

UNIVERSIDADE SANTO AMARO

Programa de Mestrado em Ciências da Saúde

Sara Coelho Rangel

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE RETROVÍRUS ENDÓGENOS
HUMANOS EM PACIENTES COM TRANSTORNO BIPOLAR E
ESQUIZOFRENIA**

São Paulo

2023

Sara Coelho Rangel

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE RETROVÍRUS ENDÓGENOS
HUMANOS EM PACIENTES COM TRANSTORNO BIPOLAR E
ESQUIZOFRENIA**

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

Orientador: Prof. Dr. Luiz Henrique da Silva Nali

Coorientadora: Profa. Dra. Carolina Nunes França

São Paulo

2023

R154a Rangel, Sara Coelho.
Análise da expressão de retrovírus endógenos humanos em pacientes com transtorno bipolar e esquizofrenia / Sara Coelho Rangel. – São Paulo, 2023.
56 p. : il., color.
Orientador: Prof. Dr. Luis Henrique da Silva Nali.
Dissertação. (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Santo Amaro, 2023.
Bibliografia incluída.
1. Retrovírus endógeno humano. 2. Perfil inflamatório. 3. Transtorno mental. I. Nali, Luis Henrique da Silva. orient. II. Universidade Santo Amaro. III. Título.

CDD 576

SARA COELHO RANGEL

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE RETROVÍRUS ENDÓGENOS
HUMANOS EM PACIENTES COM TRANSTORNO BIPOLAR E
ESQUIZOFRENIA**

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

Orientador: Prof. Dr. Luiz Henrique da Silva Nali

Coorientadora: Profa. Dra. Carolina Nunes França

São Paulo, _____ de _____ de 2023

Banca Examinadora

.....

Prof. Dra. Camila Romano

.....

Prof. Dr. André Luis Lacerda Bachi

.....

Prof. Dr. Luiz Henrique da Silva Nali

Conceito Final

A minha querida mãe, Maria Vanda Coelho e ao meu irmão Danilo Coelho Rangel, pelo apoio incondicional em todos os momentos difíceis da minha trajetória acadêmica.

Ao meu pai Adijuto Fonte Rangel (in memoriam), aqui está o resultado diante de todo esforço dedicado à minha educação.

A todos que enfrentam desafios na saúde mental. Vocês não estão sozinhos!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me conduzir e estar à frente de todas as dificuldades.

Aos meus colegas de laboratório, Samuel Santos, Fernando Minervino, Erica Vanessa, Pablo Fortunato e Matheus Fernandes, pela convivência e parceria, vocês tornaram essa caminhada mais leve e cheia de alegria.

A minha querida amiga Michelly Damasceno da Silva, essa pesquisa é nossa.

Ao meu orientador Prof. Dr. Luiz Henrique da Silva Nali, pela paciência, confiança e por todo conhecimento compartilhado durante estes anos de trabalho.

Aos professores Dr. André Luis Lacerda Bachi e Dr. Lucas Melo Neves, o suporte de vocês foram essenciais para o desenvolvimento e conclusão deste estudo.

A professora Marina Tiemi Shio, pelo dia a dia no laboratório, por sempre estar disposta a tirar minhas dúvidas e compartilhar seus conhecimentos.

Ao Dr. Jonatas Bussador do Amaral, por ceder espaço para a realização dos ELISAs, desta, e de tantas outras pesquisas.

A professora Dra. Carolina Nunes França, pela coorientação e recomendação à FAPESP na tentativa de bolsa.

A Dra. Camila Malta Romano e mais uma vez ao Dr. André Luis Lacerda, por aceitarem fazer parte da minha banca e por todas as sugestões da qualificação.

À coordenação e todos os funcionários da equipe CAPS III – Capela do Socorro e ao Dr. Décio Gilberto Natrielli Filho e toda equipe de médicos residentes do ambulatório de psiquiatria da UNISA.

Aos participantes da pesquisa, por aceitarem fazer parte da concretização deste estudo.

A UNISA, pela bolsa integral para a realização do Mestrado em Ciências da Saúde.

“Confia ao Senhor as tuas obras, e teus pensamentos serão estabelecidos.”

Provérbios 16:3

Rangel, SC. Análise da expressão de Retrovírus Endógenos Humanos em pacientes com transtorno bipolar e esquizofrenia [Dissertação]. São Paulo: Universidade Santo Amaro; 2023.

RESUMO

Introdução: Os retrovírus endógenos foram incorporados ao genoma humano durante os últimos milhões de anos por meio de interações destes elementos com células germinativas dos nossos ancestrais, e, neste caso, são denominados como Retrovírus Endógenos Humanos (HERVs). Os HERVs representam 8% do genoma humano e possuem diversos papéis na fisiologia humana, acredita-se que eles possam mediar a patogênese de algumas doenças, como as doenças neuropsiquiátricas. O transtorno bipolar (TB) e a esquizofrenia (ESQ) são transtornos mentais (TM) sem etiologia conhecida, que afeta pessoas no mundo todo. Acredita-se que estas doenças estejam envolvidas a um perfil inflamatório caracterizado pelo aumento de citocinas pró-inflamatórias e há evidências de que possa existir uma relação entre a expressão de HERV e a inflamação. **Objetivo:** Avaliar o perfil de expressão de HERV-W-env e o perfil inflamatório em pacientes diagnosticados com transtorno bipolar e esquizofrenia. **Método:** Foram avaliados 48 pacientes diagnosticados com transtorno bipolar e esquizofrenia, além de 46 indivíduos para o grupo controle saudável. Duas amostras de sangue foram coletadas de cada voluntário, uma para a análise de expressão de HERV (RNAm por PCR) e outra para análise dos níveis de citocinas pró e anti-inflamatória. **Resultados:** A expressão de HERV-W-env foi significativamente maior em pacientes com TM ($p < 0,01$). O grupo ESQ exibiu maior expressão de HERV-W-env que controles ($p < 0,01$). As proporções de TNF- α /IL-4 e TNF- α /IL-10 foram maiores em pacientes com TM, com concentrações mais baixas de IFN- γ /IL-10. Correlação positiva entre expressão HERV-W-env e razões TNF- α /IL-10 e IFN- γ /IL-10 ($r = 0,48$ $p < 0,05$ e $r = 0,46$ $p < 0,05$, respectivamente) e correlação negativa entre HERV-W-env expressão e IL-10 ($r = -0,47$ $p < 0,05$) foram encontradas em pacientes com TB. **Conclusão:** Esses achados sugerem uma possível ligação entre a expressão de HERV-W-env e a resposta inflamatória em pessoas com TB e ESQ e uma possível regulação deste perfil inflamatório em pacientes com TB.

Palavras-chaves: Retrovírus Endógeno Humano, perfil inflamatório, transtorno mental.

Rangel, SC. Analysis of Human Endogenous Retrovirus expression in patients with bipolar disorder and schizophrenia [Dissertation]. São Paulo: Universidade Santo Amaro; 2023.

ABSTRACT

Introduction: Endogenous retroviruses have been incorporated into the human genome over the last million years through interactions between these elements and the germ cells of our ancestors, and in this case they are referred to as Human Endogenous Retroviruses (HERVs). HERVs represent 8% of the human genome and play various roles in human physiology, and it is believed that they may mediate the pathogenesis of some diseases, such as neuropsychiatric disorders. Bipolar disorder (BD) and schizophrenia (SQ) are mental disorders (MD) with no known etiology that affect people all over the world. These diseases are believed to be involved in an inflammatory profile characterized by an increase in pro-inflammatory cytokines and there is evidence that there may be a relationship between HERV expression and inflammation. **Objective:** To evaluate the expression profile of HERV-W-env and the inflammatory profile in patients diagnosed with bipolar disorder and schizophrenia. **Method:** 48 patients diagnosed with bipolar disorder and schizophrenia were evaluated, as well as 46 individuals for the healthy control group. Two blood samples were taken from each volunteer, one for analysis of HERV expression (mRNA by PCR) and the other for analysis of pro- and anti-inflammatory cytokine levels. **Results:** HERV-W-env expression was significantly higher in TM patients ($p < 0.01$). The ESQ group exhibited higher HERV-W-env expression than controls ($p < 0.01$). The proportions of TNF- α /IL-4 and TNF- α /IL-10 were higher in TM patients, with lower concentrations of IFN- γ /IL-10. Positive correlation between HERV-W-env expression and TNF- α /IL-10 and IFN- γ /IL-10 ratios ($r = 0.48$ $p < 0.05$ and $r = 0.46$ $p < 0.05$, respectively) and negative correlation between HERV-W-env expression and IL-10 ($r = -0.47$ $p < 0.05$) were found in TB patients. **Conclusion:** These findings suggest a possible link between HERV-W-env expression and the inflammatory response in people with TB and ESQ and a possible regulation of this inflammatory profile in TB patients.

Keywords: Human Endogenous Retrovirus, inflammatory profile, mental disorder.

Lista de Tabelas

Tabela 1: Primers que foram utilizados em ensaios de PCR em tempo real.....	31
Tabela 2: Volume e concentração dos reagentes utilizados nas reações de PCR.....	32
Tabela 3: Dados demográficos dos pacientes incluídos no estudo.....	33

Lista de Figuras

Figura 1: Integração e transmissão retroviral endógena de primatas e humanos ao longo da evolução.....	15
Figura 2: Estrutura geral de um provírus HERV.....	16
Figura 3: Processo de recrutamento durante o estudo.....	28
Figura 4: Comparação do grupo GC com o grupo ESQ e TB para HERV-W-env.....	36
Figura 5: Nível de expressão de HERV-W-env em relação ao tempo de diagnósticos dos pacientes com TM.....	36
Figura 6: Panorama geral citocinas pró e anti-inflamatórias.....	37
Figura 7: Razão entre a citocina pró inflamatórias e anti-inflamatórias nos grupos ESQ, TB e GC.....	38
Figura 8: Correlação entre nível de expressão de HERV-W-env e citocinas para o grupo TB.....	39

Lista de Abreviaturas

CA	Capsídeo
CAPS	Centros de atenção psicossocial
DO	Densidade de onda
DP	Desvio padrão
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EM	Esclerose múltipla
ERVs	Retrovírus endógenos
ESQ	Esquizofrenia
GC	Grupos controle
HERV	Retrovírus endógenos humanos
HIV	Imunodeficiência humana
IN	Integrase
LTRs	Long terminal repeats
MA	Matriz Estrutural
MADRS	Escala de depressão de Montgomery-Asberg
MOG	Glicoproteína da mielina de oligodendrócito
NC	Nucleocapsídeo
PANSS	Escala das síndromes positivas e negativas
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Proteína c reativa
PR	Protease
RT	Transcriptase reversa

