

UNIVERSIDADE SANTO AMARO
Curso de Ciências Biológicas

Samuel Nascimento Santos

**ANÁLISE DA RESPOSTA HUMORAL ANTI HERV-K E ANTI HERV-W
EM PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE**

São Paulo
2023

Samuel Nascimento Santos

**ANÁLISE DA RESPOSTA HUMORAL ANTI HERV-K E ANTI HERV-W
EM PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Ciências Biológicas
da Universidade Santo Amaro – UNISA,
como requisito parcial para obtenção do
título Bacharel em Ciências Biológicas

Orientador: Prof. Dr. Luiz Henrique da Silva
Nali

São Paulo

2023

S233a

Santos, Samuel Nascimento

Análise da resposta humoral Anti HERV-K e Anti HERV-W em pacientes com artrite reumatoide / Samuel Nascimento Santos. - 2023.

40 f. : il., P&B.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Henrique da Silva Nali.

TCC Graduação. (Curso Superior em Ciências Biológicas) - Universidade Santo Amaro, 2023.

Bibliografia incluída.

1. Artrite reumatoide. 2. HERV-K e W. 3. Autoimune. I. Nali, Luiz Henrique da Silva. II. Universidade Santo Amaro. III. Título.

CDD 616.723

Samuel Nascimento Santos

**ANÁLISE DA RESPOSTA HUMORAL ANTI HERV-K E ANTI HERV-W
EM PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Ciências Biológicas da Universidade Santo Amaro- UNISA, como requisito parcial para orientação do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Henrique da Silva Nali

São Paulo, ____ de _____ de _____

Banca Examinadora

Prof. Dra. Marina Tiemi Shio

Prof. Dra. Giovana dos Santos Caleiro

Prof. Dr. Luiz Henrique da Silva Nali

Conceito Final

RESUMO

Introdução: Os Retrovírus Endógenos Humanos (HERVs) são vírus que infectaram células germinativas dos nossos ancestrais a milhões de anos atrás. Esses vírus se integraram e se fixaram no genoma humano, foram transmitidos pelas gerações e hoje sabemos que cerca de 8% do genoma humano é composto por sequências dos HERVs. Durante a evolução humana, muitos desses eventos ocorreram e resultaram no surgimento de várias famílias de HERVs. Eles foram acumulando várias mutações, como stop códons dentro do gene, genes isolados ou um único *Long Terminal Repeats* (LTRs) espalhados em todos os cromossomos. Embora a maioria dos genes de HERVs estejam silenciados ou isolados, o vírion pode ser formado pela combinação das proteínas virais traduzidas dos genes em diferentes regiões do genoma. 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 as outras doenças autoimunes estão sendo estudadas de forma escassa, em especial a Artrite Reumatoide (AR). Essa doença não apresenta etiologia definida e os pacientes acometidos pela doença podem apresentar quadros graves e consideravelmente debilitantes. O objetivo desse estudo é avaliar a resposta humoral anti HERV em pacientes com AR

Métodos: Um tubo de sangue seco foi coletado de cada voluntário para realização do Ensaio Imunoenzimático (ELISA) e verificação da resposta humoral (IgG) nos pacientes com AR a fim de verificar níveis de produção de anticorpos específicos e circulantes anti peptídeos específicos de HERV-K e W.

Resultados: Dos pacientes coletados foram utilizados 31 indivíduos com AR e 31 indivíduos saudáveis pareados por sexo e idade sem histórico de doenças autoimunes. A padronização do ELISA teve como melhores resultados a utilização de tampão de Bicarbonato/Carbonato pH 9,6 para a diluição 1/100 do peptídeo, bloqueio com SFB 3% em tampão de lavagem, diluição do soro 1:500 em PBS, secundário em 1:5000 em tampão de lavagem. Os pacientes com AR tiveram uma resposta humoral abaixo do grupo controle.

Discussão: O que possivelmente aconteceu foi que os medicamento anti-inflamatórios abaixou o nível de expressão do HERV e consequentemente uma menor resposta humoral e os pacientes não foram coletados em surto da doença.

Conclusão: É preciso realizar novamente esse estudo com pacientes sem o tratamento com anti-inflamatórios e se possível em surto, pois a resposta humoral dos pacientes com AR foi baixa.

Palavras chaves: Artrite Reumatoide, HERV-K e W, autoimunidade.

ABSTRACT

Introduction: Human Endogenous Retroviruses (HERVs) are viruses that infected the germ cells of our ancestors millions of years ago. These viruses integrated and became fixed in the human genome, were passed down through generations, and today we know that about 8% of the human genome consists of HERV sequences. Throughout human evolution, many of these events occurred, resulting in the emergence of various HERV families. They accumulated various mutations, such as stop codons within genes, isolated genes, or a single Long Terminal Repeats (LTRs) scattered across all chromosomes. Although most HERV genes are silenced or isolated, the virion can be formed by the combination of viral proteins translated from genes in different regions of the genome. These viruses have been associated with a possible role in the pathogenesis of autoimmune diseases, especially Multiple Sclerosis (MS) and Systemic Lupus Erythematosus (SLE), but other autoimmune diseases are being sparsely studied, especially Rheumatoid Arthritis (RA). This disease lacks a defined etiology, and affected patients may experience severe and considerably debilitating symptoms. The aim of this study is to evaluate the humoral anti-HERV response in patients with RA. **Methods:** A dried blood tube was collected from each volunteer for Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) to assess the humoral (IgG) response in RA patients, checking levels of production of specific antibodies and circulating antibodies against specific HERV-K and W peptides. **Results:** Among the collected patients, 31 individuals with RA and 31 healthy individuals matched by gender and age with no history of autoimmune diseases were used. The ELISA standardization showed the best results with the use of pH 9.6 Bicarbonate/Carbonate buffer for a 1/100 peptide dilution, blocking with 3% BSA in wash buffer, serum dilution of 1:500 in PBS, and secondary antibody at 1:5000 in wash buffer. RA patients had a humoral response lower than the control group. **Discussion:** What likely occurred was that anti-inflammatory medications lowered the expression level of HERV and consequently resulted in a lower humoral response, and patients were not collected during disease flare-ups. **Conclusion:** It is necessary to conduct this study again with patients not undergoing anti-inflammatory treatment and preferably during disease flare-ups, as the humoral response of RA patients was low.

