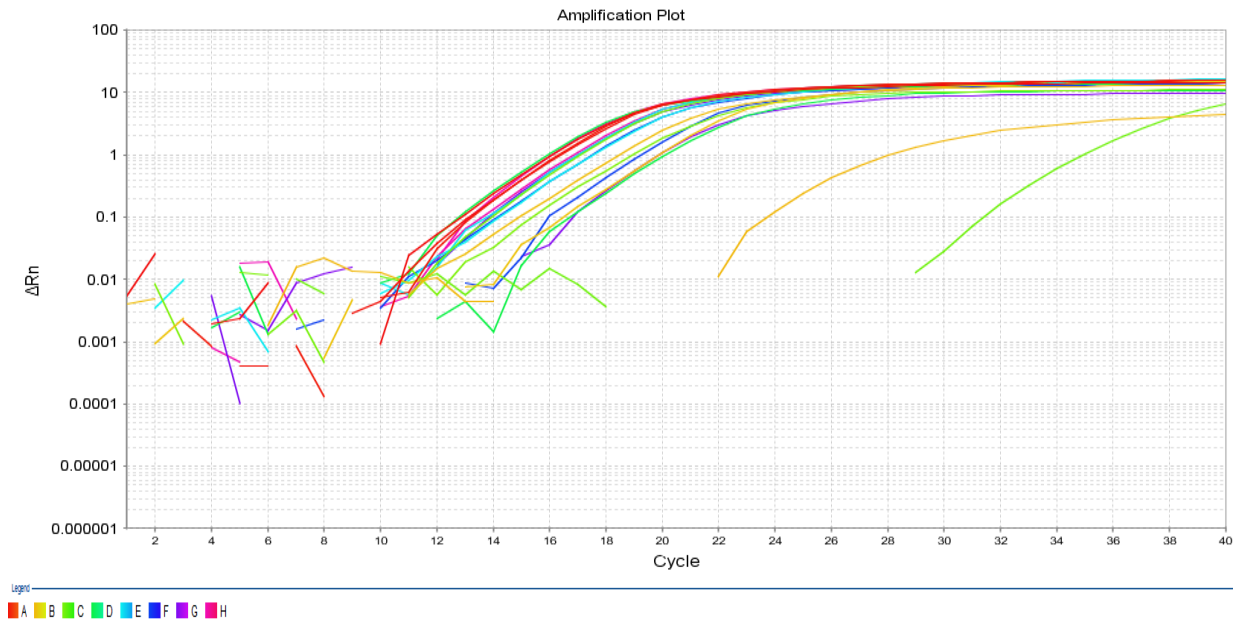
**Tabela 12: Total de positivo em cada peptídeo e nos diferentes grupos.** Podemos observar que o peptídeo 4 apresentou uma maior positividade em ambos os grupos.

Surpreendentemente, os IE dos controles saudáveis deram mais positivos que os pacientes com AR (Tab. 12 e Fig. 13), sendo, respectivamente, 16,13% vs 3,23% para o pep 1, 29,03 vs 0,00% para os peps 2 e 9 ; 64,52% vs 16,13% para o pep 4, 25,81 vs 0,0% para o pep 7, estas diferenças foram estatisticamente significantes ( $p < 0,008$ ). Apesar do peptídeo 4 apresentar a maior diferença entre grupo controle e AR, a confiabilidade deste resultado é baixa, pois na validação do ELISA este peptídeo teve uma baixa a acurácia (59,68%). Em contrapartida os peps 3, 6 e 8 alta acurácia, 93,55%, 93,55% e 96,77%, respectivamente, estes tiveram uma baixa porcentagem de positividade nos controles saudáveis 9,68%, 6,45% e 3,23%, respectivamente.

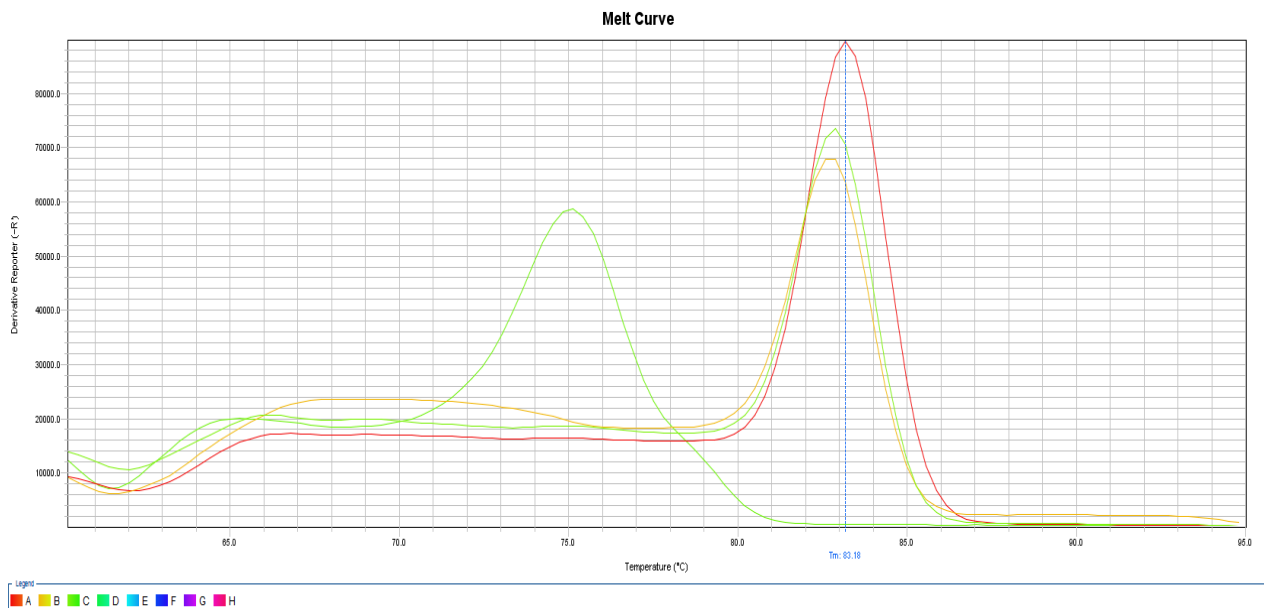
## 5.6 PCR EM TEMPO REAL

### 5.6.1 GAPDH

Para averiguar a qualidade do material extraído, bem como utilizar posteriormente para a quantificação relativa da expressão dos HERVs, um ensaio de PCR em tempo Real para o gene endógeno do GAPDH foi realizado. Conforme observado na figura 10 todas as amostras apresentaram amplificação do gene estudado.