SNC	Sistema nervoso central
SU	Superfície do envelope viral
TB	Transtorno bipolar
TDM	Transtorno depressivo maior
TEs	Elementos transponíveis
TM	Transtorno mental
UNISA	Universidade Santo Amaro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1 Retrovírus Endógenos Humanos (HERVS)	15
1.1.1 Papel dos HERVs na Fisiologia Humana	17
1.1.2 Os HERVs e seu papel na patogênese de doenças	18
1.2 Transtornos mentais	19
1.2.1 Transtorno bipolar	20
1.2.2 Esquizofrenia	21
1.3 Resposta inflamatória desencadeada nos transtornos mentais	21
1.4 HERV e transtornos mentais	23
2 JUSTIFICATIVA	25
3 OBJETIVOS	26
3.1 Objetivo Geral	26
3.2 Objetivo Específico	26
4 MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1 Casuística	27
4.2 Caracterização da amostra	28
4.3 Logística laboratorial	29
4.4 Obtenção de células mononucleares do sangue periférico	29
4.5 Extração e purificação do RNA e PCR em tempo real	29
4.6 Quantificação de citocinas	32
4.7 Análises estatísticas	32
5 RESULTADOS	33
5.1 Dados demográficos dos indivíduos incluídos no estudo	33
5.2 Análise de expressão de HERV-W-env	35
5.3 Análise da concentração de citocinas	36
5.4 Análise da correlação entre nível de expressão de HERV-W-env e citocinas	38
6 DISCUSSÃO	40
7 CONCLUSÃO	44
REFERÊNCIAS	45
ANEXOS	53

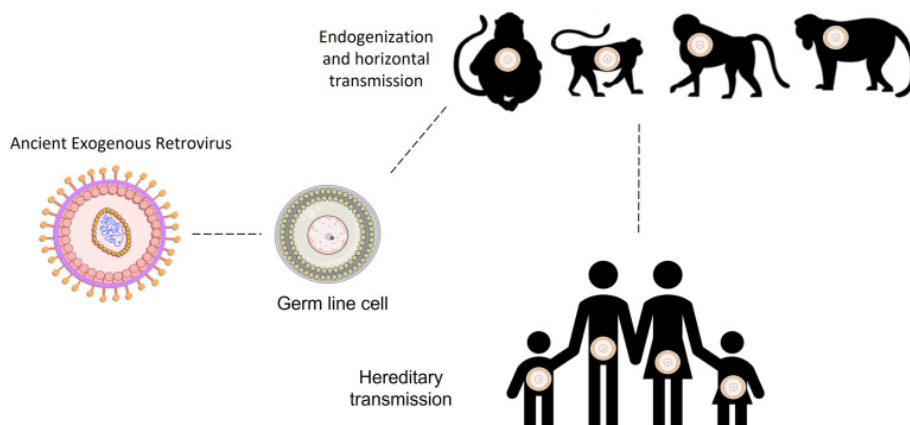
1. INTRODUÇÃO

1.1 Retrovírus Endógenos Humanos (HERVs)

O genoma humano é composto por aproximadamente 3,0 bilhões de sequências de pares de bases, as quais cerca de 8% são derivadas de elementos retrovirais. Os Retrovírus Endógenos foram adquiridos durante os últimos milhões de anos por meio de um processo de integração viral de retrovírus exógenos, já extintos, nas células germinativas de nossos ancestrais, eles são descritos em todos os vertebrados. Quando se refere aos humanos, os Retrovírus Endógenos são denominados como Retrovírus Endógenos Humanos (HERVs).^{1,2}

O processo de endogenização das diversas famílias de HERVs ocorreu em vários e diferentes momentos ao longo da evolução, o que proporcionou a fixação destes vírus no genoma em diversos momentos. Sua transmissão, inicialmente, ocorreu de diversas maneiras: de forma horizontal, como acontece em um vírus infeccioso através de contato direto ou indireto, por retrotransposição, ou seja, processos genéticos por quais segmentos de material genético (como sequências de DNA ou RNA) são copiados e inseridos em diferentes locais do genoma de um organismo, e transmissão hereditária, onde a herança de características genéticas são passadas dos progenitores para a prole. Para que ocorresse a sua perpetuação de forma endógena, posteriormente, a transmissão não ocorreu de maneira horizontal, e sim por via vertical de maneira mendeliana (transmissão hereditária) entre as gerações, conforme representação na Figura 1.^{3,4}

Figura 1 - Integração e transmissão retroviral endógena de primatas e humanos ao longo da evolução



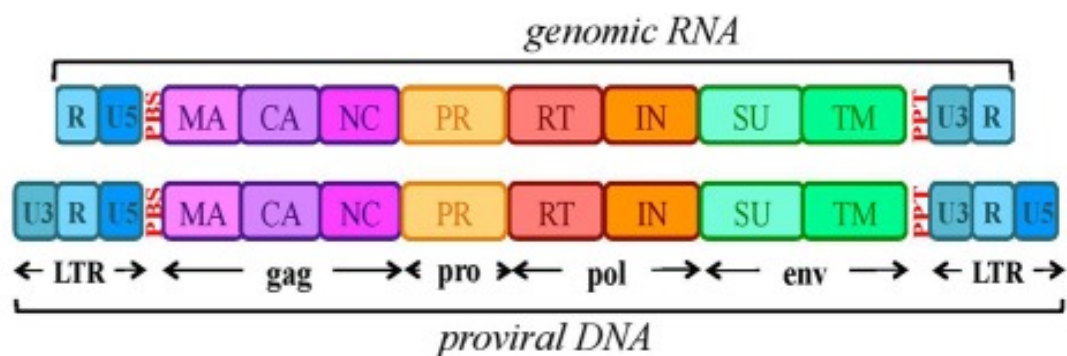
Fonte:⁵

Os retrovírus exógenos que deram origem aos HERVs podem ter infectado as células germinativas de primatas ou de outros ancestrais como alvo principal, ou infectaram esta população por acaso. Independente da origem de infecção desses diversos HERVs, a principal forma que favoreceu a endogenização desses vírus se deu em virtude da capacidade do ciclo de todos os retrovírus que dependem da inserção do genoma viral no genoma do hospedeiro como parte do seu ciclo replicativo.⁶ Esse processo de endogenização foi possível de ser demonstrado por meio de ensaios que utilizam ovos fertilizados e infectados com vírus de leucose aviária.⁷

Mais de 30 famílias de ERVs já foram descritas e o nome de cada família considera o sítio de iniciação do primer onde começa a transcrição reversa, um exemplo seria o HERV-W, já que é classificado dessa forma pois possui o triptofano no sítio de início.⁸

Assim como os retrovírus exógenos, os HERVs possuem estrutura proviral típica e são classificados como retrovírus simples. Eles possuem duas regiões promotoras idênticas denominadas *Long Terminal Repeats* (LTRs) e uma sequência de quatro genes retrovirais básicos: *gag*, responsável pela codificação das proteínas da matriz estrutural (MA), capsídeo (CA) e nucleocapsídeo (NC); *pro*, responsável pelas enzimas envolvidas no ciclo de vida viral, a protease (PR); *pol*, responsável pela codificação das enzimas virais, a transcriptase reversa (RT) e integrase (IN) e *env*, responsável pela codificação das glicoproteínas da superfície do envelope viral (SU) e transmembrana (TM), (Figura 2).^{1,6,9}

Figura 2- Estrutura geral de um provírus HERV.



Adaptado fonte: ⁶

Eles pertencem aos elementos transponíveis (TEs) de classe I do nosso genoma, e são conhecidos como retrotransposons, sendo caracterizados por um ciclo de transposição que envolve uma etapa de transcrição para RNA e a transcrição reversa desse RNA em DNA, sendo inserido em uma nova posição no genoma e podendo interagir com fatores celulares. Devido a eventos mutacionais, recombinações e deleções durante a evolução, a maioria destes elementos encontram-se de forma incompleta ou possuem mutações deletérias, tornando-os incapazes de replicar de maneira infectiva, contudo, o vírion ainda pode ser formado por meio da expressão independente de suas proteínas virais oriundas de seus genes localizados em regiões distintas do genoma humano podendo influenciar certos controles genéticos do hospedeiro.^{7,10}

No entanto, não se conhece o potencial infeccioso dessas partículas virais e em virtude da presença no genoma humano e expressão de suas proteínas, é esperado que, de fato, esses HERVs possam, de alguma maneira, apresentar papéis reguladores em nosso genoma. Esses detalhes serão discutidos a seguir ^{7,11}

1.1.1 Papel dos HERVs na Fisiologia Humana

Os HERVs podem atuar na fisiologia humana por ação direta das proteínas virais ou por ação promotora de suas LTRs, regulando assim genes adjacentes a ela.
¹² Essas ações serão detalhadas a seguir

O HERV da família W (HERV-W) possui um papel central no processo de placentação, onde o gene envelope viral do HERV-W codifica a proteína Sincitina-1, que atua mediando a fusão de trofoblastos em sinciciotrofoblasto durante a formação embrionária, tornando-se essencial para a etapa da embriogênese humana. O sinciciotrofoblasto é fundamental para a facilitação de transferência de nutrientes, produção de hormônios e proteção do feto. O HERV-FRD também contribui na regulação negativa da imunidade humana contra o feto, contribuindo para a prevenção de possível rejeição.^{1,4,13} Além disso, em consequência da sua ativação em atividade de reparo tecidual, dados indicam que a Sincitina-1 também está envolvida na estimulação da fusão celular de mioblastos, onde existe expressão do gene do envelope dos HERV, tornando possível a associação entre HERVs e reparo muscular.^{14,15} A atividade fusogênica do en do HERV-W (Sincitina-1) parece ser

dinâmica e mostra-se atualmente em outros aspectos também, como no caso da fusão de fagócitos mononucleares para formação dos osteoclastos.¹⁶

Além da ação fusogênica da Sincitina-1, as LTRs de HERV também podem regular a expressão de vários genes (amilase, endotelina-b, pleiotrofina, apolipoproteína-C1), por exemplo, as LTRs de HERV-E, atuam como um intensificador para o gene da amilase humana.¹⁷

A expressão dos HERVs pode, mesmo que indiretamente, interferir positivamente no controle de algumas doenças, como é o caso da imunodeficiência humana (HIV). Estudos anteriores apontam que linfócitos T CD4⁺ de indivíduos adultos infectados pelo HIV apresentam presença de peptídeos derivados de HERV, onde estimulam, resposta de linfócitos T CD8⁺ a antígenos de HERV, e essas respostas são ausentes em indivíduos saudáveis, ou seja, alguns linfócitos T específicos para HERVs, conseguem eliminar as células infectadas pelo vírus do HIV de maneira indireta.^{18,19}

No entanto, estudos indicam que os HERVs também são frequentemente associados como possíveis agentes etiológicos ou mediadores da patogênese de doenças crônicas, autoimunes, câncer, doenças neurológicas e neuropsiquiátricas.^{1,10}