Keywords: Rheumatoid Arthritis, HERV-K and W, autoimmunity.

Agradecimentos

Agradeço principalmente a minha família, por todo o apoio dado durante toda a minha graduação, sem eles eu não conseguiria chegar até esse grande momento. Saber que a minha família está ali me dá confiança para que eu possa ir em frente, mesmo se errar, pois, sei que terei um ponto para recomeçar.

Agradeço imensamente ao meu orientador Prof^o Dr. Luiz Henrique da Silva Nali, por ter me aceito como aluno, por ter me dado essa grande oportunidade para me torna um cientista na área que gosto. Pela confiança e pelas conversas que tivemos onde eu achava que estava diante de uma montanha e simplesmente ela se transformava em uma pequena rocha.

Agradeço muito a Mestre Bruna Reimberg Flose por ter me permitido fazer parte desse projeto, por ter me ensinado e por toda a convivência que tivemos.

Sou muito grato a Prof^a Dra. Marina Tiemi Shio por toda a ajuda fornecida, por sanar muitas curiosidades que tinha no laboratório e por responder minhas dúvidas.

Agradeço a toda turma do laboratório por todo o companheirismo, risos, ensinamentos, paciência, brincadeira e ajuda com o projeto para que ele andasse. Quero agradecer principalmente as futuras biomédicas Michelly Damasceno e Sara Coelho Rangel (e futura Mestra) e ao futuro farmacêutico Fernando Minervino.

Agradeço aos voluntários que aceitaram fazer parte da pesquisa, sem vocês a pesquisa não teria ido para frente.

*“A pessoa que diz que não pode ser feito
não deve interromper a pessoa que está fazendo”*
Provérbio chinês

Tabela de Ilustração

Figura 1: Estrutura do Genoma de um Retrovírus	1
Figura 2: Teste de Tampão.....	15
Figura 3: Teste de bloqueio.....	16
Figura 4: Teste de diluição do peptídeo.....	17
Figura 5: Comparação do C e o com AR nos peptídeos para HERV-W.....	20
Figura 6: Comparação do C e o com AR nos peptídeos para HERV-K.....	21

Lista de Tabelas

Tabela 1: Comparação das proteínas dos HERVs K e W com as proteínas próprias do organismo.....	12
Tabela 2: Tabelas dos peptídeos que foram sintetizados.....	13
Tabela 3: Comparação dos peptídeos com a MOG.....	14
Tabela 4: Parâmetros diagnósticos encontrados dos diferentes peptídeos realizados no ELISA.....	18
Tabela 5: Questionário dos voluntários.....	19
Tabela 6: Porcentagem dos peptídeos.....	22

Lista de Abreviaturas

HERV	Retrovírus Endógeno Humano
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
RNA	Ácido Ribonucleico
ERV	Retrovírus Endógeno
GAG	Antígeno Específico do Grupo (<i>antígeno específico do grupo</i>)
POL	Polimerase
ENV	Envelope
LTR	<i>Long Terminal Repeat</i>
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
EM	Esclerose Múltipla
HTLV	Vírus T-Linfotrópico Humano
PCR	Reação da Cadeira Polimerase
AR	Artrite Reumatoide
HLA-DR	Antígenos Leucocitários Humano
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
IL	Interleucina
TLR4	Receptores Toll-Like 4
C	Controle
NCBI	National Center for Biotechnology Information
SFB	Soro Fetal Bovino
PBS	Tampão Fosfato-salino (<i>phosphate buffered saline</i>)
HCL	Ácido Clorídrico
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
MOG	Glicoproteína da Mielina de Oligodendrócitos
BSA	Albumina de Soro Bovino
AC	Antígeno
IgG	Imunoglobulina G

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 OS RETROVÍRUS ENDÓGENOS HUMANOS (HERVs)	1
1.2 HERVs NO GENOMA HUMANO	2
1.4 PAPEL DOS HERVs NA FISILOGIA HUMANA	3
1.5 PAPEL DOS HERVs EM DOENÇAS	4
1.5.1 CÂNCER	4
1.5.2 HIV	5
1.5.3 DOENÇAS AUTOIMUNES	5
1.6 ARTRITE REUMATOIDE	6
2 JUSTIFICATIVA	8
3 OBJETIVOS	9
3.1 OBJETIVO GERAL	9
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	9
4 MÉTODOS	10
4.1 PACIENTES	10
4.2 LOGÍSTICA LABORATORIAL	10
4.3 SÍNTESE DE PROTEÍNA	10
4.4 ELISA INDIRETO PARA A DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-HERVs ...	11
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	11
5 RESULTADOS	12
6 DISCUSSÃO	23
7 CONCLUSÃO	24
8 REFERÊNCIAS	25

1 INTRODUÇÃO

1.1 OS RETROVÍRUS ENDÓGENOS HUMANOS (HERVs)

Os retrovírus fazem parte de uma família bem diversificada e amplamente distribuídas de vírus RNA, que possuem a capacidade de reverter a transcrição de seus genomas 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, Pol e Env, ou genomas complexos (lentivírus, deltaretrovírus e spumavírus), que produzem proteínas adicionais e RNA's com diversas funções de virulência-aprimoramento.¹

Figura 1 – Estrutura do genoma de um retrovírus



Modelo de onde está localizado os genes GAG (*group-specific antigen*), POL (Polimerase), ENV (Envelope) e as LTR (*Long Terminal Repeat*) dentro de um retrovírus exógeno.