**Figura 14: Amplificação do gene GAPDH.** Curva de amplificação com os gráficos de fluorescência no decorrer dos ciclos.

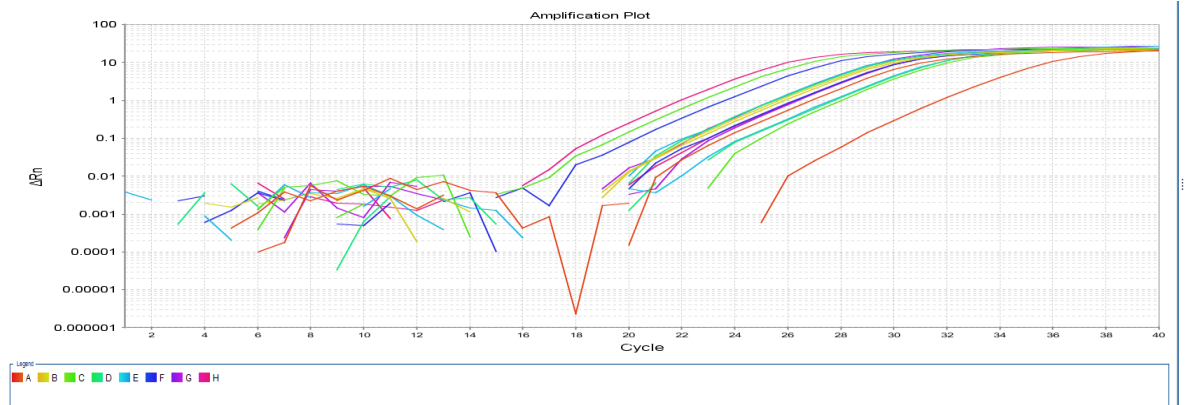


**Figura 15: Curva de melting do gene GAPDH.** A curva em vermelho mostra a nossa amostra positiva para o gene GAPDH que está na temperatura de aproximadamente 83,18°C, e a curva em verde o nosso controle negativo que se encontra na temperatura de aproximadamente de 75°C, sendo que as curvas nas cores amarelo e verde claro são nossas amostras alvos, todas elas se encontram muito próximas a temperatura do controle positivo.

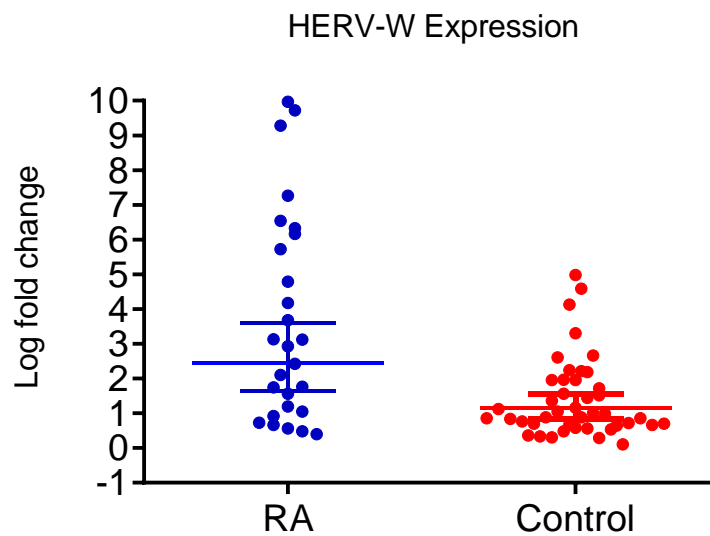
### 5.6.2 HERV-W

A RT-PCR no grupo de Artrite Reumatoide para HERV-W foi realizada, mostrando que 21 pacientes (67,7%) tiveram expressão positiva para HERV-W

(Fig.16). Além disso, os pacientes com Artrite reumatoide apresentam maior expressão de HERV em comparação aos indivíduos controles, conforme podemos observar na figura 17 ( $p < 0,01$ ).



**Figura 16: PCR em tempo real para HERV-W.** Curva de amplificação com os gráficos de fluorescência no decorrer dos ciclos.