1.1.2 Os HERVs e seu papel na patogênese de doenças

Muitos estudos indicam a relação entre a expressão de HERV e doenças autoimunes,^{20,21} pois acredita-se que estes retrovírus endógenos têm a capacidade de estimular uma resposta imune e induzir resposta a antígenos próprios, porém o mecanismo pelo qual isso pode ocorrer ainda não está totalmente esclarecido. Dentre os mecanismos propostos de autoimunidade, temos o mimetismo molecular. Este fenômeno é caracterizado quando existem regiões que apresentam alguma similaridade entre as moléculas de um patógeno com seu hospedeiro, o que poderia resultar em uma construção de resposta imune contra um antígeno do patógeno e consequentemente responder de forma cruzada contra um antígeno próprio, assim uma proteína de HERV pode ser responsável por ativar uma resposta autoimune.²²

O HERV-W foi identificado pela primeira vez em pesquisas com pessoas portadoras de Esclerose Múltipla (EM).¹ A EM é uma doença autoimune do sistema nervoso central (SNC), é caracterizada pela lesão das bainhas de mielina, porém sua

etiologia não é totalmente compreendida.^{3,23} Outra doença estudada é a artrite reumatoide, que também possui etiologia desconhecida, porém apresenta um caráter auto-inflamatório das articulações sinoviais, demonstrada por perfil de resposta humoral e celular. Pesquisas demonstraram que pessoas portadoras da doença apresentaram anticorpos específicos contra proteínas de envelope de alguns HERVs.³

De fato, estudos prévios que buscaram compreender a patogênese da EM revelaram que, existem sítios de similaridade entre a glicoproteína da mielina de oligodendrócito (MOG) e a proteína de HERV.²⁴ Quando existe uma ativação anormal de alguns HERVs, acredita-se que possam existir efeitos pró-inflamatórios, ocasionando a desregulação do sistema imunológico e culminando na resposta autoimune.^{23,25}

De maneira semelhante, a transativação dos HERVs podem ser mediada por infecção por vírus exógenos, como vírus da gripe A, vírus da dengue, hepatite B e Epstein Barr, também podem desencadear a ativação dos HERVs.²⁶ Outras alterações químicas e físicas também podem ativar os HERVs, como alguns medicamento e radiação por UV, respectivamente.⁴ Dessa forma, podemos concluir que diversos são os fatores que podem favorecer para que ocorra a expressão desses HERVs, e talvez, contribuir de maneira multifatorial para o desenvolvimento dessas doenças sem etiologia estabelecida.

Os HERVs também podem ativar múltiplas vias sinalizadoras oncogênicas. A família de HERV-K pode contribuir para algumas doenças, como por exemplo, câncer de ovário, mama, próstata, melanoma e câncer de células germinativas.²⁷⁻²⁹

Além disso, os HERVs também podem estar relacionados com doenças neuropsiquiátricas, como descrito anteriormente. Estudos apontam que as doenças relacionadas a transtornos mentais graves possam ter um nível de expressão maior, principalmente da família de HERV-W.^{10,30} Os detalhes serão discutidos nos tópicos a seguir.

1.2 Transtornos mentais

Os transtornos mentais (TM) são as principais causas de incapacidade em todo o mundo, representando cerca de 37% dos anos de vida saudáveis perdidos por doenças.³¹ A atual classificação dos transtornos mentais de acordo com a *American*

Psychiatric Association (DSM-5, 2014) descreve estes em 21 grupos de transtornos. Uma metanálise com estudos internacionais realizado entre os anos de 1980 e 2019 revelou que o número de casos de transtornos mentais em todo o mundo somente no ano de 2019 foi de 970 milhões, neste trabalho destacamos o transtorno bipolar (TB) e esquizofrenia (ESQ), (40 e 24 milhões respectivamente).^{32,33}

Estes transtornos não possuem etiologia definida e geralmente são multifatoriais, como por exemplo, genes e histórico familiar, estresse, experiências traumáticas, uso de álcool e drogas, exposição da mãe a vírus e produtos tóxicos durante a gravidez. Atinge diferentes tipos de pessoas, independente de idade, gênero, cultura ou classe social que estão inseridas.³⁴ Nos países de baixa e média renda, aproximadamente de 76% a 85% das pessoas com transtornos mentais não recebem tratamento adequado, ou nenhum tipo de tratamento para o transtorno. A taxa dos transtornos mentais está crescendo com impactos significativos sobre a saúde e as consequências sociais e econômicas em todo o mundo.³¹

Dentro dos transtornos mentais, cada um irá se apresentar de uma forma, porém, geralmente estão associadas por uma série de pensamentos, percepções, emoções e comportamentos diferentes dos esperados, o que pode afetar as relações sociais com outras pessoas.³³ O tratamento geralmente é feito por meio de uma abordagem complementar, entre a administração de fármacos, terapias comportamentais e psicoterapias. Estudos indicam que cerca de um terço dessas pessoas não respondem ao tratamento medicamentoso de uma maneira eficaz a longo prazo.^{33,35}

1.2.1 Transtorno bipolar

O TB refere-se a um grupo de transtornos afetivos, caracterizado por episódios maníacos ou hipomaníacos, alternando com episódios depressivos recorrentes. Os episódios de mania se caracterizam por humores anormais e persistentemente elevados, expansivos ou irritáveis, com duração mínima de uma semana, com presença de três ou mais sintomas relacionados, como: autoestima elevada ou grandiosa, redução da necessidade de sono, indivíduo mais loquaz que o habitual, aceleração psicomotora, distraibilidade, agitação psicomotora e comportamento de risco. Já os episódios de hipomania são menos intensos que os da mania, por pelo menos quatro dias, deve haver três ou mais sintomas bem demarcados de humor

persistente elevado, irritado ou expansivo, não pode haver sintomas psicóticos e os sintomas não perturbam claramente o funcionamento profissional ou social, não havendo necessidade de hospitalização.³³ O principal tratamento é o farmacológico, através de antipsicóticos, antidepressivos, de acordo com os episódios de humor de cada paciente.³⁶

1.2.2 Esquizofrenia

A ESQ é um transtorno caracterizado por sintomas positivos (quando há sintomas de perda de contato com a realidade, como delírios e alucinações), sintomas negativos (quando há motivação prejudicada, redução na fala espontânea e retraimento sociais) e comprometimento cognitivo (quando há comprometimento no processo de pensamentos). Os sintomas positivos tendem a regredir, enquanto os negativos e cognitivos tendem a ser crônicos. Pode ainda ser definida a partir de alterações de um ou mais dos cinco domínios, sendo eles: delírios, alucinações, pensamento (discurso) desorganizado, comportamento motor grosseiramente desorganizado ou anormal. Eles são definidos a partir de anormalidades em um ou mais dentre os cinco sintomas: delírios, alucinações, discurso desorganizado, comportamento grosseiramente desorganizado ou catatônico e sintomas negativos, devem estar presentes com duração significativa por, pelo menos, um mês.³³ O tratamento consiste em grande parte na administração de medicamentos antipsicóticos que ajudam a controlar principalmente os sintomas positivos combinados com terapias psicóticas.³⁷

1.3 Resposta inflamatória desencadeada nos transtornos mentais

O objetivo da resposta inflamatória é estabelecer a homeostase, sendo assim, o organismo produz mediadores pró e anti-inflamatórios que pode ser causada tanto por fatores exógenos, quanto por fatores endógenos. Durante uma resposta inflamatória, as células do sistema imunológico produzem citocinas, que são mediadores moleculares responsáveis pela comunicação com outras células do sistema imunológico. Estudos indicam que as vias de comunicação entre o sistema nervoso central e o periférico são de forma bidirecional, por meio da barreira hematoencefálica que pode desempenhar um papel na transmissão de sinais de citocinas, seja de forma diretamente por um transporte ativo ou indireta, através de

segundos mensageiros. Pesquisas sugerem que pessoas com diferentes tipos de transtornos mentais podem ter estas citocinas a nível sérico alterados.^{38,39}

As respostas inflamatórias crônicas podem ter consequências negativas para a saúde física e mental. No TB, é presente elementos pró inflamatórios de elevações centrais e periféricas. Podem apresentar algumas variações entre os estudos, mas, em geral, o paciente com TB demonstra maiores concentrações séricas de TNF- α , receptor 1 de TNF solúvel (sTNF-R1), IL-1 β , IL-4, receptor solúvel de IL-2 (sIL-2R) e receptor de IL-6 solúvel (sIL-6R) em comparação com controles saudáveis. A elevação nas citocinas pró-inflamatória, em específico a IL-6 durante as fases depressivas aumenta a probabilidade de uma transição subsequente para a mania. Na fase aguda, as células da micróglia atuam reduzindo danos neurais, porém em episódios repetidos de humor, como no transtorno bipolar, tornam essas células ativadas, tornando o equilíbrio homeostático sobrecarregado e propenso a um ambiente inflamatório constante.⁴⁰ Evidências sugerem que os pacientes com TB apresentam um estado inflamatório crônico de baixo grau, podendo ser aprimorado durante episódios agudos de humor e em estados mais avançados da doença, podendo exacerbar outros mecanismos patológicos.⁴¹

Os pacientes com esquizofrenia também apresentam processos inflamatórios associados a marcadores pró-inflamatórios periféricos e centrais aumentados, genes codificadores do sistema imunológico e infecções associam-se a fatores de risco ao desenvolvimento da doença.⁴² Os fatores genéticos de riscos podem promover a inflamação associados por fatores ambientais de estresse e alterações do sistema imunológico. As alterações neuromediadoras descritas na esquizofrenia (dopamina, serotonina e glutamato) também são descritas na neuroinflamação de baixo grau e podem representar os desencadeantes do início dos sintomas da doença. A IL-6 é a citocina aumentada que apresenta mais constância em todas as fases da esquizofrenia, porém outras citocinas também se encontram em níveis alterados, por exemplo, a proteína C reativa, TNF- α e IFN- γ .⁴³ Em um estudo com camundongos foi administrado injeção, eles concluíram que altos níveis desta citocina na fêmea durante a gestação, causaram sintomas semelhantes à esquizofrenia na prole durante a vida adulta, esses sintomas puderam ser revertidos por anticorpos anti-IL-6.⁴⁴

Embora nem todos os indivíduos descritos com os transtornos mentais apresentem marcadores da inflamação elevados, é notável que os processos

inflamatórios podem contribuir para a etiologia destes transtornos e afetar os padrões de respostas aos tratamentos, muitos fármacos anti-inflamatórios têm sido estudados para auxiliar nos tratamentos medicamentosos destes transtornos e apresentam resultados promissores. Como a barreira hematoencefálica regula o transporte de micro e macromoléculas entre o sangue periférico e o SNC, a ruptura desta barreira fica associada com condições inflamatórias cerebrais. O papel crescente da inflamação e do estresse oxidativo na fisiopatologia dos transtornos mentais pode indicar esta associação da ruptura da barreira hematoencefálica com a diminuição da proteção do SNC, aumentando a permeabilidade para as citocinas pró-inflamatórias do sangue periférico para o cérebro.^{45,46}