O genoma humano é formado de 8% de genomas elementos virais, chamados de Retrovírus endógenos humanos (HERVs), esses genomas elementos estão presentes nos humanos devido aos antigos eventos de integração retroviral nas células germinativas de nossos antepassados. Essa integração é conhecida como endogenização e provavelmente ocorreu várias vezes ao longo dos anos e da evolução dos mamíferos, há estimativas de que essas integrações tenham ocorrido há mais de 100 milhões de anos em alguns casos.² Quando houve a incorporação inicial no genoma hospedeiro, os HERVs passaram a ser herdados de forma mendeliana (transmissão hereditária), e não mais por transmissão horizontal típica de um vírus infeccioso. Além disso, eles também foram submetidos à seleção natural, o que acabou impedindo a expressão de alguns ou de todos os genes provirais por meio

do acúmulo de mutações, como a presença de stop códons ou perda parcial dos genes.³

Existem duas explicações que são aceitas sobre os principais mecanismos utilizados para os ERVs (retrovírus endógeno) se proliferarem nos genomas: reinfecção germinal, que consiste em um vírus endogenizado que pode se inserir diretamente em uma célula germinativa por meio da fase de replicação viral e retrotransposição, que é 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.^{3,4}

1.2 HERVs NO GENOMA HUMANO

O genoma humano possui uma proporção de elementos repetidos, podemos citar os retrovírus endógenos humanos (HERVs), que representam cerca de 8 % de todo o genoma. 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, não existem indícios que esses vírus possam ser transmitidos de maneira horizontal.^{4,5}

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.⁶ 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.⁴ Essas que serão discutidas nos tópicos a seguir.

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.⁷ Os HERVs acumularam uma série de mutações no decorrer da evolução humana. A grande maioria dos HERVs se encontram 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, mas ainda existem alguns grupos de HERV, como HERV-K, que é descrito como um dos mais ativos no genoma humano.^{5,8}

O HERV-W tem um papel central na placentação. Isso porque alguns estudos demonstraram que o 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.⁹

A inserção de HERVs e retrotransposons LTR aparentes de mamíferos 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 por reativação. Há indícios que a alta ativação de LTR desencadeia doenças malignas e respostas autoimunes, existe também estudos que mostraram que uma ativação LTR da família MaLR na patogênese do linfoma de Hodgkin e uma expressão do antígeno HERV-E em uma resposta imune ao carcinoma de células renais.¹⁰

1.5 PAPEL DOS HERVs EM DOENÇAS

Os HERVs podem ser associados a inúmeras doenças, incluindo doenças do sistema nervoso (esclerose múltipla), doenças infecciosas (HIV), doenças autoimunes (artrite reumatoide) e tumores malignos, nesses casos em sua grande maioria é possível observar expressão aberrante de HERVs.

1.5.1 CÂNCER

Alguns estudos indicam que a expressão de HERVs pode estar relacionado com alguns estágios de câncer, como por exemplo o de mama e carcinoma hepatocelular. Devido a capacidade dos HERVs de ativar múltiplas vias de sinalização oncogênica, que acaba ativando a proliferação de células cancerígenas e suprimem sua diferenciação e apoptose. Os HERVs têm a capacidade de ativar vias de sinalização oncogênicas, essa ativação da origem a células cancerígenas, que acaba suprimindo a diferenciação e apoptose original dessas células. Essa expressão mais elevada em tecidos comprometidos está relacionada aos genes estruturais do HERV, que são expressos em diferentes níveis ou com diferentes variantes, isso inclui mRNAs de comprimento completo, mRNAs emendadas, RNAs não codificadas, 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 também está relacionado a expressão de HERV.¹¹

Um estudo realizado por Cherkasova E. et.al 2016 e colaboradores mostraram que 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 ele 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 do câncer.¹²

1.5.2 HIV

O HIV pode induzir a transcrição do HERV, isso acaba ocasionando à expressão de proteína HERV induzida. Alguns estudos indicam que as proteínas HERV não possuem a capacidade de complementar vírions defeituosos do HIV, nem o HIV é possui a capacidade de induzir transcrições de HERV, isso acontece provavelmente devido aos baixos níveis de similaridade sequencial, também 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.¹³

1.5.3 DOENÇAS AUTOIMUNES

Na década de 1990, alguns pesquisadores perceberam que os pacientes que possuíam algum Esclerose Múltipla poderiam apresentar vírion com atividade de transcriptase reversa. Mas ao realizarem uma reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção de sequências específicas 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.^{14,15,16}

Existem evidências que associam os HERVs com doenças autoimunes, essa ideia surgiu da descoberta de anticorpos retrovirais no soro de alguns pacientes ou da presença de antígenos no local da doença, seguindo esse seguimento 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 tinham homologias com os HERVs. Com isso surgiu a hipótese de que os HERVs podem ser os responsáveis por induzir os anticorpos antirretovirais que são detectados nesse tipo de doença.^{17,18}

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.¹⁹ 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.¹

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.²⁰ A prevalência da AR é cerca 0,5%-1% da população mundial adulta, em todos os grupos étnicos, tem predomínio entre as mulheres (duas a três vezes em relação ao gênero masculino). Embora existam registros em todas as faixas etárias, as condições ocorrem principalmente em pacientes entre 40 à 60 anos. No Brasil alguns estudos demonstraram que a prevalência é de até 1% na população adulta, o que corresponde a cerca de 1.300.000 pessoas acometidas.²¹

Ela foi considerada uma doença autoimune impulsionada por células B que produzem anti-IgG autoanticorpos (fator reumatoide). Houve a identificação desse fator em alguns indivíduos saudáveis e não foi detectada a presença em alguns pacientes com artrite reumatoide. Um estudo mostrou que a AR tem uma associação com genes de classe II HLA-DR do MHC, está ligada ao haplótipo HLA-DR4, o que acabou sugerindo o envolvimento das células T na patogênese desta doença.²² Portanto, ambas as respostas imunes, humoral e mediada por células, podem acabar por contribuir para o desenvolvimento de sinovite. Podemos citar diversas células que são encontrados 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- γ . Uma hipótese é que as citocinas recrutem leucócitos, que por sua vez vão liberar produtos causando 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.^{20,23}

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. 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.²³

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.²³

A 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.^{24,25}

Estudos clínicos mostraram aumentos nos níveis de anticorpos para proteínas HERV e atividade transcricional HERV em pacientes com AR em comparação com grupos controles, podemos citar 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.^{23,26}

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* de 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.²⁷

Em alguns estudos descreveram uma resposta humoral anti HERV em pacientes com AR²⁷ no entanto, podemos encontrar outras proteínas de HERV que podem estar associados com essa possível resposta autoimune mediada por mimetismo molecular.