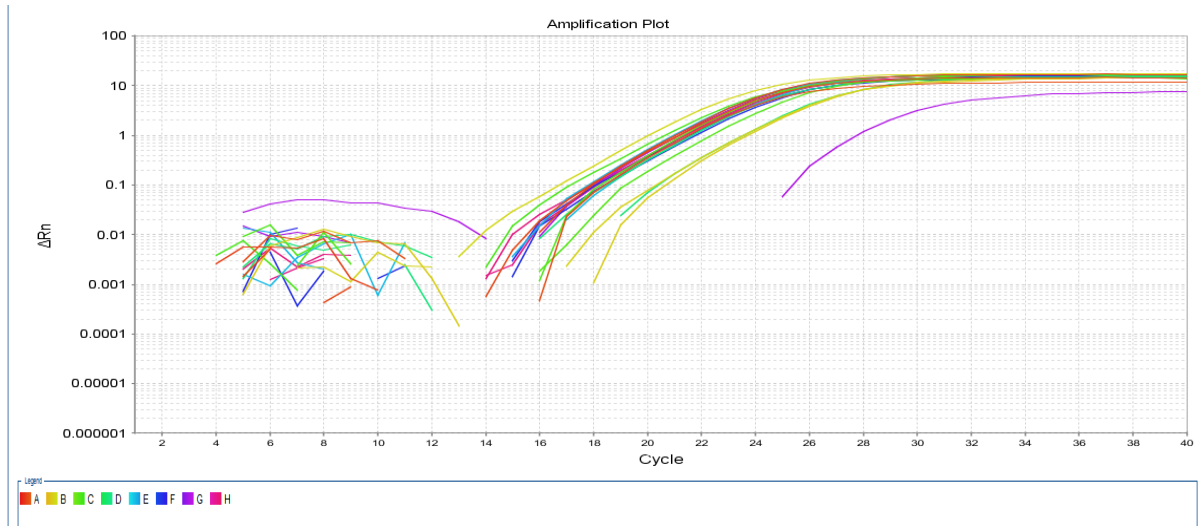


**Figura 17: Comparação do grupo com AR com o grupo controle para HERV-W ( $p < 0,01$ )**

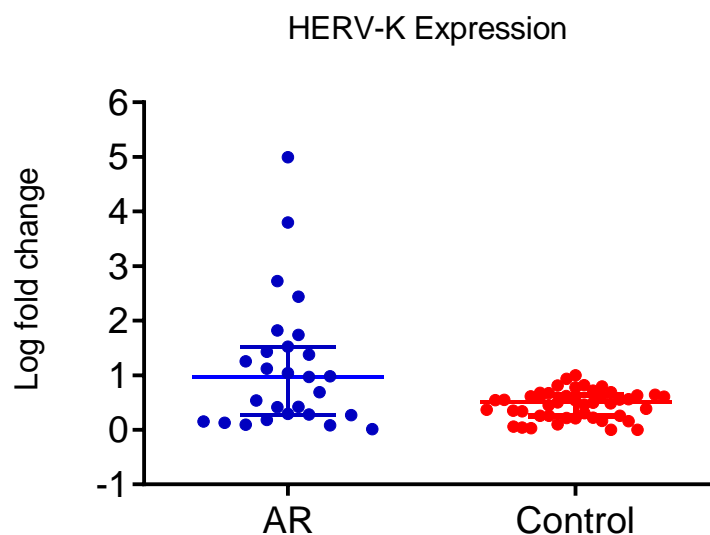
Comparando os dois grupos podemos observar que o grupo com Artrite reumatoide expressa em média duas vezes mais o HERV-W do que o grupo controle ( $p < 0,01$ ) (Fig. 17). A maior parte dos estudos que realizam PCR em tempo real utilizam o HERV-K e mostram um resultado diferente do observado a seguir.

### 5.6.3 HERV-K

Os resultados de PCR em Tempo real para o HERV-K revelaram que 16 voluntários, cerca 48,38% tiveram um resultado positivo para esse HERV (Fig. 18). A Análise de quantificação relativa, no entanto, revelou que os indivíduos com AR e controle expressam o gene retroviral de forma basal.



**Figura 18: PCR em tempo real para HERV-K.** Curva de amplificação com os gráficos de fluorescência no decorrer dos ciclos.



**Figura 19: Comparação do grupo com AR com o controle para expressão de HERV-K**

O grupo com artrite reumatoide expressa HERV-K de forma basal, valores em sua maioria estão entre 0 e 1 (Fig. 19).

## 6. DISCUSSÃO

De modo geral todos os peptídeos utilizados apresentaram resposta imunogênica. Para determinação do *cut-off* de cada peptídeo foi realizada uma curva ROC utilizando como padrão positivo os pacientes portadores de Esclerose Múltipla (EM), pois alguns estudos já demonstraram que há presença de anticorpos anti-HERV nesta doença, principalmente anti a proteína do envelope de HERV-W<sup>49,50,51</sup> região utilizada em nosso estudo. Nosso estudo mostrou que além de HERV-W, os pacientes com EM também tem resposta humoral contra o HERV-K.

Vale ressaltar que os soros dos pacientes com EM foram coletados no momento manifestação da doença e sem uso de medicamento.<sup>39</sup> Em contrapartida os controles negativos foram considerados adultos com idades variando de 20 a 60, pois foi necessário realizar o teste em um grupo mais jovens (entre 20 e 29 anos) e um grupo com idade próxima do grupo com artrite reumatoide (entre 30 e 60 anos), importante mencionar que todos os indivíduos do grupo controle não têm uma doença autoimune diagnosticada. Assim, para a validação foi possível ter um grupo negativo (saudáveis) e um positivo (com EM), permitindo o estabelecimento dos parâmetros de diagnóstico como sensibilidade, especificidade e acurácia. A opção de avaliar duas faixas etárias também se deu pelo fato de que a expressão dos HERVs tende a aumentar no decorrer da idade<sup>45</sup>, o que poderia impactar da determinação do *cut-off* dos ensaios.

Em se tratando de um teste de validação, a acurácia diagnóstico se torna fundamental, pois é possível a observação global do teste em relação aos acertos, sejam eles para os “doentes” ou para os “saudáveis”. A melhor acurácia foi encontrada no peptídeo 8 (96,77%) seguido do peptídeo 6 (95,16%) e do 3 (93,55%). Os peptídeos 1, 2, 5, 7, 9 e 10 apresentaram valor de acurácia variando entre 79,03% e 87,10%. O único peptídeo que apresentou valor de acurácia bem inferior foi o peptídeo 4 com 59,68%. Isso se deve pois o peptídeo 4 ele pode estar localizado na proteína em uma região menos externa do que os demais, ou até mesmo em uma região menos imunogênica. Dessa forma acredita-se que a detecção de anticorpos IgG específicos anti-HERVs pode ser detectada a partir da utilização de peptídeos 6 e 8.

O resultado obtido nesta validação pode vir a ser utilizado como base para novos estudos, porque os resultados tanto para esclerose múltipla, quanto para artrite reumatoide foram positivos se levarmos em consideração que nenhum estudo nesta área havia sido realizado a análise *in silico* que nós realizamos antes de sintetizar os peptídeos utilizados. Analisamos a similaridade entre a sequência do HERV-K e HERV-W e as proteínas da articulação, principalmente proteínas do colágeno, selecionamos os peptídeos que tinham mais de 50% de similaridade, porque gostaríamos de observar a resposta humoral, uma vez que se os peptídeos que fossem próximos de 100% de similaridade o organismo poderia considerar como próprio e não geraria uma resposta a esse peptídeo, selecionamos apenas aqueles que possuíam mais de 5 aminoácidos, isso porque peptídeos menores poderiam não ser sintetizados pelo seu tamanho e também acabariam gerando uma resposta inespecífica. Além disso analisamos a localização da sequência do peptídeo dentro da estrutura da proteína para que fosse possível selecionar peptídeos que estão localizados externamente a membrana e que gerariam uma resposta humoral.