1.4 HERV e transtornos mentais

Não existem muitos estudos indicando a contribuição desses elementos transponíveis para a etiologia dos transtornos mentais ou como parte de seu processo patogênico, porém há evidências sobre como a retrotransposição desempenha um papel importante na formação do mosaicismismo somático que explica a especificação funcional das células cerebrais. Alguns estudos indicam que a expressão de algumas sequências de HERVs aparecem em pacientes com transtornos mentais, especialmente aqueles com esquizofrenia e transtorno bipolar. Respostas imuno-inflamatórias têm sido associadas com esses tipos de manifestações assim como várias infecções exógenas virais podem afetar os riscos dos transtornos mentais.⁴⁷

Alguns estudos indicam que o HERV da família W pode estar associado com a esquizofrenia, pois seu nível de expressão encontra-se aumentado de forma significativa no sangue destes pacientes. A Sincitina-1 pode induzir inflamação com efeitos semelhantes aos dos superantígenos, ativando assim o sistema imune inato, estudos indicam que este fenômeno pode ativar uma cascata pró-inflamatória e autoimune. Outro estudo demonstrou que a proteína c reativa (PCR) pode ser ativada pela proteína viral Sincitina-1 o que poderia desencadear o aumento da PCR em células gliais em pacientes com esquizofrenia.^{48,49} A presença de proteínas de HERV-W em amostras de soro de pacientes com esquizofrenia foi descrita por Perron et al. em um estudo onde 23 de 49 indivíduos com esquizofrenia apresentaram antigenemia positiva para proteína de envelope de HERV-W, contra o grupo controle saudável onde apenas 1 de 30 indivíduos foi positivo, esse dado indicam que talvez a Sincitina-1 pode estar envolvida no processo de desenvolvimento da esquizofrenia.⁵⁰

Temos evidências que mostram uma expressão elevada desses retrovírus em pacientes com esses transtornos mentais. Além disso, aparentemente a expressão de HERV-W pode estar associada com uma redução da densidade neuronal de regiões de hipocampo e impacta na morfologia dendrítica dos neurônios de indivíduos com esquizofrenia.⁵¹ Esses dados apontam que possa haver uma ação direta dos retroelementos com alterações morfológicas neuronais de pacientes com transtornos mentais. Também, postula-se se há um papel inflamatório na manifestação dos quadros psiquiátricos caracterizado pelo aumento de citocinas pro-inflamatórias séricas nesses indivíduos. No entanto, não se sabe quais são os elementos que contribuem para esse aumento.

Um estudo realizado com amostras de cérebro humano post mortem em pacientes com diagnósticos psiquiátricos (n=111) e controles saudáveis (n=55) analisou sequenciamento de RNA para investigar expressão global de HERV. Os resultados mostraram que os pacientes com esquizofrenia e transtorno bipolar expressaram de forma elevada mais genes de HERV-W em relação aos controles saudáveis.⁵² Alguns estudos já buscaram identificar a presença de HERV em soro de pacientes e em comparação com os grupos controles há um aumento na expressão de HERV-W em pacientes com esquizofrenia, também foram analisados em células mononucleares do sangue periférico (PBMC), onde a expressão foi aumentada duas vezes em comparação com o controle. Acredita-se que a expressão de HERV-W está envolvida em cerca de 50% na patogênese dos pacientes com esquizofrenia e transtorno bipolar.⁵³

Os transtornos mentais apresentam um caráter inflamatório e acredita-se que a expressão dos HERVs possa estar relacionada com uma potencialização dessa resposta inflamatória.^{1,45} De fato, o papel dos HERVs em doenças inflamatórias tem sido consideravelmente estudado, no entanto não há muitos dados na literatura que tentaram buscar se há associação entre as condições inflamatórias e a expressão desses HERVs nos transtornos psiquiátricos aqui mencionados. No entanto os dados pontuais de resposta humoral anti HERV, expressão elevada desses vírus e a condição inflamatória descrita nesses pacientes pode indicar um papel dos HERVs na patogênese desses transtornos mentais.

2 JUSTIFICATIVA

Os transtornos mentais representam uma das principais causas de incapacidade em todo o mundo, responsáveis por aproximadamente 37% dos anos de vida saudável perdidos. As manifestações psiquiátricas apresentam uma série de pensamentos, percepções, emoções e comportamentos fora do padrão esperado, o que impacta de maneira significativa as relações sociais dos indivíduos, muitas vezes as atividades de vida diárias encontram-se comprometidas, o que demanda muitas vezes a atenção de cuidadores e familiares.

Apesar da importância desses transtornos mentais, as condições etiológicas e patogênicas das manifestações psiquiátricas ainda são pouco compreendidas. Embora os HERVs sejam estudados em outras doenças imunomediadas, vastas evidências apontem para o possível papel etiológico dos HERVs com essas doenças. Ainda são poucos estudos que dedicaram esforços para estudar essa associação nas doenças psiquiátricas. Temos algumas evidências que mostram uma expressão elevada desses retrovírus em pacientes com esses transtornos mentais. Além disso, aparentemente a expressão de HERV-W pode estar associada com uma redução da densidade neuronal de regiões de hipocampo e impactar na morfologia dendrítica dos neurônios de indivíduos com esquizofrenia. Esses dados apontam que talvez possa haver uma ação direta dos retroelementos com alterações morfológicas neuronais de pacientes com transtornos mentais.

Também, postula-se que haja um papel inflamatório na manifestação dos quadros psiquiátricos caracterizado pelo aumento de citocinas pro-inflamatórias séricas nesses indivíduos. No entanto, não se sabe quais são os elementos que contribuem para esse aumento.

Nesse contexto, investigar a presença, níveis de expressão de HERV-W e estudar a concentração de citocinas pró e anti-inflamatória séricas desses pacientes poderá trazer dados importantes dessa associação ou correlação e quem sabe adicionar peças para compreender o papel desses retroelementos com a patogênese da doença, seja por aspecto direto, ou estimulando ou uma possível imunopatogenicidade em transtornos mentais de caráter inflamatório. Ainda, e talvez, os dados gerados nesta pesquisa também poderão servir como possíveis biomarcadores moleculares para os quadros e manifestações da doença.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o perfil de expressão de HERV da família W em pacientes com diagnóstico de transtorno bipolar e esquizofrenia.

3.2 Objetivo Específico

- Determinar o perfil de concentração de citocinas pró inflamatórias e anti-inflamatórias em indivíduos com transtorno bipolar, esquizofrenia e grupo controle.
- Correlacionar o perfil de expressão de HERV-W-env com o perfil pró inflamatório e anti-inflamatório dos pacientes com transtorno bipolar, esquizofrenia e grupo controle.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

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

4.1 Casuística

Os pacientes selecionados para este estudo foram pacientes voluntários já diagnosticados com transtorno bipolar e esquizofrenia. Todos os pacientes recrutados foram previamente diagnosticados por psiquiatras e são acompanhados no ambulatório de psiquiatria da Universidade Santo Amaro – UNISA e Centro de Apoio de Atenção Psicossocial (CAPS Adulto III Capela Do Socorro) na região sul de São Paulo, durante o período de dezembro/2022 a julho/2023.

Foram avaliados 94 indivíduos para a pesquisa, nos quais 48 apresentaram laudo confirmatório para estes transtornos e disponibilidade para participar da pesquisa, além de 46 voluntários, sendo eles colaboradores e estudantes da Universidade Santo Amaro (UNISA), sem diagnóstico de transtorno mental, que foram pareados por idade para composição do grupo controle (GC). Os pacientes foram separados por grupo de acordo com o diagnóstico respectivo do transtorno.

Os critérios de inclusão para os pacientes voluntários foram: ter idade superior a 18 anos, manifestar livre vontade em participar da pesquisa e ter o laudo diagnóstico de transtorno mental. Os critérios de exclusão foram: pacientes que apresentaram incapacidades por motivos de saúde durante o estudo, doenças respiratórias no momento da coleta, doença autoimune ou histórico familiar de doença autoimune.

Para os voluntários do grupo controle, os critérios de inclusão foram: ter idade superior a 18 anos, manifestar livre vontade em participar da pesquisa e não possuir laudo diagnóstico para transtornos mentais. Os critérios de exclusão foram: doenças respiratórias no momento da coleta, diagnóstico de doenças autoimunes e histórico familiar de doença autoimune, estes critérios de exclusão foram utilizados para ambos os grupos pois, a coleta sanguínea foi feita ainda em um período de pandemia, há estudos que relatam um aumento do nível de expressão para HERV na COVID-19⁵⁴ e nas doenças autoimunes.²¹ Doenças metabólicas não foram utilizadas como um critério de exclusão, pois poderiam estar presentes nos dois grupos, também não há relatos na literatura de uma relação com o nível de expressão de HERV.

O processo de recrutamento e os motivos da desistência encontram-se detalhados na Figura 3.

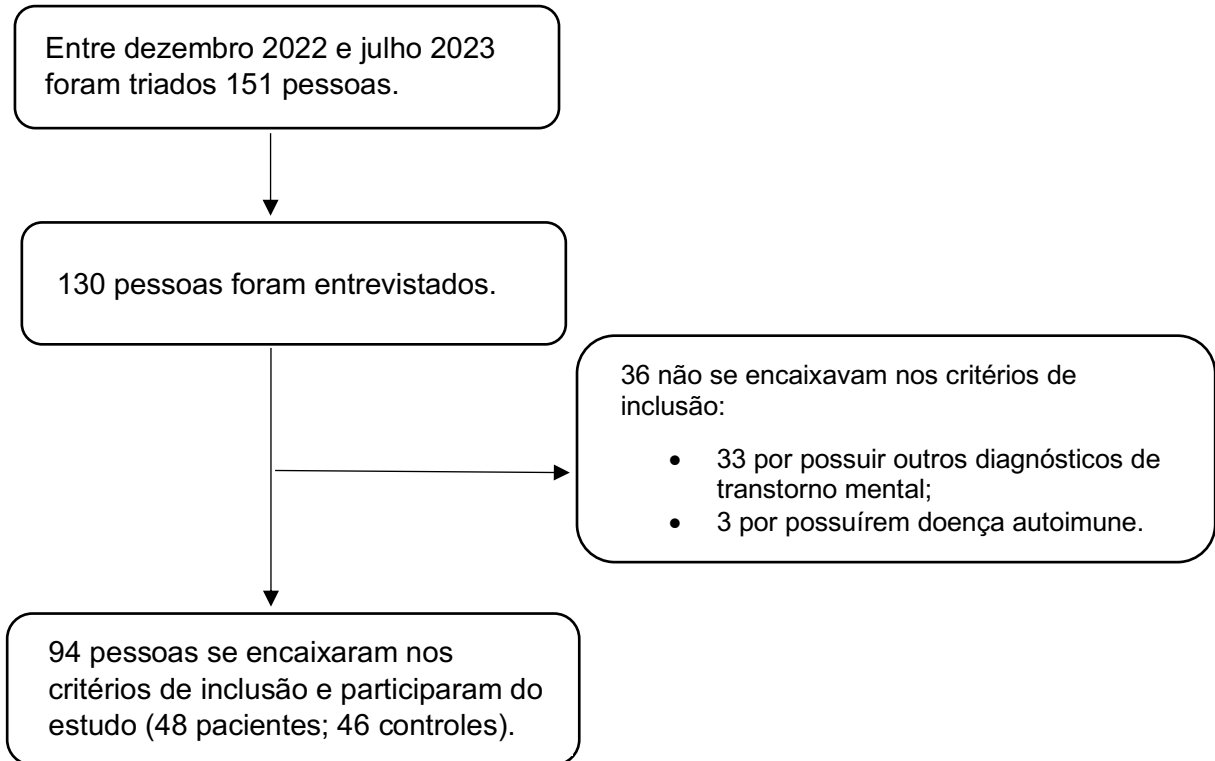


Figura 3 - Processo de recrutamento durante o estudo

Foi elaborado um termo de consentimento livre e esclarecido – TCLE (ANEXO 1), no qual o sujeito ficou ciente de todos os riscos e constrangimentos eventuais dessa pesquisa. Esse estudo fez parte de um projeto maior e esta pesquisa está aprovado no CEP da UNISA sob o parecer 5.469.700