2 JUSTIFICATIVA

A Artrite Reumatoide (AR) tem uma prevalência que varia de 0,5 a 1,5% 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 idade inicial para primeiros sintomas é entre 30 à 55 anos, o que gera dificuldades de locomoção e de movimentação progressiva. Em 10 anos quase metade dos pacientes que recebem o diagnóstico de AR vão desenvolver um prejuízo funcional importante.

A AR é uma doença crônica, progressiva e autoimune com etiologia desconhecida que ela afeta o revestimento das articulações causando dores e edemas na região, essa inflamação inicial gerada pela artrite reumatoide pode causar graves problemas, como erosão do osso e deformidade nas articulações bem como debilitar os indivíduos afetados de maneira expressiva. É uma doença que apesar de ter tratamento, não tem cura. A AR não apresenta etiologia definida, no entanto, acredita-se que existam fatores ambientais e genéticos que podem estar associados a essa doença.

Os HERVs podem atuar em processos imunopatogênicos que foram evidenciados previamente com papel de resposta anti HERV através de TLR4 e

processos inflamatório potencialmente tem papel de interferir na expressão dos HERVs. Dessa forma torna-se plausível compreender o possível papel dos HERVs na artrite reumatoide. Nosso grupo identificou sítios de similaridade entre HERV e proteínas humanas. Dados in silico, que serão descritos aqui, revelam regiões de similaridade entre proteínas humanas e HERV K e W, o que sugere que possamos ter resposta cruzada entre HERV e essas proteínas através de mimetismo molecular. Desta forma, compreender o nível transcricional dos HERVs e entender e investigar o papel da resposta imune dos esses HERVs nos fornecerá dados importantes para a compreensão do possível papel da patogênese desses vírus nessa importante doença. E quem sabe, para que possamos desenvolver novos tratamentos.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a resposta humoral anti- HERV-K e Anti HERV-W em pacientes com artrite reumatoide.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar regiões de similaridade entre proteínas de HERVs e proteínas que compõem o sistema articular;
- Realizar a padronização de um ensaio imunoenzimático (ELISA);
- 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.

4.1 PACIENTES

Pacientes com diagnóstico de AR foram recrutados por conveniência em centros parceiros dos pesquisadores envolvidos no estudo, como o ambulatório da Universidade Santo Amaro. Ao todo foram incluídos no estudo cerca de 40 pacientes com laudo confirmatório para artrite reumatoide e com disponibilidade para participar do estudo e foram excluídos pacientes com outro tipo de doença autoimune (Lúpus Eritematoso Sistêmico) e outro tipo de doença reumatoide. Para a seleção desse grupo, contamos com o auxílio da Prof. Dra. Virginia Trevisani, reumatologista colaboradora do estudo, que auxiliou na condução e seleção dos pacientes.

Ao todo foram incluídos no estudo cerca de 31 pacientes com laudo confirmatório para artrite reumatoide. Dados demográficos dos pacientes bem como toda história clínica dos pacientes foram coletados, dados esses que podiam estar envolvidos com um maior risco para o desenvolvimento da doença. 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 coletada 1 amostra de sangue em tubo seco. As amostras coletadas de cada paciente 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 SÍNTESE DE PROTEÍNA

Sequências de proteínas relacionadas a cartilagem e famílias de HERV K e W associadas a AR foram identificadas no banco de dados online do National Center for Biotechnology Information (NCBI) / GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gquery/>). A análise *in-silico* foi realizada usando algoritmos disponíveis publicamente (<http://www.expasy.ch/cgi-bin/protscale.pl>). Os peptídeos serão sintetizados em

colaboração com a Dra. Maria Aparecida Juliano, Departamento de Biofísica, Infar - Universidade Federal de São Paulo.

4.4 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.

4.5 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 $p < 0,05$. 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

Esse estudo faz parte de um estudo maior no qual compõe um projeto de mestrado. Desta forma foi realizada análise *in-silico*, para essa análise teve um treinamento em parceria com o Prof. Dr. Thiago Souza Onofre, 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. 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.

Tabela 1: Comparação das proteínas dos HERVs K e W com as proteínas próprias do organismo

HERV/ Proteína	Referência/ Sequência	Auto-Proteína	Referência/ Sequência	Identificação compartilhada
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

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 (Tabela 1). Como foi possível observar que 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 10 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, na tabela 3 estão descritos alguns desses peptídeos a serem utilizados.