Diante deste cenário promissor de peptídeos imunogênicos, aplicou-se a técnica de ELISA em pacientes com diagnóstico de artrite reumatoide tratada. A positividade do IE foi quase nula (chegando à 3,23% para os peptídeos 1, 3, 5, 9 e 10 e 16,13% com pep 4) nos pacientes com artrite reumatoide, possivelmente porque estes pacientes estavam utilizando medicamentos anti-inflamatórios e não se encontravam em condições clínicas de surto, o que possivelmente representaria um quadro mais inflamado e conseqüentemente que pudesse favorecer a transcrição e/ resposta contra antígenos de HERV. Cerca de 42% fazem uso de Prednisona que é um anti-inflamatório esteroide que age no sistema imunológico e pode estar diminuindo a resposta humoral,<sup>52</sup> e a presença de algumas citocinas específicas que agem na inflamação, relacionados ao inibidor de necrose tumoral ou inibidor de receptores da interleucina 6.<sup>53,54,55</sup> Já com as amostras de paciente com EM foi possível observar uma resposta humoral elevada contra os mesmos peptídeos, pois os pacientes não estavam recebendo tratamento farmacológico no momento da coleta.<sup>39</sup> Importante destacar que a resposta humoral pode ser modulada uma vez que a condição inflamatória dos pacientes esteja mais controlada. Isso foi observado em pacientes com Esclerose Múltipla, o uso constante de Natalizumab por um período

prolongado, foi capaz de reduzir os níveis de anticorpos anti HERV-W de forma significativa após 6 meses de tratamento.<sup>56</sup>

Tanto a AR quanto a EM são doenças autoimunes. No caso da EM, tem se sugerido o envolvimento do HERVs na patogênese da doença, pois há o mimetismo molecular entre HERVs e MOG.<sup>33</sup> O fato de termos encontrado níveis baixos de anticorpos não exclui o papel do HERV na patogênese da AR pois os pacientes com artrite reumatoide selecionado para estavam sendo tratados, futuramente será interessante repetir o estudo com pacientes sem o uso de medicamento e que de forma preferencial estejam com sintomas clínicos da doença. Avaliar a resposta humoral e a expressão desses vírus nessas condições favorecerá um panorama diferente do que foi estudado aqui.

Um estudo realizado com pacientes com artrite reumatoide mostrou que em sua maioria pacientes com AR possuem autoanticorpos que reconhecem a proteína Env de HERV-K sugere que um ou vários dos loci HERV-K que codificam essa proteína e essas proteínas gerariam anticorpos em pacientes positivos.<sup>50</sup> O mesmo foi observado no lúpus, tanto nos pacientes adultos e pediátricos com LES existe a presença de autoanticorpos contra HERV-K Env com títulos mais elevados em comparação com outras doenças (síndrome de Sjögren, vasculite de pequenos ou grandes vasos ou artrite psoriática) e no grupo controle (indivíduos sem doença prévia).<sup>51</sup> No presente estudo tanto o peptídeo da região pol HERV-K (peptídeos 2, 4, 5, 6, 7, 8 e 9) e da região env HERV-W (peptídeos 1 e 3) foram imunogênicos para os pacientes com EM. Como mencionado anteriormente os estudos mostram uma resposta humoral anti HERV-K em diversas doenças autoimunes, como LES e Artrite, o que poderia implicar em um possível mecanismo da patogênese dessas doenças.<sup>20,51,57</sup>

Os nossos resultados de biologia molecular mostraram que 67,7% dos pacientes expressam HERV-W e essa expressão tende a ser duas vezes maior nos pacientes com artrite reumatoide em relação ao grupo controle, por outro lado o HERV-K, apesar de estar expresso em 48,38% dos voluntários estudados, não houve diferença nos níveis de expressão entre grupo controle e AR, os nossos resultados estão de acordo com os dados já publicados, porque a maioria dos estudos relacionam o HERV-W com as doenças autoimunes, que é o caso da AR. Apesar do resultado

mostrar uma expressão do HERV-W, ela foi mais baixa do que o esperado, isso mostra que o HERV está em níveis alterados nessa doença, mas precisaria ser melhor estudado para determinar qual seu papel na doença bem como a sua dinâmica de expressão, considerando a condição clínica e tratamento dos pacientes com AR.

Se comparamos resultado obtido no PCR em tempo real com um estudo publicado em 2010, o resultado diverge uma vez que o estudo demonstrou uma expressão mais elevada de HERV-K<sup>5</sup>, e o nosso resultado demonstrou uma maior expressão de HERV-W e um nível baixo de expressão de HERV-K. Um outro estudo comparou a artrite reumatoide juvenil com pacientes com lúpus eritematoso sistêmico e um grupo controle (indivíduos saudáveis), o resultado demonstrou um nível elevado da expressão de HERV-K no sangue periférico nos pacientes com artrite reumatoide juvenil se comparado com os outros grupos.<sup>21</sup> Esse contraste nos achados encontrados podem indicar a heterogeneidade da doença, e de grupos populacionais distintos que eventualmente podem apresentar um perfil de expressão diferenciado desses retrovírus. E também podem ser explicados por questões de métodos empregados, uma vez que as regiões estudadas podem ser distintas das que foram avaliadas aqui. Ainda, não há consenso sobre quais famílias de HERV estão mais ativas em doenças autoimunes de uma maneira geral, talvez com exceção da Esclerose Múltipla.

Quando comparamos os resultados obtidos com outras doenças autoimunes como o caso da Esclerose Múltipla tem relatos dos níveis mais elevados de HERV-W, que é o caso do estudo que comparou a população do Reino Unido e da Rússia, esse estudo mostrou uma diferença entre as populações e demonstrou um nível elevado de expressão em relação ao grupo controle<sup>25</sup>, mesmo resultado obtido em um outro estudo que demonstrou uma expressão elevada de HERV-W se comparado ao grupo controle.<sup>33</sup>

Em relação ao Lúpus Eritematoso Sistêmico, um estudo observou a expressão de HERV-K como uma das possíveis etiologias da doença, mas isso ainda precisa ser elucidado, o que se sabe é que existe a presença de anticorpos anti HERV-K no sangue periférico desses pacientes.<sup>20</sup> Como a AR e o LES possuem similaridade pode ser um dos motivos que o HERV-K vem sendo mais descrito neste tipo de doença

autoimune, e como já foi citado anteriormente os resultados demonstraram positividade em relação a dois peptídeos de HERV-K (4 e 10).

O fato de ter uma expressão elevada nos pacientes com AR e não ter uma resposta humoral, pode estar relacionado ao fato de que ter a expressão não significa que a proteína vai ser sintetizada ou estará expressa, talvez tenha outras proteínas sendo produzidas que acabaram não sendo selecionadas quando realizamos a parte de bioinformática. Uma outra possibilidade seja é o uso de medicamentos que possam estar influenciando mais na parte humoral do que na expressão dos HERVs.