4.2 Caracterização da amostra

Foi aplicado um questionário estruturado em 4 componentes para caracterização da amostra: (1) Informações gerais: sexo, profissão, número para contato; (2) Escolaridade: Ensino fundamental, ensino médio, ensino superior ou pós-graduação; (3) Histórico de comorbidades: perguntas sobre a presença de doenças como hipertensão arterial, diabetes mellitus, distúrbios musculoesqueléticos, obesidade ou qualquer outra que estivesse sendo tratada; (4) Medicamentos: quais medicamentos para o transtorno mental ou outras doenças o indivíduo estava tomando. (ANEXO 2)

4.3 Logística laboratorial

Foram coletados 2 amostras de sangue de cada voluntário em um único momento do estudo. Sendo, 2 tubos com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), por ser o melhor anticoagulante para a preservação da morfologia celular, para obtenção de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) e para a separação do plasma.

As amostras obtidas foram encaminhadas para o laboratório de pesquisa da UNISA, URC – *Unisa Research Center*. Os tubos com EDTA foram centrifugados a 1.500g e após o tempo de centrifugação, o plasma foi transferido para um microtubo e armazenado em -80°C até a próxima etapa.

4.4 Obtenção de células mononucleares do sangue periférico

Após a centrifugação descrita acima, o sangue foi transferido para tubos cônicos tipo Falcon® 15ml, devidamente identificados e acrescidos de Ficoll-Hypaque, densidade 1.077 ±0.001 g/ml (+20°C), (Ficoll Paque Plus, GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden) em proporção 1/1 e centrifugado a 800g, 22°C durante 20 minutos, havendo a separação do PMBC por gradiente de concentração.

Posteriormente, as células obtidas foram lavadas em PBS (*phosphate buffered saline*) em um novo tubo e submetidas a centrifugação 800g durante 8 minutos. Após o descarte do sobrenadante, adicionou durante 2 minutos, em temperatura ambiente, 3 mL de cloreto de amônio para a lise de hemácias residuais. As células foram lavadas novamente com PBS e o sobrenadante foi descartado.

Utilizando 1 ml de PBS o *pellet* foi ressuspendido e o material foi transferido para um microtubo, onde posteriormente foi centrifugação em 1.500g durante 8 minutos, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* seco foi armazenado em freezer - 80°C até a realização das próximas etapas.

4.5 Extração e purificação do RNA e PCR em tempo real

As amostras foram submetidas a extração de RNA pelo método de Trizol/clorofórmio provenientes do PBMC armazenado. Para esta etapa, adicionou-se 1000µL de Trizol ao *pellet* de PBMC, pipetando *up/down* até a dissolução total das células. Em seguida foi adicionado 200µL de clorofórmio a mistura, para ocorrer a

separação dos ácidos nucleicos e fase orgânica, que foram levadas ao vórtex por 10 segundos, centrifugadas a $\sim 10.000g$ durante 15min a $4^{\circ}C$.

Em seguida, cerca de $500\mu L$ do sobrenadante (fase aquosa) foi transferida para um novo microtubo, a precipitação foi realizada adicionando $500\mu L$ de isopropanol absoluto armazenado em $-20^{\circ}C$, que foram levadas ao vórtex por 10 segundos e realizada uma nova centrifugação nos mesmos parâmetros. Foi descartado o sobrenadante e adicionado $1000\mu L$ de etanol gelado 75%, vórtex por 10 segundos, e centrifugado a $\sim 10.000g$ pelo tempo de 10 minutos. Por fim, descartou-se o sobrenadante, o pellet de RNA foi secado a temperatura ambiente e resuspenso em $40\mu l$ de água nuclease *free*. As amostras foram quantificadas em equipamento Nanodrop e armazenadas em freezer $-80^{\circ}C$ até a etapa seguinte.

Após a extração, as amostras foram submetidas à DNase, para remoção do DNA residual contido nas amostras, evitando sinal de falso positivo posteriormente no PCR em tempo real. Para esta etapa foi utilizado o kit *Turbo DNA-free* da Thermo Fisher Scientific.

A preparação do mix foi feita de acordo com o número de amostras que iriam ser processadas e seguindo as instruções de uso do fabricante. Para isso, foi adicionado $10\mu L$ desse mix em cada amostra e passado no vórtex durante 10 segundos, em seguida foram incubadas durante 30 minutos a $37^{\circ}C$ em banho seco. Após este período, foi adicionado $1\mu L$ da enzima (tubo DNase) em cada amostra e incubada pelo mesmo tempo e temperatura.

Após o período da segunda incubação, foi adicionado $10\mu L$ do inibidor de DNase e deixado em temperatura ambiente durante 5 minutos e as amostras foram passadas no vórtex, cerca de 3x durante este tempo. Em seguida as amostras foram para a etapa de centrifugação durante 3 minutos a $3.000g$ em $24^{\circ}C$, foram feitas alíquotas de $40\mu L$ e transferidas para novos microtubos e armazenadas em freezer $-80^{\circ}C$ até a etapa seguinte.

A síntese do DNA complementar foi realizada através do protocolo de cDNA, utilizando o kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription* da Thermo Fisher Scientific. O mix foi preparado de acordo com o número de amostras e seguindo as instruções de uso do fabricante.

Após a montagem do mix, foram adicionados 10 µL dessa mistura as amostras e passadas no vórtex durante 10 segundos, em seguida as amostras foram submetidas ao termociclador, as etapas de temperaturas foram: 2 horas a 37°C seguida de 5 minutos a 85°C, após o tempo correspondente, as amostras foram armazenadas em freezer -80°C até a etapa seguinte.

O PCR em tempo real foi realizado utilizando o sistema de reação *Sybr Green*, kit *FastStart SYBR GREEN Master* da empresa Sigma-Aldrich, com primers complementares ao gene do envelope de HERV-W e como gene endógeno utilizamos o primer complementar ao gene endógeno de GAPDH. Os primers utilizados estão descritos na Tabela 1:

Tabela 1: Primers que foram utilizados em ensaios de PCR em tempo real ⁵⁵⁻⁵⁷

Oligonucleotídes	Forward (Primer Senso)	Reverse (Primer Antissenso)
HERV-W	CCAATGCATCAGGTGGGTAAC	GAGGTACCACAGACAAAAATATTCCT
GAPDH	ACCCACTCCTCCACCTTTGAC	TGTTGCTGTAGCCAAATTCGTT

As condições de ciclagem para detecção do HERV-W-env e GAPDH foram: 50°C durante 2 minutos, 95°C durante 10 minutos no *Holding Stage*, seguidos de 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos e 60°C durante 1 minuto, para o *Cycling Stage*, e uma etapa final foi adicionada para obter a curva de *Melting* com 95°C durante 15 segundos, 60°C durante 1 minuto e 95°C durante 15 segundos no *Melting Curve Stage*.

A atividade transcricional do HERV 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 transtorno mental e a relação dos HERVs com o GAPDH do grupo controle, esses dados foram expressos através do método de $-2\Delta\Delta C_t$, onde é possível calcular a diferença relativa na expressão entre eles.

A descrição do volume e das concentrações dos reagentes e primers utilizados estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2: Volume e concentração dos reagentes utilizados nas reações de PCR

Reagentes	Concentração inicial	Concentração final	Volume
<i>SYBR Green</i>	2x	1x	12,5 µL
Água Ultrapura			7,5 µL
<i>Primer Ford</i>	10pmol	3.2pmol	1 µL
<i>Primer Reverse</i>	10pmol	3.2pmol	1 µL
Amostra (RNA)	~50ng	~150ng	3 µL
Volume Total			25 µL

4.6 Quantificação de citocinas

Para a quantificação das citocinas séricas, todas as amostras foram submetidas a um painel de citocinas, sendo elas: IL-2, IL-4, IL-6, IFN- γ e TNF- α e IL-10, selecionadas por conveniência. O procedimento foi realizado através do método de ELISA utilizando kits comerciais da empresa *Thermo Fisher Scientific* (Waltham, Massachusetts, EUA), seguindo as orientações do fabricante. A detecção foi dada na densidade de onda (DO) de 450nm. Esse valor foi utilizado para determinar a concentração de cada analito (pg/mL), com base na curva padrão fornecida pelo kit.

4.7 Análises estatísticas

O número de amostra foi coletado por conveniência. Foram obtidos dados descritivos e, para a comparação das pontuações entre os diferentes grupos, foram utilizados testes paramétricos e não paramétricos de acordo com a distribuição normal dos dados. Os testes utilizados foram os seguintes: O teste de normalidade foi efetuado pelo teste de Shapiro-Wilk. O teste de Mann-Whitney foi utilizado para analisar a expressão de HERV entre os grupos, o teste de Kruskal-Wallis para a análise da diferença de concentração de citocinas entre os grupos e o teste do coeficiente de Pearson para a análise de correlação. Todos os testes foram efetuados sob o pressuposto de uma probabilidade de erro de primeiro tipo (alfa) de 5%.

5 RESULTADOS

5.1 Dados demográficos dos indivíduos incluídos no estudo

Foram entrevistados 130 pessoas e 94 foram incluídas no estudo, 24 no grupo de TB, 24 no grupo de ESQ e 46 no GC. Os dados sociodemográficos dos indivíduos incluídos no estudo encontra-se descritos na Tabela 3.