Tabela 2: Tabela dos peptídeos que foram sintetizados

HERV-W	HERV-K
TSSSPYQQ	TIPLAEQDCE
LVGPLVSNL	LGIPTYAMS
	STVKTFTLYLD
	VTHVPSFGR
	ECVANSAVIL
	PWEWGEKGISTP
	SPVSGPEHP
	WSGNQTLETRD

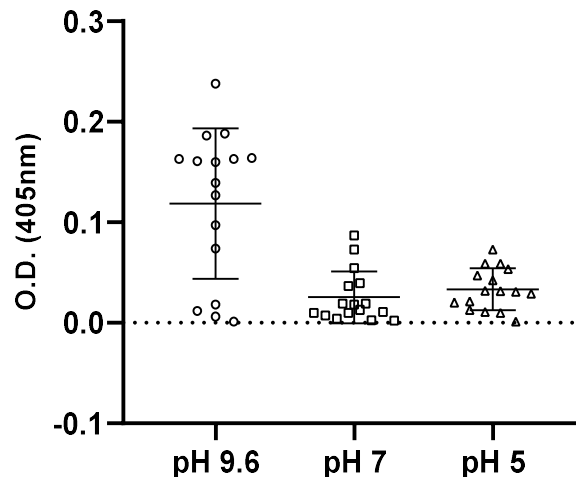
Tabela 3 – Comparação dos peptídeos com a MOG

		Peptídeo	% de similaridade	Aminoácidos Similares
1	HERV-W	LVGPLVSNL	57,10%	VLGPLVA LVGPLVS
2	HERV-K	PWEWGEKGISTP	50%	LSRP ISTP
3	HERV-W	TSSSPYQQ	75%	SSSY SSPY
4	HERV-K	TIPLAEQDCE	57,10%	LAGQFLE LAEQDCE
			71,40%	VIGPRHP VSGPEHP
5	HERV-K	PSVSGPEHP	50%	SLSRPSLP SVSGPEHP
6	HERV-K	WSGNQTLETRD	50%	GDQAPEYR GNQTLETR
7	HERV-K	LGIPTYAMS	50%	PFYWVS PTYAMS
8	HERV-K	ECVANSAVIL	50%	ALII AVIL
			60%	PPFSR PSFGR
9	HERV-K	VTHVPSFR	60%	VPVLG VPSFG
			50%	TFDPHFLR THVPSFGR
10	HERV-K	STVKTFITYLD	50%	FTCF FTLY

Para realizar a padronização do ELISA foi feito testes utilizando a Mielina Oligodendrócito Glicoproteína (MOG) fornecido pela Prof^a Dr. Maria Aparecida Juliano da UNIFESP e soro de pacientes com Esclerose Múltipla^{28,29,30}. De início foi testado o revestimento dos poços da placa de ELISA para saber qual era o melhor tampão, os tampões testados foram o Bicarbonato/Carbonato, PBS e Fosfato, possuindo o pH de 9.6, 7.0 e 5.0 respectivamente, com a MOG diluída em 1:100 e usando os soros de

pacientes com Esclerose Múltipla. Obtendo os resultados da imagem 1 onde o Carbonato/Bicarbonato deu melhores resultados^{31,32,33,34}.

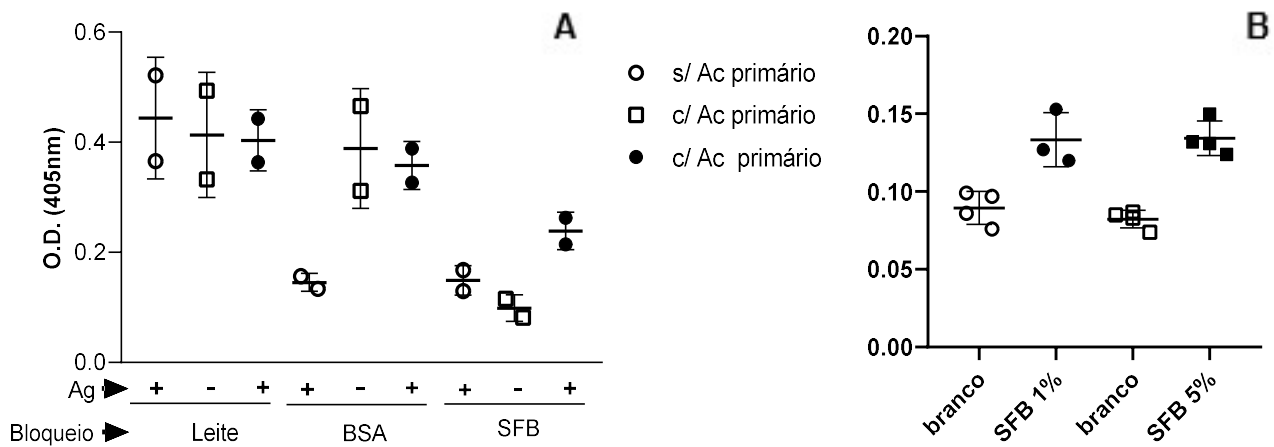
Figura 2 – Teste de tampão



Teste de tampões de revestimento de Carbonato/Bicarbonato pH 9.6, tampão de Fosfato pH 7,0 e PBS pH 5.0, com soro de pacientes com EM nas diluições 1:10, 1:50 e 1:500.

Em seguida foi feito testes para o bloqueio, foram testados leite desnatado, albumina de soro bovino (BSA) e soro fetal bovino (SFB) todos numa concentração de 5% em tampão de lavagem (figura 3A). O BSA e leite não foram o suficiente para impedir a ligação inespecífica, contudo o SFB obteve um bom resultado, essa conclusão foi baseada fazendo a comparação aos respectivos brancos onde o BSA e leite demonstraram um valor alto de densidade ótica e o SFB foi baixo. Do SFB foi feito outro teste com ele a 5% e 1% não demonstrando diferença (figura 3B). Foi chegada à conclusão de que seria melhor usar o SFB com a concentração de 3%.