Uma possível forma de resolver essa problemática seria realizar o estudo com pacientes em fase de surto da doença, que não façam uso de medicamentos para artrite reumatoide, para ser observado se tem uma resposta humoral mais elevada do que nos pacientes controle e com AR que faz tratamento há muitos anos, isso acaba sendo uma limitação do nosso estudo, pois não foram incluídos pacientes nessas condições neste trabalho. O que também representa um desafio, uma vez que as condições clínicas se iniciam de maneira abrupta e sem sintomas patognomônicos da doença. Além disso, o diagnóstico geralmente leva um tempo considerável para ser estabelecido. Acaba que esse é um fator limitante do nosso estudo uma vez que a seleção de pacientes em surto da doença é uma dificuldade a ser enfrentada, uma vez que os voluntários já realizavam o tratamento há pelo menos 1 ano. Além disso, a seleção dos voluntários saudáveis foi feita apenas por meio de questionário, não podemos afirmar que as informações estão totalmente corretas.

Com os resultados obtidos neste estudo abre um precedente para realizar o teste de ELISA indireto para HERV em outras doenças autoimunes ou até mesmo realizar este teste em pacientes com artrite reumatoide em diferentes estágios da doença ou que fazem uso de diferentes medicações, também seria possível comparar com um grupo controle de diferentes idades e não só com o grupo de idade pareada. Também seria interessante visualizar a expressão de HERV-K e W nestes diferentes grupos, para observar se o tratamento influencia no resultado da expressão.

## 7. CONCLUSÃO

O HERV-W é expresso duas vezes mais nos voluntários com artrite reumatoide que no grupo controle, já o HERV-K também é expresso tanto nos pacientes com AR quanto no grupo controle, só que em níveis mais baixos.

Os resultados do ELISA Indireto também mostraram que existe resposta humoral nestes voluntários. Os pacientes com artrite reumatoide tiveram uma menor imunoreatividade aos peptídeos relacionados ao HERV-W e K em relação aos doadores saudáveis sem histórico de doenças autoimunes.

São necessários mais estudos na área para elucidar o papel do HERV na patogênese da artrite reumatoide, também seria importante realizar estudos com outros pacientes com a doença (AR), em diferentes estágios, seria também interessante realizar um estudo comparando os tratamentos, para elucidar de que forma esses medicamentos estão relacionados com a resposta humoral.

## REFERÊNCIAS

1. Greenig M. Hervs, immunity, and autoimmunity: Understanding the connection. **PeerJ** [Internet]. 2019 [cited 2021 May 10];2019(4). Available from: [/pmc/articles/PMC6452852/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/352852/)
2. Xue B, Sechi LA, Kelvin DJ. Human Endogenous Retrovirus K (HML-2) in Health and Disease. Vol. 11, **Frontiers in Microbiology**. Frontiers Media S.A.; 2020.
3. Khan AS, Martin MA. Endogenous murine leukemia proviral long terminal repeats contain a unique 190-base-pair insert. **Proc Natl Acad Sci U S A** [Internet]. 1983 [cited 2021 May 10];80(9):2699–703. Available from: [/pmc/articles/PMC393895/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/273895/)
4. Vargiu, L., Rodriguez-Tomé, P., Sperber, G. O., Cadeddu, M., Grandi, N., Blikstad, V., Tramontano, E., & Blomberg, J. (2016). Classification and characterization of human endogenous retroviruses mosaic forms are common. **Retrovirology**, 13(1), 1–29. <https://doi.org/10.1186/s12977-015-0232-y>
5. Freimanis, G., Hooley, P., Ejtehadi, H. D., Ali, H. A., Veitch, A., Rylance, P. B., Alawi, A., Axford, J., Nevill, A., Murray, P. G., & Nelson, P. N. (2010). A role for human endogenous retrovirus-K (HML-2) in rheumatoid arthritis: Investigating mechanisms of pathogenesis. **Clinical and Experimental Immunology**, 160(3), 340–347. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2010.04110.x>
6. Escalera-Zamudio M, Greenwood AD. On the classification and evolution of endogenous retrovirus: Human endogenous retroviruses may not be “human” after all [Internet]. Vol. 124, **APMIS**. Blackwell Munksgaard; 2016 [cited 2021 Apr 16]. p. 44–51. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26818261/>
7. Tönjes RR, Löwer R, Boller K, Denner J, Hasenmaier B, Kirsch H, et al. HERV-K: The biologically most active human endogenous retrovirus family. In: Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology [Internet]. **Lippincott Williams and Wilkins**; 1996 [cited 2021 Apr 17]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8797733/>
8. Garcia-Montojo M, Doucet-O'Hare T, Henderson L, Nath A. Human endogenous retrovirus-K (HML-2): a comprehensive review. **Crit Rev Microbiol**. 2018 Nov;44(6):715-738. doi: 10.1080/1040841X.2018.1501345. Epub 2018 Oct 14. PMID: 30318978; PMCID: PMC6342650.

9. Mayer J, Blomberg J, Seal RL. A revised nomenclature for transcribed human endogenous retroviral loci. **Mob DNA**. 2011 May 4;2(1):7. doi: 10.1186/1759-8753-2-7. PMID: 21542922; PMCID: PMC3113919.
10. 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 Apr 17];13(1):1–25. Available from: <https://link.springer.com/articles/10.1186/s12977-016-0301-x>
11. Sha M, Lee X, Li X ping, Veldman GM, Finnerty H, Racie L, et al. Syncytin is a captive retroviral envelope protein involved in human placental morphogenesis. **Nature** [Internet]. 2000 Feb 17 [cited 2021 Jun 1];403(6771):785–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10693809/>
12. Noorali S, Rotar IC, Lewis C, Pestaner JP, Pace DG, Sison A, et al. Role of HERV-W syncytin-1 in placentation and maintenance of human pregnancy. **Appl Immunohistochem Mol Morphol** [Internet]. 2009 Jul [cited 2021 Jun 1];17(4):319–28. Available from: [https://journals.lww.com/appliedimmunohist/Fulltext/2009/07000/Role\\_of\\_HERV\\_W\\_Syncytin\\_1\\_in\\_Placentation\\_and.9.aspx](https://journals.lww.com/appliedimmunohist/Fulltext/2009/07000/Role_of_HERV_W_Syncytin_1_in_Placentation_and.9.aspx)
13. Katoh I, Kurata SI. Association of endogenous retroviruses and long terminal repeats with human disorders. **Front Oncol** [Internet]. 2013 [cited 2021 Jun 1];3 SEP. Available from: </pmc/articles/PMC3769647/>
14. Gao, Y., Yu, X. F., & Chen, T. (2021). Human endogenous retroviruses in cancer: Expression, regulation and function (Review). In *Oncology Letters* (Vol. 21, Issue 2). Spandidos Publications. <https://doi.org/10.3892/ol.2020.12382>
15. Cherkasova E, Scrivani C, Doh S, Weisman Q, Takahashi Y, Harashima N, et al. Detection of an immunogenic HERV-E envelope with selective expression in clear cell kidney cancer. **Cancer Res** [Internet]. 2016 Apr 15 [cited 2021 May 10];76(8):2177–85. Available from: </pmc/articles/PMC4873424/>
16. Van der Kuyl AC. HIV infection and HERV expression: A review [Internet]. Vol. 9, *Retrovirology*. **Retrovirology**; 2012 [cited 2021 Apr 17]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22248111/>
17. Perron H, Geny C, Laurent A, Mouriquand C, Pellat J, Perret J, et al. Leptomeningeal cell line from multiple sclerosis with reverse transcriptase activity and viral particles.