Tabela 3: Dados demográficos dos pacientes incluídos no estudo

	TB (n=24)	ESQ (n=24)	GC (n=46)
Sexo F/M	21/03	07/17	43/03
Idade (média +/- DP)	41 ± 13,1	42 ± 13,5	41,77 ± 7,2
Etnia (n/%)	Branco (9/37,5) Negro (5/20,84) Pardo (10/41,67)	Branco (6/25) Negro (5/20,84) Pardo (13/54,17)	Branco (18/39,13) Negro (6/13,04) Pardo (19/41,3) Oriental (3/6,52)
Escolaridade (n/%)	Ensino fundamental (5/20,84) Ensino médio (12/50) Ensino superior (6/25) Pós-graduação (1/4,17)	Ensino fundamental (10/41,67) Ensino médio (8/33,34) Ensino superior (6/25)	Ensino fundamental (3/6,52) Ensino médio (6/13,04) Ensino superior (20/43,47) Pós-graduação (17/36,96)
Trabalha atualmente (n/%)	Sim (10/41,6) Não (12/50) Não informado (2/8,34)	Sim (01/4,1) Não (18/75) Não informado (5/20,84)	Sim (43/93,5) Não (03/6,5)
Medicamentos relacionados ao transtorno mental (n/%)	Alprazolam (1/4,1) Biperideno (1/4,1) Carbamazepina (2/8,3) Carbonato de lítio (11/45,8) Clorpromazina (2/8,3) Diazepam (1/4,1) Fluoxetina (1/4,1) Haloperidol (1/4,1) Lurasidona (1/4,1) Pregabalina (1/4,1) Quetiapina (3/12,5) Risperidona (8/33,3) Valproato de sódio (9/37,5)	Biperideno (4/16,6) Carbonato de lítio (2/8,3) Clonazepam (3/12,5) Fluoxetina (4/16,6) Clorpromazina (3/12,5) Clozapina (1/4,1) Haloperidol (3/12,5) Olanzapina (1/4,1) Risperidona (7/29,1) Valproato de sódio (4/16,6)	Não se aplica
Possui outra doença (n/%)	Não 66,67% (16) Hipertensão 25% (06) Dislipidemia 8,34% (02)	Não 75% (18) Hipertensão 16,67% (04) Hipotensão 4,17% (01) Diatebes tipo 2 8,34% (02)	Não 93,48% (43) Osteoporose 8,34% (02) Transtorno da esclerótica 4,17% (01)
Histórico de TM familiar (n/%)	Sim 58,33% (14) Não 41,67% (10)	Sim 45,33% (11) Não 54,16% (13)	Não se aplica

F/M: Feminino/Masculino; DP: Desvio-padrão; TB: Transtorno bipolar; ESQ: Esquizofrenia; GC: Grupo controle

Dentre os voluntários que participaram do grupo com TB, 21 eram mulheres, correspondendo a 87,5%, enquanto três eram homens, correspondendo a 12,5%, a idade média foi de 41 anos, cuja amplitude variou dos 19 aos 65 anos. Em relação a característica étnica dos participantes, nove se autodeclararam brancos, cinco negros e dez pardos, correspondendo a 37,5%, 20,84% e 41,67%, respectivamente. O maior grau de escolaridade foi de pós-graduação para uma pessoa, enquanto a metade estava no ensino médio (50%). Metade dos participantes deste grupo não trabalham atualmente e a análise de presença de outras comorbidades mostrou que a maioria das pessoas não apresentava nenhuma outra doença além do TM (66,67%) e apenas 33,34% possuíam outras doenças, sendo elas: Hipertensão e Dislipdemia. Neste grupo 58,33% apresentam histórico familiar de TM, enquanto 41,37% disseram que não. Em média, os pacientes tiveram o diagnóstico aos 26 anos de idade (DP: 11,30) e estão com um diagnóstico médio há 15 anos (DP: 13,33). Em relação aos medicamentos, a maior porcentagem foi de 45,84% para o carbonato de lítio.

No grupo ESQ, 17 participantes eram homens (70,8%) e sete eram mulheres (29,17%), a idade média foi de 42 anos, cuja amplitude variou dos 20 aos 62 anos. Em relação a característica étnica dos voluntários, seis se autodeclararam brancos, cinco negros e 13 pardos, correspondendo a 25%, 20,8% e 54,17%, respectivamente. O maior grau de escolaridade foi de ensino superior, porém a maioria 41,67% estudaram até o ensino fundamental. A maioria dos participantes não trabalham atualmente (75%) e a análise de presença de outras comorbidades mostrou que a maioria das pessoas não apresentava nenhuma outra doença além do TM (75%) e apenas 25% possuíam outras doenças, sendo elas: Hipertensão, Hipotensão e diabetes tipo 2. Neste grupo 45,33% apresentam histórico familiar de TM, enquanto 54,16% não apresentaram. Em média os pacientes tiveram o diagnóstico aos 27 anos de idade (DP: 10,95), estão com um diagnóstico médio há 15 anos (DP: 10,29). Em relação aos medicamentos, a maior porcentagem foi de 29,17% fazem para o risperidona.

Dentre os voluntários que participaram do GC, 36 eram mulheres e três eram homens, correspondendo a 78,2% e 6,5% respectivamente, com idade média de 41,77 anos, a variação está entre 29 e 62 anos. Em relação as características étnicas, 18 se autodeclararam brancos, seis negros, 19 pardos e três orientais, correspondendo a 39,13%, 13,04%, 41,3% e 6,52%, respectivamente. A maioria

apresentou escolaridade com ensino superior (43,47%) e apenas 6,52% não trabalham atualmente. A análise de presença de outras comorbidades mostrou que, a maioria dos participantes não apresentavam nenhuma doença 93,485% e apenas 6,52% apresentaram, sendo elas: Osteoporose, Transtorno da esclerótica.

5.2 Análise de expressão de HERV-W-env

Para a realização da quantificação relativa da expressão de HERV, foi realizado um ensaio de PCR em tempo real para o gene endógeno GAPDH e, todas as amostras apresentaram amplificação do gene. Todos os participantes do estudo apresentaram expressão para HERV-W-env, contudo, a expressão dos participantes com TM foi em média 3,5 vezes maior em relação a mediana do grupo controle, conforme mostra a Figura 4 (A), houve diferença significativa entre o GC e ESQ ($p < 0,01$) enquanto GC e TB não apresentou diferença estatística ($p = 0,54$).

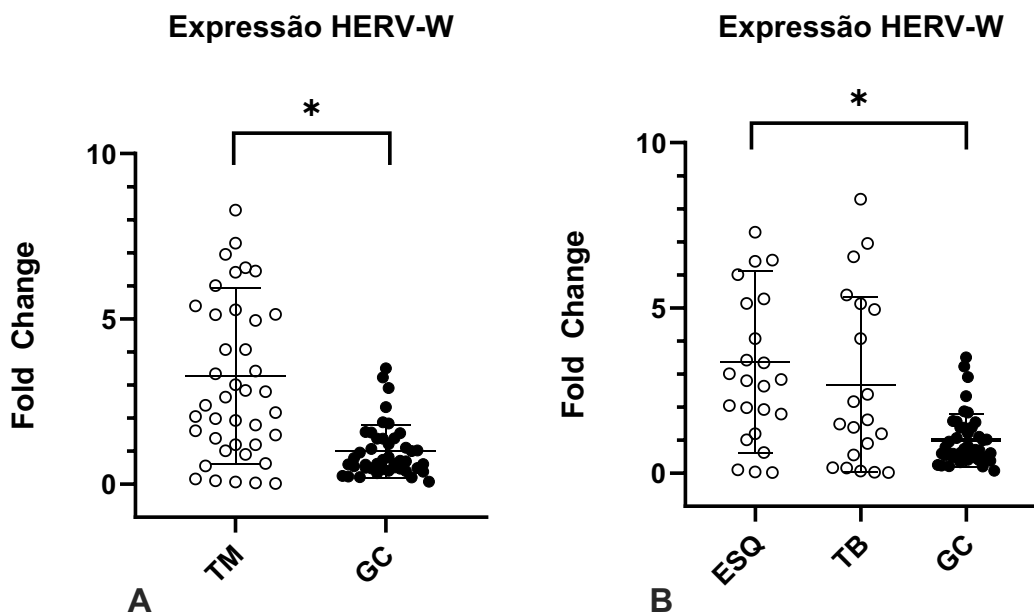


Figura 4 - Comparação do grupo GC com os grupos ESQ e TB para HERV-W-env. A expressão de HERV-W-env em pessoas com TM revelou ser diferente quando comparada a indivíduos saudáveis ($*p < 0,01$) (A). Houve diferença significativa entre o grupo ESQ e GC ($*p < 0,01$) (B), teste Mann Whitney.

Pessoas que possuíam doenças metabólicas foram avaliadas separadamente entre os grupos (TB, ESQ e GC) e não foi possível observar diferença significativa

comparado a quem não tinha, também não foi observado um padrão de fold change elevado entre estes participantes.

Também foi avaliado o nível de expressão de HERV-W-env de acordo com o tempo de diagnóstico da doença, conforme a Figura 5.

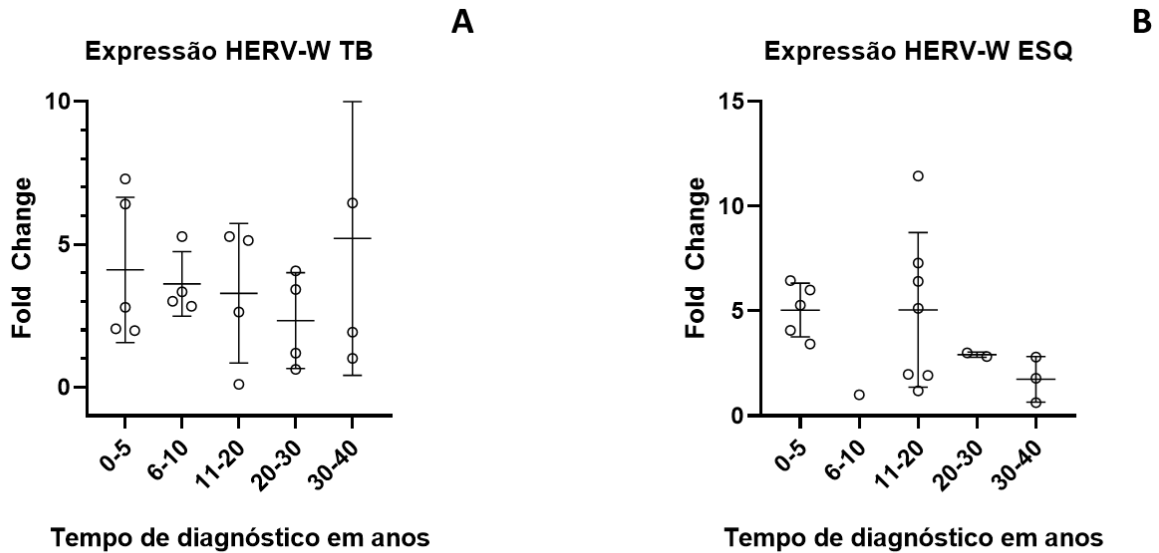


Figura 5- Nível de expressão de HERV-W-env em relação ao tempo de diagnósticos dos pacientes com TM. O nível de expressão de HERV-W-env mostrou não ter um padrão regular enquanto ao tempo de diagnóstico da doença. TB ($p=0.87$) ESQ ($p=0.71$)

5.3 Análise da concentração de citocinas

A quantificação de citocinas anti e pró-inflamatórias foi analisada no plasma de pacientes com TM e está descrito cada um deles na Figura 5. Através das análises é possível observar que os pacientes com TB apresentam maiores concentrações de TNF- α e IL-10 quando comparados ao GC, e de IL-2 quando comparados ao grupo ESQ. No grupo ESQ também se observa maiores concentrações de TNF- α e IL-10 quando comparado ao GC. Curiosamente, o GC apresentou maior nível de concentração de IFN- γ do que os pacientes com ESQ.