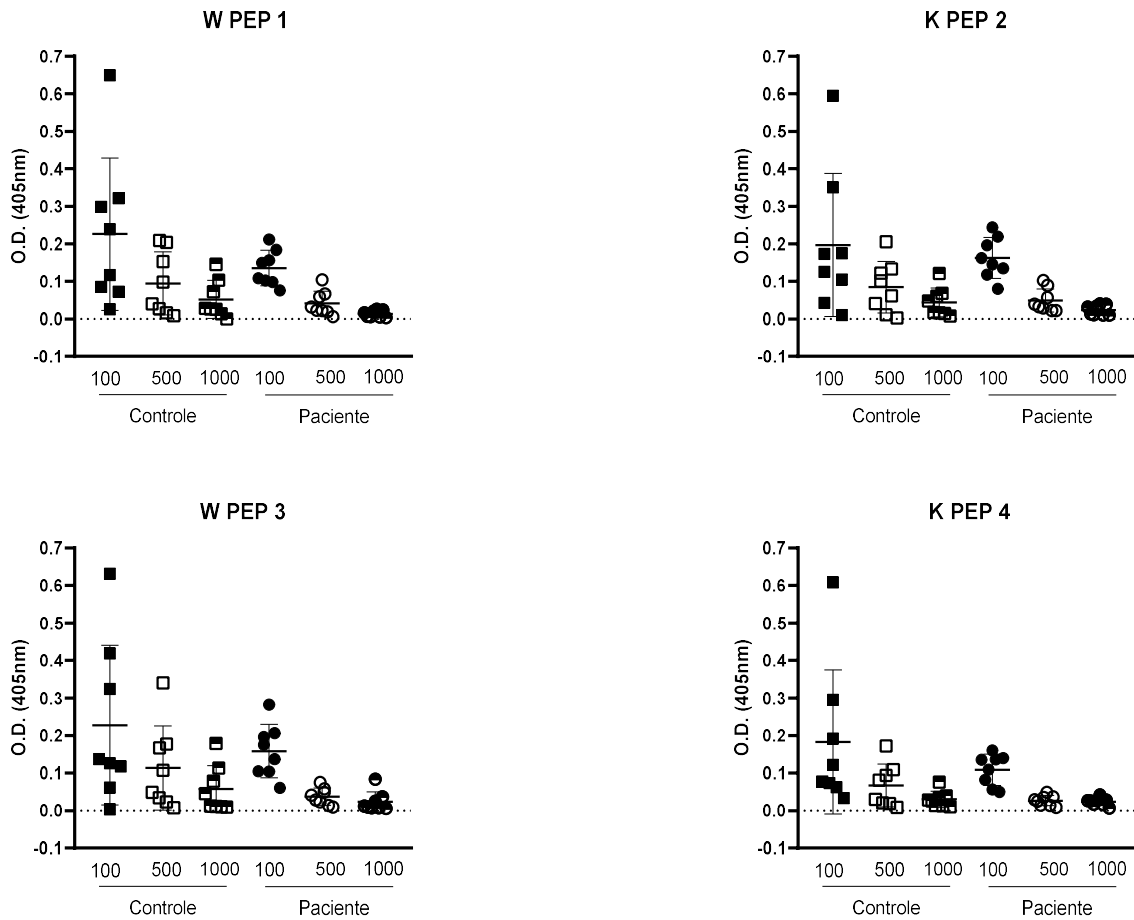
Figura 3 – Teste de bloqueio



Na imagem A são testes de bloqueio com Leite, BSA e SFB a 5% com ou sem a presença do soro dos pacientes com EM, sinalizado com Ac (Anticorpo) primário e poços com e sem o revestimento do Antígeno (Ag) MOG. Na figura B são os testes com SFB com os poços revestidos com a MOG, o SFB foi testado a 5% e 1%.

Por fim foi realizado testes com o Ac primário, soro dos pacientes com AR nas concentrações 1:100, 1:500 e 1:1000, os Ag em Tampão de Bicarbonato/Carbonato, bloqueio com SFB à 3% em tampão de lavagem (PBS Tween 0,1%) e o anticorpo secundário IgG anti-humano de bode conjugado com peroxidase em diluição 1:5000 também com SFB em tampão à 1% e as leituras foram feitas em 405nm. Nos gráficos da imagem 3 foi visto que as melhores diluições foram em 1:100 e 1:500, a 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 4 – Teste de diluição do peptídeo



Diferença entre o grupo controle e grupo com artrite reumatoide em diferentes diluições para o peptídeo de HERV-K e HERV-W

Utilizando os soros de EM conseguimos estabelecer um *cut off* e assim poder validar os peptídeos já que na EM possui anti-HERV e - MOG^{28,29,33}.

A comparação foi feita utilizando a sequência da MOG (CAA52617.1) no *GenBank* e analisando no *Expasy* com os peptídeos. Pode se observa que houve similaridade entre os peptídeos e a MOG.

Usando 31 soros de pacientes positivos para EM, de idades entre 18 e 60 anos, e 54 soros de voluntários saudáveis, com idades entre 18 e 62 anos, realizamos um ELISA nas diluições estabelecido anteriormente conseguimos alcançar os parâmetros de diagnósticos demonstrados na tabela 4.

Tabela 4 – Parâmetros de diagnósticos encontrados dos diferentes peptídeos realizados no ELISA.

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

Como pode se observar na tabela 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. Os cut off variaram de 0,08975 (W Pep 1) a 0,1758 (K Pep 10) já desconsiderando o branco da reação.

Após a etapa de validação foi feita o teste de ELISA nos voluntários com AR e no grupo controle, onde os voluntários do grupo controle que possuíam histórico de alguma doença autoimune ou reumático foram excluídos.