- Res Virol** [Internet]. 1989 [cited 2021 May 10];140(C):551–61. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2482522/>
18. Perron H, Garson JA, Bedin F, Beseme F, Paranhos-Baccala G, Komurian-Pradel F, et al. Molecular identification of a novel retrovirus repeatedly isolated from patients with multiple sclerosis. **Proc Natl Acad Sci U S A** [Internet]. 1997 Jul 8 [cited 2021 May 10];94(14):7583–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9207135/>
  19. Komurian-Pradel F, Paranhos-Baccala G, Bedin F, Ounanian-Paraz A, Sodoyer M, Ott C, et al. Molecular cloning and characterization of MSR/V-related sequences associated with retrovirus-like particles. **Virology** [Internet]. 1999 Jul 20 [cited 2021 May 10];260(1):1–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10405350/>
  20. Trela M, Nelson PN, Rylance PB. The role of molecular mimicry and other factors in the association of Human Endogenous Retroviruses and autoimmunity. **Apmis**. 2016;124(1–2):88–104.
  21. Sicat J, Sutkowski N, Huber BT. Expression of human endogenous retrovirus HERV-K18 superantigen is elevated in juvenile rheumatoid arthritis. **J Rheumatol**. 2005;32(9):1821–31.
  22. Maidhof W, Hilas O. Lupus: An overview of the disease and management options. **P T** [Internet]. 2012 Apr [cited 2021 May 10];37(4):240–9. Available from: </pmc/articles/PMC3351863/>
  23. Filippi, M., Bar-Or, A., Piehl, F., Preziosa, P., Solari, A., Vukusic, S., & Rocca, M. A. (2018). Multiple sclerosis. **Nature Reviews Disease Primers** 2018 4:1, 4(1), 1–27. <https://doi.org/10.1038/s41572-018-0041-4>
  24. Arru, G., Mameli, G., Astone, V., Serra, C., Huang, Y.-M., Link, H., Fainardi, E., Castellazzi, M., Granieri, E., Fernandez, M., Villoslada, P., Fois, M. L., Sanna, A., Rosati, G., Dolei, A., & Sotgiu, S. (2007). Multiple Sclerosis and HERV-W/MSRV: A Multicentric Study. **International Journal of Biomedical Science : IJBS**, 3(4), 292. </pmc/articles/PMC3614662/>
  25. Tarlinton, R., Wang, B., Morandi, E., Gran, B., Khaiboullin, T., Martynova, E., Rizvanov, A., & Khaiboullina, S. (2020). Differential expression of HERV-W in peripheral blood in multiple sclerosis and healthy patients in two different ethnic groups. **Frontiers in Pharmacology**, 10, 1645. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2019.01645/BIBTEX>
  26. Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2015). **Imunologia Celular e Molecular**, 1260.

27. Germano, J. L., Reis-Pardal, J., Tonin, F. S., Pontarolo, R., Melchior, A. C., & Fernandez-Llimos, F. (2021). Prevalence of rheumatoid arthritis in South America: a systematic review and meta-analysis. *Ciencia & Saude Coletiva*, 26(suppl 3), 5371–5382. <https://doi.org/10.1590/1413-812320212611.3.05152020>.
28. Maria L, Afonso B, Viegas C. Diretrizes para o diagnóstico da artrite reumatoide. **Rev Bras Reumatol**. 2013;53(2):141–57.
29. Murphy, K., & Weaver, C. (2016). **Janeway's Immunobiology**. In **Janeway's Immunobiology**. <https://doi.org/10.1201/9781315533247>
30. Bo M, Niegowska M, Erre GL, Piras M, Longu MG, Manchia P, et al. Rheumatoid arthritis patient antibodies highly recognize IL-2 in the immune response pathway involving IRF5 and EBV antigens. **Sci Rep** [Internet]. 2018;8(1):1–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-19957-z>
31. Balada E, Vilardell-Tarrés M, Ordi-Ros J. Implication of human endogenous retroviruses in the development of autoimmune diseases. **Int Rev Immunol**. 2010;29(4):351–70.
32. Rolland A, Jouvin-Marche E, Viret C, Faure M, Perron H, Marche PN. The Envelope Protein of a Human Endogenous Retrovirus-W Family Activates Innate Immunity through CD14/TLR4 and Promotes Th1-Like Responses. **J Immunol** [Internet]. 2006 Jun 15 [cited 2021 Jun 25];176(12):7636–44. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16751411/>.
33. 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 2021 Jun 25];4(JUN). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23805135/>.
34. Rodrigues, L. S., da Silva Nali, L. H., Leal, C. O. D., Sabino, E. C., Lacerda, E. M., Kingdon, C. C., Nacul, L., & Romano, C. M. (2019). HERV-K and HERV-W transcriptional activity in myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome. **Auto-Immunity Highlights**, 10(1). <https://doi.org/10.1186/S13317-019-0122-8>
35. Nali, L. H., Olival, G. S., Montenegro, H., da Silva, I. T., Dias-Neto, E., Naya, H., Spangenberg, L., Penalva-de-Oliveira, A. C., & Romano, C. M. (2022). Human endogenous retrovirus and multiple sclerosis: A review and transcriptome findings. **Multiple Sclerosis and Related Disorders**, 57. <https://doi.org/10.1016/J.MSARD.2021.103383>