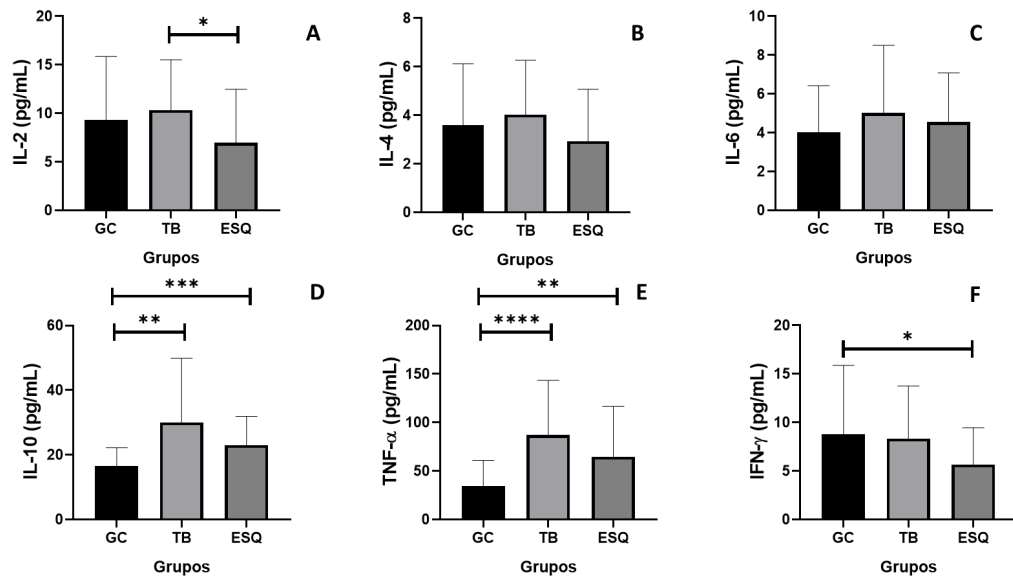


Figura 6 - Panorama geral citocinas pró e anti-inflamatórias. Níveis séricos das citocinas IL-2 (A), IL-4 (B), IL-6 (C), IL-10 (D), TNF- α (E) e IFN- γ (F) em pacientes com transtorno bipolar (TB), esquizofrenia (ESQ) e grupo controle (GC). Legenda: *= $p < 0.05$, **= $p < 0.01$, ***= $p < 0.001$, ****= $p < 0.0001$, teste Mann Whitney.

Além do panorama geral das citocinas, foi avaliada a razão de IL-6/IL-10, TNF α /IL-10, IFN- γ /IL-10, TNF- α /IL-4, IFN- γ /IL-4. A finalidade dessa análise é compreender como se dá a condição regulatória (entre citocinas pró inflamatórias e anti inflamatórias) desses indivíduos. Os dados obtidos através dessa análise permite observar o panorama da resposta inflamatória a fim de determinar o real status daquele indivíduo, conforme mostrado na Figura 3. É possível observar que, pacientes com TB e ESQ apresentaram maior razão de TNF- α /IL-4, TNF- α /IL-10 do que o GC, e menor razão para IFN- γ /IL-10.

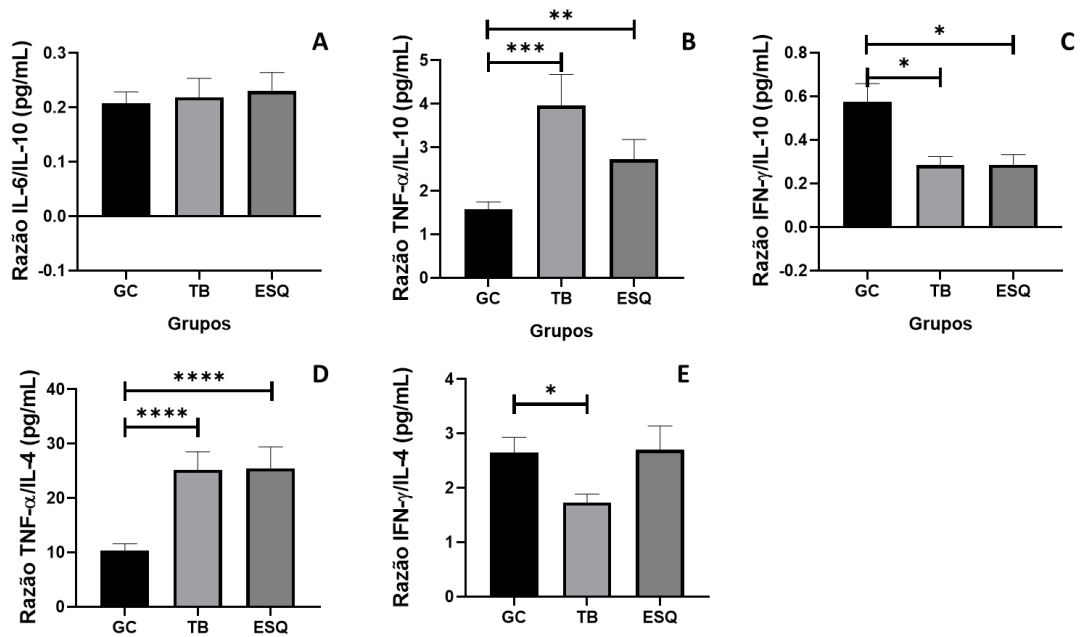


Figura 7- Razão entre citocinas pró inflamatórias e anti-inflamatórias nos grupos ESQ, TB e GC. Razão entre as concentrações das citocinas pró-inflamatórias IL-6 (A), TNF- α (B) e IFN- γ (C) e da citocina anti-inflamatória IL-10 e razão entre as concentrações das citocinas pró-inflamatórias TNF- α (D), IFN- γ (E) e a citocina anti-inflamatória IL-4 no plasma de pacientes com transtorno bipolar (TB), esquizofrenia (ESQ) e grupo controle (GC). Legenda: *= $p < 0.05$, **= $p < 0.01$, ***= $p < 0.001$, ****= $p < 0.0001$, teste Mann Whitney.

5.4 Análise da correlação entre nível de expressão de HERV-W-env e citocinas

Diante dos dados acima, uma análise adicional foi realizada com o intuito de identificar possíveis associações entre a atividade imunológica, demonstrada pelas citocinas, e a expressão de HERV-W-env.

Apesar de não termos observada diferença estatística na expressão de HERV-W-env para o grupo TB, pudemos observar diferenças significativas na correlação, conforme ilustrado na Figura 7. Os dados obtidos nesta análise demonstrou que, a concentração de IL-10 está negativamente correlacionada com o nível de expressão de HERV-W-env e as razões de TNF- α /IL-10 e IFN- γ /IL-10 está positivamente correlacionada com o nível de expressão de HERV-W-env.

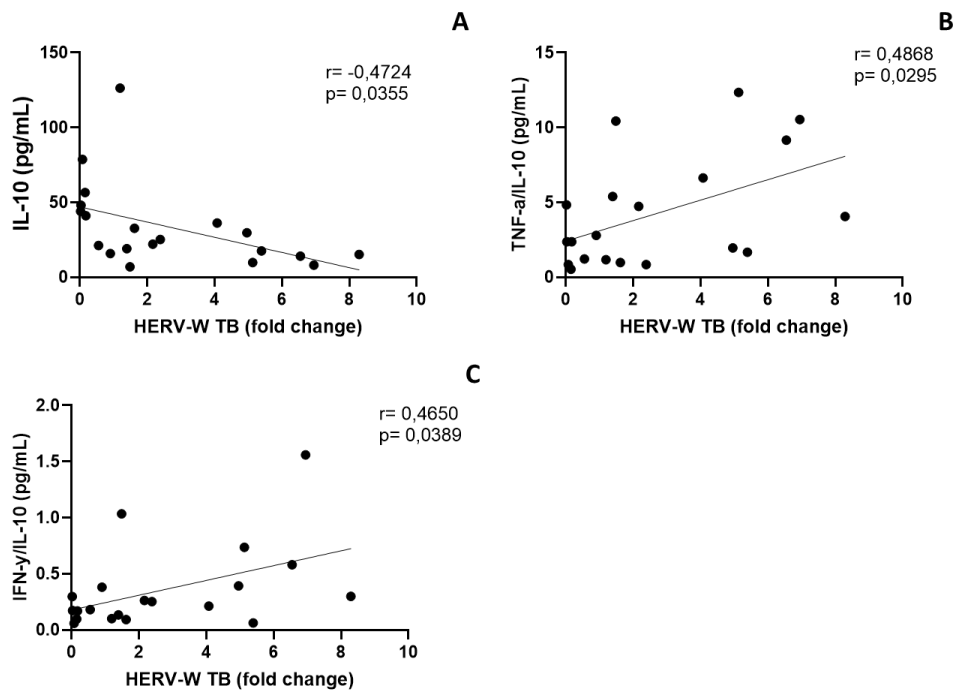


Figura 8 - Correlação entre nível de expressão de HERV-W-env e citocinas para o grupo TB. Correlação entre IL-10 e HERV-W-env (A), correlação entre a razão de TNF- α /IL-10 com HERV-W-env (B), correlação entre a razão de IFN- γ /IL-10 com HERV-W-env (C). Teste Correlação de Pearson

6 DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo fornecem evidências adicionais que apoiam o envolvimento da atividade alterada do HERV-W-env em TM. Houve uma expressão significativamente maior deste retroelemento quando comparada a indivíduos saudáveis. Embora todos os indivíduos do grupo controle tenham expressado HERV-W-env, a maioria apresentou níveis basais de expressão, o que é esperado de toda população humana.⁵⁸

Para o grupo ESQ, esse aumento representa 3,5 vezes mais que o GC ($p < 0,01$), sendo consistente com associações previamente relatadas entre HERV-W-env e ESQ, onde descrevem níveis mais elevados de expressão de HERV-W-env em pacientes com ESQ^{59,60}. Curiosamente, os pacientes com ESQ apresentaram concentrações mais elevadas de TNF- α do que o GC, mas esse achado não foi positivamente correlacionado com a expressão de HERV-W-env nem com as razões de citocinas pró e anti-inflamatórias (TNF- α /IL-10, IFN- γ /IL-10 e TNF- α /IL-4). Isto pode sugerir que a condição inflamatória, embora presente, pode não estar associada apenas à expressão do HERV-W-env, mas pode apresentar papéis patogênicos distintos na doença.