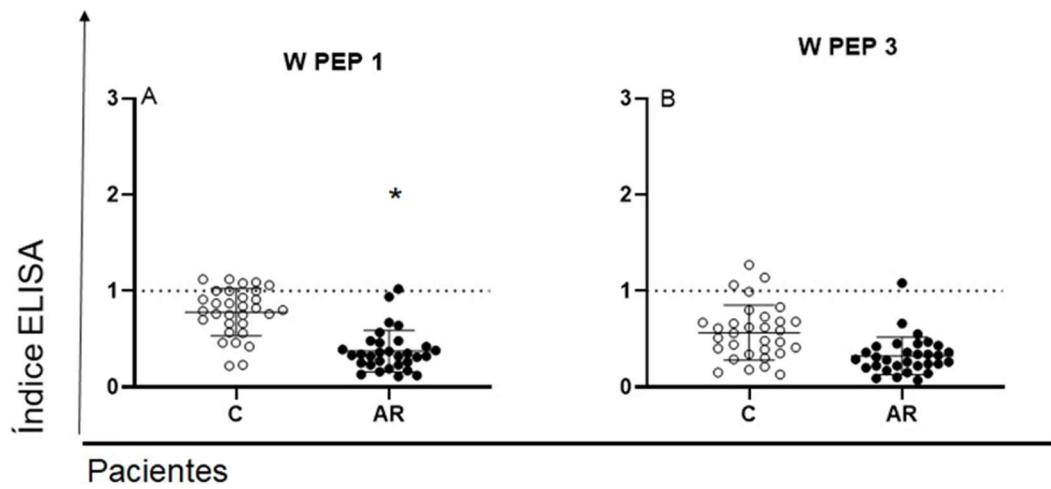
Tabela 5 – Questionário dos voluntários

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				
	NI	4				
Tempo de Diagnóstico	0-4	2		Medicamentos	Adalimumabe	4
	5-9	2			Upadacitinibe/Metotrexato	9
	10-19	5			Citrato de tofacitibe/Prednisona	15
	20-29	9			Adalimumabe/Tocilizumabe	9
	30-39	5				
	>40	1				
	NI	7				

Questionário dos voluntários dessa pesquisa com os seguintes dados: idade, raça, tempo de diagnóstico da AR, outras comorbidades ou doenças e medicamentos. NI = não informado, AR = artrite reumatoide, S =saudáveis.

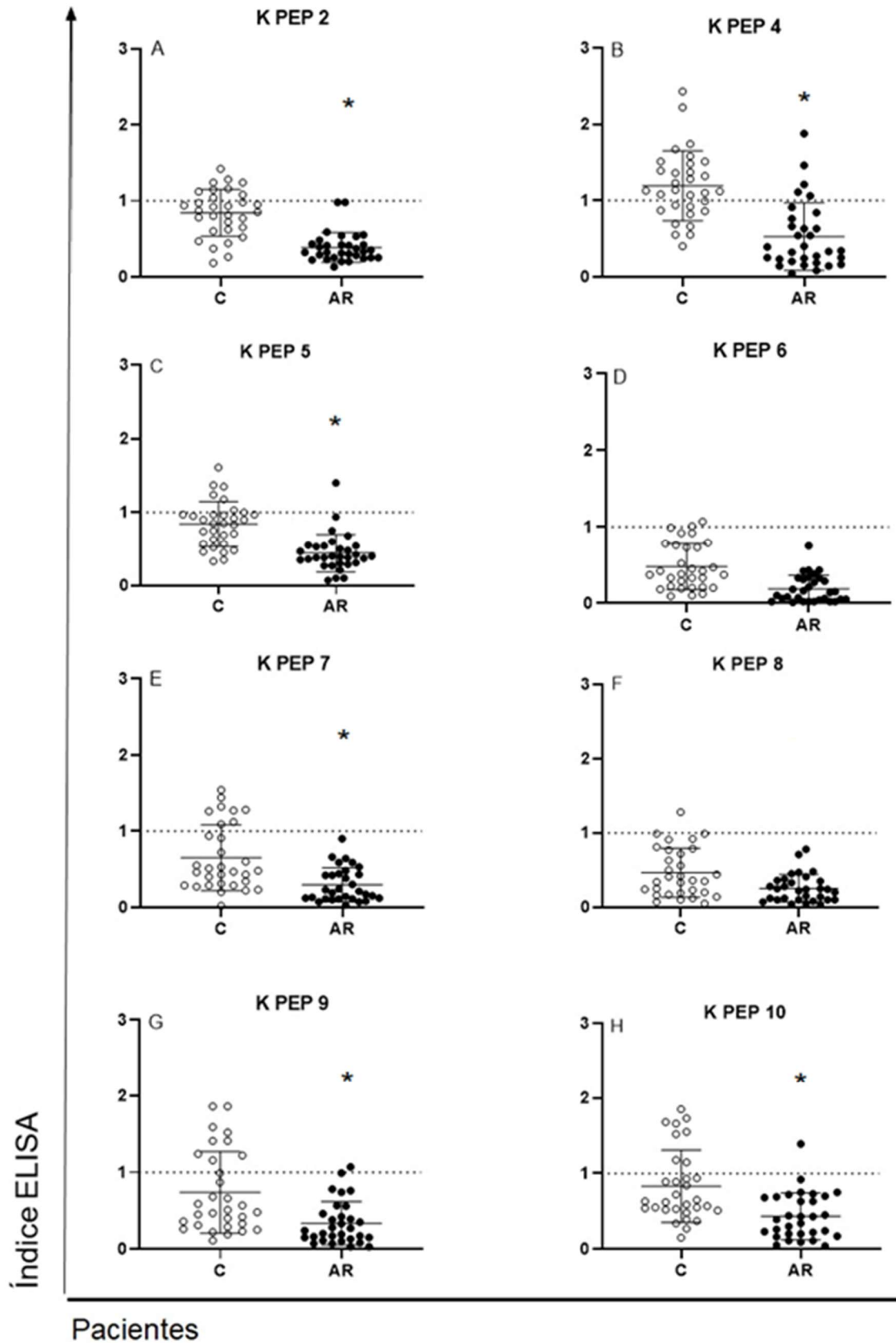
Conforme visto na tabela 5 tem um equilíbrio entre as raças negra, parda e branca, 50% dos pacientes tiveram o diagnóstico a mais de 20 anos e mais da metade, por volta de 80,65%, tinham a idade maior de 50 anos. 48,4% dos pacientes não tinham doença pré-existente, 32,26% com hipertensão/pressão e 9,68% tinham diabetes. Alguns dos medicamentos utilizados era a Prednisona, cerca de 42% dos pacientes tomavam e esse medicamento age no sistema imune. Já no grupo controle os voluntários tinham por volta a idade de 40 a 59 anos, alguns com menos idade e alguns com mais idade.