36. Nali, L. H. S., Oliveira, A. C. S., Alves, D. O., Caleiro, G. S., Nunes, C. F., Gerhardt, D., Succi, R. C. M., Romano, C. M., & Machado, D. M. (2017). Expression of human endogenous retrovirus K and W in babies. **Archives of Virology**, 162(3), 857–861. <https://doi.org/10.1007/S00705-016-3167-2>
37. Nellåker C, Yao Y, Jones-Brando L, Mallet F, Yolken RH, Karlsson H. Transactivation of elements in the human endogenous retrovirus W family by viral infection. **Retrovirology** [Internet]. 2006 Jul 6 [cited 2021 Jun 25];3. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16822326/>.
38. Toufaily C, Landry S, Leib-Mosch C, Rassart E, Barbeau B. Activation of LTRs from different human endogenous retrovirus (HERV) families by the HTLV-1 tax protein and T-cell activators. **Viruses** [Internet]. 2011 Nov [cited 2021 Jun 25];3(11):2146–59. Available from: [/pmc/articles/PMC3230845/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2230845/).
39. Nali LH da S. Perfil da expressão dos retrovírus endógenos humanos da família W em pacientes com esclerose múltipla [Internet]. [São Paulo]: **Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da Universidade de São Paulo**; 2018 [cited 2021 Jun 29]. Available from: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/99/99131/tde-26042018-115451/>.
40. Xiao, B. G., Linington, C., & Link, H. (1991). Antibodies to myelin-oligodendrocyte glycoprotein in cerebrospinal fluid from patients with multiple sclerosis and controls. **Journal of Neuroimmunology**, 31(2), 91–96. [https://doi.org/10.1016/0165-5728\(91\)90014-X](https://doi.org/10.1016/0165-5728(91)90014-X)
41. Mantegazza, R., Cristaldini, P., Bernasconi, P., Baggi, F., Pedotti, R., Piccini, I., Mascoli, N., la Mantia, L., Antozzi, C., Simoncini, O., Cornelio, F., & Milanese, C. (2004). Anti-MOG autoantibodies in Italian multiple sclerosis patients: Specificity, sensitivity and clinical association. **International Immunology**, 16(4), 559–565. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxh056>
42. Greiner M, Sohr D, Göbel P. A modified ROC analysis for the selection of cut-off values and the definition of intermediate results of serodiagnostic tests. **Journal Immunology Methods**. 1995;185(1):123-32.
43. Blanco, R. D., Fidelis, C. F., Araujo, L. S., Henao, A. M., Cardona, J. A., Guimarães, J. D., Vargas, M. I., & Patarroyo, J. H. (2014). Desenvolvimento e padronização do Dot-ELISA usando peptídeos recombinantes para o diagnóstico sorológico de *Neospora caninum*. **Pesqui. Vet. Bras**, 34(8), 723–727. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2014000800002>

44. Owji, H., Nezafat, N., Negahdaripour, M., Hajiebrahimi, A., & Ghasemi, Y. (2018). A comprehensive review of signal peptides: Structure, roles, and applications. **European Journal of Cell Biology**, 97(6), 422–441. <https://doi.org/10.1016/J.EJCB.2018.06.003>
45. Balestrieri, E., Pica, F., Matteucci, C., Zenobi, R., Sorrentino, R., Argaw-Denboba, A., Cipriani, C., Bucci, I., & Sinibaldi-Vallebona, P. (2015). Transcriptional Activity of Human Endogenous Retroviruses in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. **BioMed Research International**, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/164529>
46. Charvet, B., Pierquin, J., Brunel, J., Gorter, R., Quétard, C., Horvat, B., Amor, S., Portoukalian, J., & Perron, H. (2021). Human Endogenous Retrovirus Type W Envelope from Multiple Sclerosis Demyelinating Lesions Shows Unique Solubility and Antigenic Characteristics. **Virologica Sinica**, 36(5), 1006. <https://doi.org/10.1007/S12250-021-00372-0>
47. Arru, G., Sechi, E., Mariotto, S., Farinazzo, A., Mancinelli, C., Alberti, D., Ferrari, S., Gajofatto, A., Capra, R., Monaco, S., Deiana, G. A., Caggiu, E., Mameli, G., Sechi, L. A., & Sechi, G. (2017). Antibody response against HERV-W env surface peptides differentiates multiple sclerosis and neuromyelitis optica spectrum disorder. **Multiple Sclerosis Journal - Experimental, Translational and Clinical**, 3(4). <https://doi.org/10.1177/2055217317742425>
48. Perron, H., Germi, R., Bernard, C., Garcia-Montojo, M., Deluen, C., Farinelli, L., Faucard, R., Veas, F., Stefanis, I., Fabrick, B. O., Van-Horssen, J., Van-Der-Valk, P., Gerdil, C., Mancuso, R., Saresella, M., Clerici, M., Marcel, S., Creange, A., Cavaretta, R., ... Hartung, H. P. (2012). Human endogenous retrovirus type W envelope expression in blood and brain cells provides new insights into multiple sclerosis disease. **Multiple Sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)**, 18(12), 1721–1736. <https://doi.org/10.1177/1352458512441381>.
49. Agliardi, C., Guerini, F. R., Zanzottera, M., Bolognesi, E., Picciolini, S., Caputo, D., Rovaris, M., Pasanisi, M. B., & Clerici, M. (2023). Myelin Basic Protein in Oligodendrocyte-Derived Extracellular Vesicles as a Diagnostic and Prognostic Biomarker in Multiple Sclerosis: A Pilot Study. **International Journal of Molecular Sciences**, 24(1). <https://doi.org/10.3390/IJMS24010894>
50. Wang, X., Hefton, A., Ni, K., Ukadike, K. C., Bowen, M. A., Eckert, M., Stevens, A., Lood, C., & Mustelin, T. (2022). Autoantibodies Against Unmodified and Citrullinated Human Endogenous Retrovirus K Envelope Protein in Patients With Rheumatoid