Figura 5 – Comparação do C e o com AR nos peptídeos para HERV-W,



C= Controle, AR=Artrite. Houve estatística no peptídeo 1, $p < 0,008$.

Figura 6 – Comparação do C e o com AR nos peptídeos para HERV-K



C= Controle, AR=Artrite. Houve estatística nos peptídeos 2,4,5,7,9 e 10, $p < 0,008$.

Tabela 6 – Porcentagem dos peptídeos

	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%

Porcentagem da positividade nos peptídeos em ambos os grupos, C=Controle e AR=Artrite Reumatoide

Os Índices do ELISA dos controles saudáveis acabaram obtendo uma resposta mais positiva em relação com os pacientes com a doença de fato, como observado na tabela 6 e nas figuras 5 e 6 os resultados são respectivamente, 16,13% vs 3,23% para o peptídeo 1, 29,03 vs 0,00% para os peptídeos 2 e 9; 64,52% vs 16,13% para o peptídeo 4, 25,81 vs 0,0% para o peptídeo 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 de 59,68% (tabela 4). Em contrapartida os peptídeos 3, 6 e 8 altas 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.

6 DISCUSSÃO

A precisão diagnóstica se torna importante para um teste de validação pois permite avaliar de uma forma abrangente dos testes tanto para os que possuem a doença quanto para os não possuem. Os peptídeos foram sintetizados com base nos portadores da EM, pois tem presença de resposta imune contra o HERV^{35,36,37}. A acurácia melhor foi dos peptídeos 8, 6 e 3, com 96,77%, 95,16% e 93,55% respectivamente, a pior acurácia foi a do peptídeo 4 com 59,68%, enquanto o restante dos peptídeos variou entre 79,03% e 87,10%. O que leva acreditar que dá utilizar os peptídeos 6 e 8 para uma melhor detecção de anticorpos para HERVs.

A técnica de ELISA foi feita nos pacientes com AR e os resultados obtidos mostraram uma resposta baixa, muito provavelmente porque estes pacientes estavam sendo tratados com anti-inflamatórios como o Prednisona³⁸ e não estavam em momento de surto, que seria o melhor cenário para o teste pois a reação estaria mais alta por conta do quadro inflamatório está alto aumentando a transcrição e decorrente disso uma maior resposta humoral de anti-HERVs, diferentemente das amostras de EM que foram coletadas em momento de surto e não estavam recebendo tratamento³⁹. Essa situação já foi presenciada onde pacientes com EM enquanto recebiam tratamento com Natalizumab tiveram uma resposta humoral baixa contra antígenos do HERV-W⁴⁰.

O resultado obtido nesta validação pode vir a ser utilizado como base para novos estudos, porque os resultados tanto para EM, quanto para AR 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.

Realizar novamente essa pesquisa com pacientes com AR em surto e sem tratamento farmacológicos, provavelmente os resultados observados serão diferentes do que foram vistos aqui. As doenças AR e EM são ambas autoimunes, na EM é sugerido que ocorra envolvimento do HERV porque a um mimetismo molecular entra o HERV e MOG⁴¹. A baixa atividade de anti-HERVs nos pacientes com AR não exclui o envolvimento do HERV na doença por essa razão seria legal fazer novamente essa pesquisa.

7 CONCLUSÃO

Os resultados do ELISA mostraram que tem anticorpos anti-HERVs nos voluntários, os voluntários com a AR tiveram uma resposta humoral baixa em comparação com o grupo controle.

É preciso realizar mais estudos envolvendo HERVs na patogênese da AR, algo que pode ser feito é pegar pacientes com diferentes estágios da artrite, os diferentes tratamentos e comparar eles a fim de chegar a um melhor vislumbre da relação dos tratamentos farmacológicos com a resposta humoral.

8. REFERÊNCIAS

1. 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/>
2. Greenig M. Herts, immunity, and autoimmunity: Understanding the connection. **PeerJ** [Internet]. 2019 [cited 2021 May 10];2019(4). Available from: </pmc/articles/PMC6452852/>
3. 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.
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. 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.
6. 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>
7. 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/>
8. 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/>
9. 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
10. 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/>
11. Gao Y, Yu XF, Chen T. Human endogenous retroviruses in cancer: Expression, regulation and function (Review) [Internet]. Vol. 21, **Oncology Letters**. Spandidos Publications; 2021 [cited 2021 Apr 16]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33552242/>
12. 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/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22248111/)
13. 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/>
 14. 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/>
 15. 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/>
 16. Komurian-Pradel F, Paranhos-Baccala G, Bedin F, Ounanian-Paraz A, Sodoyer M, Ott C, et al. Molecular cloning and characterization of MSRV-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/>
 17. 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.
 18. 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.
 19. 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/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22248111/)
 20. Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2015). **Imunologia Celular e Molecular**, 1260.
 21. Maria L, Afonso B, Viegas C. Diretrizes para o diagnóstico da artrite reumatoide. **Rev Bras Reumatol**. 2013;53(2):141–57.
 22. Murphy, K., & Weaver, C. (2016). **Janeway's Immunobiology**. In **Janeway's Immunobiology**. <https://doi.org/10.1201/9781315533247>
 23. 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>
 24. 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.
 25. 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/>.
 26. 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/>.

27. 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>
28. Xiao, B. G., Lington, 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)
29. 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>
30. 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.
31. 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>
32. 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>
33. 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., Marnelli, 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>
34. Perron, H., Germi, R., Bernard, C., Garcia-Montojo, M., Deluen, C., Farinelli, L., Faucard, R., Veas, F., Stefan, I., Fabrik, 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>
35. 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>
36. 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>

37. 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>.
38. 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>
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. 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.
41. 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/>.