- Arthritis. **The Journal of Rheumatology**, 49(1), 26.  
<https://doi.org/10.3899/JRHEUM.201492>
51. Khadjinova, A. I., Wang, X., Laine, A., Ukadike, K., Eckert, M., Stevens, A., Bengtsson, A. A., Lood, C., & Mustelin, T. (2022). Autoantibodies against the envelope proteins of endogenous retroviruses K102 and K108 in patients with systemic lupus erythematosus correlate with active disease. **Clinical and Experimental Rheumatology**, 40(7), 1306–1312.  
<https://doi.org/10.55563/CLINEXPRHEUMATOL/2KG1D8>.
52. Biggar, W. D., Skalsky, A., & McDonald, C. M. (2022). Comparing Deflazacort and Prednisone in Duchenne Muscular Dystrophy. **Journal of Neuromuscular Diseases**, 9(4), 463. <https://doi.org/10.3233/JND-210776>
53. di Lernia, V., & Bardazzi, F. (2016). Profile of tofacitinib citrate and its potential in the treatment of moderate-to-severe chronic plaque psoriasis. *Drug Design, Development and Therapy*, 10, 533–539. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S82599>
54. Taylor, P. C., Keystone, E. C., van der Heijde, D., Weinblatt, M. E., del Carmen Morales, L., Reyes Gonzaga, J., Yakushin, S., Ishii, T., Emoto, K., Beattie, S., Arora, V., Gaich, C., Rooney, T., Schlichting, D., Macias, W. L., de Bono, S., & Tanaka, Y. (2017). Baricitinib versus Placebo or Adalimumab in Rheumatoid Arthritis. **New England Journal of Medicine**, 376(7), 652–662.  
[https://doi.org/10.1056/NEJMOA1608345/SUPPL\\_FILE/NEJMOA1608345\\_DISCLOSURES.PDF](https://doi.org/10.1056/NEJMOA1608345/SUPPL_FILE/NEJMOA1608345_DISCLOSURES.PDF)
55. Sheppard, M., Laskou, F., Stapleton, P. P., Hadavi, S., & Dasgupta, B. (2017). Tocilizumab (Actemra). **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, 13(9), 1972.  
<https://doi.org/10.1080/21645515.2017.1316909>
56. Arru G, Caggiu E, Leoni S, Mameli G, Pugliatti M, Sechi GP, Sechi LA. Natalizumab modulates the humoral response against HERV-Wenv73-88 in a follow-up study of Multiple Sclerosis patients. **J Neurol Sci**. 2015 Oct 15;357(1-2):106-8. doi: 10.1016/j.jns.2015.07.007. Epub 2015 Jul 8. PMID: 26190523.
57. Mameli, G., Erre, G. L., Caggiu, E., Mura, S., Cossu, D., Bo, M., Cadoni, M. L., Piras, A., Mundula, N., Colombo, E., Buscetta, G., Passiu, G., & Sechi, L. A. (2017). Identification of a HERV-K env surface peptide highly recognized in Rheumatoid Arthritis (RA) patients: a cross-sectional case-control study. **Clinical and Experimental Immunology**, 189(1), 127–131. <https://doi.org/10.1111/CEI.12964>

## ANEXOS

### Anexo 1- Aprovação do comitê de ética da Universidade Santo Amaro (UNISA)

UNIVERSIDADE DE SANTO  
AMARO - UNISA



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** PERFIL DE EXPRESSÃO DE RETROVÍRUS ENDÓGENOS HUMANOS E RESPOSTA HUMORAL ANTI HERVK E W EM PACIENTES COM ARTRITE

**Pesquisador:** BRUNA REIMBERG FLOSE

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 51680621.7.0000.0081

**Instituição Proponente:** OBRAS SOCIAIS E EDUCACIONAIS DE LUZ

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 5.046.978

**Apresentação do Projeto:**

JÁ REALIZADO

**Objetivo da Pesquisa:**

JÁ INFORMADO

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

JÁ INFORMADO

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

JÁ INFORMADO

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

FALTAVAM TERMO DE CONFIDENCIALIDADE QUE FOI APRESENTADO E TERMO DE COPARTICIPAÇÃO NÃO NECESSÁRIO POIS É POR CONVENIENCIA

**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 Profª Enílea 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

UNIVERSIDADE DE SANTO  
AMARO - UNISA



Continuação do Parecer: 5.046.978

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_1812927.pdf	14/10/2021 16:31:10		Aceito
Outros	carta_ao_cep.docx	14/10/2021 16:30:53	Luiz Henrique da Silva Nali	Aceito
Outros	termo_de_confidencialidade.pdf	14/10/2021 16:29:12	Luiz Henrique da Silva Nali	Aceito
Parecer Anterior	pareceranterior.docx	08/09/2021 10:48:58	Luiz Henrique da Silva Nali	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_BRUNA_REIMBERG.docx	08/09/2021 10:47:11	Luiz Henrique da Silva Nali	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Reimberg_final.docx	08/09/2021 10:45:27	Luiz Henrique da Silva Nali	Aceito
Folha de Rosto	FRNali.pdf	08/09/2021 10:44:34	Luiz Henrique da Silva Nali	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

SÃO PAULO, 19 de Outubro de 2021

---

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

**Endereço:** Rua Profª Enlea de Siqueira Neto, 340

**Bairro:** Jardim das Imbuías

**CEP:** 02.450-000

**UF:** SP

**Município:** SÃO PAULO

**Telefone:** (11)2141-8887

**E-mail:** pesquisaunisa@unisa.br

**Anexo 2-** Termo de consentimento livre e esclarecido assinado pelos pacientes do estudo

### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO**

#### **PROTOCOLO: EXPRESSÃO E RESPOSTA HUMORAL ANTI RETROVÍRUS ENDÓGENO HUMANOS EM PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE**

Estes esclarecimentos estão sendo apresentados para solicitar sua participação no projeto **PERFIL DE EXPRESSÃO DE RETROVÍRUS ENDÓGENOS HUMANOS E RESPOSTA HUMORAL ANTI HERV-K E W EM PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE** do programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Santo amaro – UNISA, que será realizado pela pesquisadora **Bruna Reimberg Flose** 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 Artrite Reumatoide (AR) com o objetivo de avaliar o perfil de expressão de Retrovírus endógenos humanos (HERVs) e a resposta humoral anti HERV em pacientes da zona sul de São Paulo. Gostaríamos de investigar a frequência e níveis de expressão dos HERVs K e W e investigar os níveis de IgG anti peptídeos de HERV-W e K em pacientes com AR. 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 ti. 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 compreender a expressão do Retrovírus Endógeno Humano na população e a possível etiologia da Artrite Reumatoide.

#### 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 a biomédica **Bruna Reimberg Flose** 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, \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

\_\_\_\_\_  
(Bruna Reimberg Flose)

\_\_\_\_\_  
(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 / /

**Anexo 3- Questionário respondido pelos voluntários do estudo****Ficha Inicial****N°**

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

NOME: \_\_\_\_\_

DATA DE NASCIMENTO: \_\_\_\_\_ IDADE: \_\_\_\_\_

ETINIA:  NEGRA  PARDA  BRANCA  ORIENTAL  INDIGENASEXO:  FEMININO  MASCULINO

ANO DE DIAGNÓSTICO DA DOENÇA: \_\_\_\_\_

UTILIZA DE ALGUM MEDICAMENTO PARA ARTRITE REUMATOIDE?  
\_\_\_\_\_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 ÚLTIMA PROFISSÃO:  
\_\_\_\_\_OBSERVAÇÕES RELEVANTES:  
\_\_\_\_\_