Dado isso, achados anteriores apontam um envolvimento direto de modificações patológicas neuronais associadas à expressão de HERV-W-env, alguns desses achados devem ser destacados: indução de apoptose neuronal⁶¹, anormalidades estruturais e funcionais em neurônios dopaminérgicos, estimulando substancialmente a produção de dopamina através do receptor de dopamina D2 (DRD2) e alterando o influxo de sódio e cálcio, o que sugere um papel fundamental do HERV-W-env na fisiopatologia neuronal⁶² e reduzindo a densidade dos neurônios do hipocampo, alterando sua morfologia dendrítica e pericária.⁵¹

Por outro lado, os pacientes do grupo TB não apresentaram diferença significativa na expressão de HERV-W-env em PBMC quando comparados ao GC ($p = 0,054$), contrastando com achados anteriores que relatam níveis significativamente mais elevados de expressão de HERV-W-env em sangue de pacientes com TB⁶³, assim como já descritos sendo mais elevados em cérebro também⁵².

Existem algumas hipóteses que podem explicar este achado, como por exemplo: todos os pacientes com TB estavam em condições eutímicas, o nível de

expressão poderia sofrer interferência negativa. Apesar de não existir evidências claras de que a expressão do HERV-W-env possa ser diferente de acordo com a manifestação clínica do TB, este dado pode variar mesmo que todos estivessem em condição eutímica, e embora não tenha sido encontrada diferença significativa, pode-se observar uma tendência à significância ($p=0,54$) e talvez essa diferença possa ser encontrada em um grupo maior de pacientes com TB no estudo.

Assim como no grupo ESQ, os níveis de concentração da citocina pró inflamatória TNF- α estava mais elevada em relação ao grupo controle e da citocina anti-inflamatória IL-10 estava menor em relação ao grupo controle. Curiosamente para este grupo (TB), obtivemos diferenças em relação a correlação de citocinas com o nível de expressão de HERV-W-env. Os pacientes com TB apresentaram correlação positiva entre a expressão de HERV-W-env e as razões TNF- α /IL-10, IFN- γ /IL-10 e correlação negativa entre a expressão de HERV-W-env com IL-10, o nível de concentração de TNF- α foi significativamente maior em pacientes com TB.

Existem estudo que sugerem que pode existir alterações nas citocinas de acordo com o estado de humor dos pacientes que são acometidos pelo TB, principalmente no estado agudo da doença, mas aparentemente o nível de TNF- α não parece mudar independente do estado de humor.^{64,65} Nossos achados podem sugerir que o HERV-W-env tem potencial para ser esse mediador, mas esta hipótese requer uma investigação mais aprofundada, como por exemplo acompanhamento de pacientes no primeiro surto psicótico e ao longo dos próximos anos, antes e após tratamento medicamentoso, avaliar estado de humor com escalas de sintomas, um painel de citocinas anti e pró-inflamatórias e também o nível de expressão de HERV.

Descobertas anteriores relatam que tanto os pacientes com ESQ, quanto com TB estão associados à desregulação da concentração sistêmica de citocinas. A principal hipótese é que esta condição inflamatória poderia interferir principalmente na permeabilidade das barreiras sanguíneas e cerebral.^{64,66} O perfil pró-inflamatório está claramente presente nestes indivíduos, e isto está de acordo com achados anteriores.⁶⁷⁻⁶⁹ Embora o quadro inflamatório seja bem conhecido nestes pacientes, o que desencadeia ainda não foi descoberto.⁷⁰

Embora a etiologia destes transtornos seja desconhecida, existem muitos fatores de riscos que podem contribuir para o desenvolvimento e até agravamento dos

quadros clínicos destes transtornos. Acredita-se que tanto na ESQ quanto no TB o perfil pró-inflamatório esteja presente e talvez em condição crônica, o que sugere que a modificação patológica no SNC pode começar muito antes do início da doença. Nesse sentido, a bagagem genética somada aos fatores ambientais fundamentais são necessários para desregular o equilíbrio do sistema imunológico.

Para ambos os grupos houve uma diferença em relação ao sexo quando comparado ao GC. Não existem evidências na literatura que demonstrem diferenças na prevalência entre homens e mulheres para ambas as doenças, porém embora estes transtornos sejam igualmente comuns entre homens e mulheres, a apresentação clínica pode ter algumas diferenças importantes. Mulheres com TB podem apresentar um padrão sazonal de perturbação de humor com mais frequência que os homens, isto pode ocorrer devido a questões hormonais, como por exemplo, período pré-menstrual, gravidez e menopausa, neste estudo 87% dos voluntários foram do sexo feminino para o grupo TB. No grupo ESQ, a maioria dos voluntários foram do sexo masculino (70%), na literatura também não há diferença na prevalência entre os gêneros, porém, a apresentação clínica pode variar e apresentar casos mais atenuados em homens, o que poderia justificar a presença de mais homens neste grupo, uma vez que os locais onde foram realizadas as coletas recebiam pessoas, geralmente, em um quadro mais agravante da doença.^{71,72}

Embora não existam muitos estudos que demonstrem diferenças para o nível de expressão de HERV-W-env entre sexos, um estudo demonstrou o nível de expressão de HERV-W-env, elevado para mulheres com EM, neste estudo, o grupo com maior quantidade de mulheres (TB) não obtivemos diferenças estatísticas para o nível de expressão. Apesar de serem doenças diferentes e de a diferença entre sexos para o nível de expressão de HERV-W-env ainda não estar bem estabelecida, não podemos descartar a possibilidade de pequenas alterações devido à variedade de homens e mulheres entre os grupos.⁷³

A variação na faixa etária entre os grupos foi mínima, e a etnia predominante em todos os grupos foi a parda. Em relação ao grau de escolaridade, as pessoas que faziam parte do GC, a maioria apresentava grau de escolaridade de ensino superior e estavam em situação de emprego atual, certamente isso ocorre em virtude do local onde estes indivíduos foram recrutados, já para as pessoas com TM a escolaridade estava entre ensino fundamental e médio e em termos de situação de emprego atual,

destaca-se que a maioria dos participantes do grupo TM afirmaram desemprego, isso favorece o estigma de que pessoas que enfrentam problemas na saúde mental enfrenta maiores dificuldades, afetando aspectos de educação e emprego.⁷⁴

Quanto ao uso de medicamento, notou-se uma variabilidade entre os tipos de medicações entre os grupos dos pacientes com TM. Existem alguns estudos que demonstram um potencial destes medicamentos atuando nos níveis de concentração de citocinas destas doenças tanto na ativação inflamatória e anti-inflamatória, porém esta atividade não é comum para todos os medicamento e depende da dose que cada paciente está utilizando.⁷⁵ Já para o nível de expressão de HERV, alguns medicamentos já foram estudados anteriormente, um estudo identificou que o valpoatro de sódio pode aumentar os níveis de expressão de HERV-W-em, porém neste estudo apenas 4 participantes estavam fazendo uso desta medicação no grupo que obtivemos diferenças estatísticas significantes nos resultados.⁷⁶

O papel do HERV-W ainda é pouco conhecido e não se pode afirmar que eles desempenham um papel etiológico para estes transtornos, no entanto, sabe-se que os HERVs podem estimular o perfil inflamatório tanto em condições fisiológicas como patológicas.^{5,77,78} Poucos estudos investigam a desregulação imunoinflamatória associada a retroelementos endógenos entre as doenças neuropsiquiátricas.

Existem algumas limitações no estudo que devem ser brevemente descritas: nenhum dos participantes incluídos no estudo estava sob episódios clínicos de ESQ ou TB no momento da coleta sanguínea, o que pode subestimar o nível de expressão de HERV-W e a concentração de citocinas nesta pesquisa, todos os pacientes estavam expostos a diferentes tipos de medicamentos durante o momento da coleta sanguínea, o estilo de vida e tabagismo também podem influenciar os níveis séricos de citocinas circulantes nos pacientes e o diagnóstico muitas vezes não eram de forma isolada, desta forma, não foi possível estratificar em subgrupos e em relação a sintomatologia de cada um deles.

7 CONCLUSÃO

Este estudo mostrou que o nível de expressão de HERV-W-env é diferente para pessoas que apresentam TM e apesar dos altos níveis de expressão de HERV-W-env em pacientes com ESQ, não parece estar associado à concentração de níveis de citocinas. Já os pacientes do grupo TB apresentam um papel distinto, onde a atividade de HERV-W-env pode estar modulando as condições inflamatórias destes pacientes, propondo um mecanismo distinto para entre estas doenças.

REFERÊNCIAS

1. Griffiths DJ. Endogenous retroviruses in the human genome sequence. *Genome Biol.* 2001;2(6):reviews1017.1. doi:10.1186/GB-2001-2-6-REVIEWS1017
2. Johnson WE. Endogenous Retroviruses in the Genomics Era. <http://dx.doi.org/101146/annurev-virology-100114-054945>. 2015;2:135-159. doi:10.1146/ANNUREV-VIROLOGY-100114-054945
3. Greenig M. HERVs, immunity, and autoimmunity: understanding the connection. *PeerJ.* 2019;7(4). doi:10.7717/PEERJ.6711
4. Song Y, Li X, Wei X, Cui J. Human Endogenous Retroviruses as Biomedicine Markers. *Virologica Sinica* 2021 36:5. 2021;36(5):852-858. doi:10.1007/S12250-021-00387-7
5. Rangel SC, da Silva MD, da Silva AL, et al. Human endogenous retroviruses and the inflammatory response: A vicious circle associated with health and illness. *Front Immunol.* 2022;13. doi:10.3389/FIMMU.2022.1057791
6. Grandi N, Tramontano E. Human endogenous retroviruses are ancient acquired elements still shaping innate immune responses. *Front Immunol.* 2018;9(SEP):2039. doi:10.3389/FIMMU.2018.02039/FULL
7. Hohn O, Hanke K, Bannert N. HERV-K(HML-2), the Best Preserved Family of HERVs: Endogenization, Expression, and Implications in Health and Disease. *Front Oncol.* 2013;3. doi:10.3389/FONC.2013.00246
8. Patience C, Wilkinson DA, Weiss RA. Our retroviral heritage. *Trends Genet.* 1997;13(3):116-120. doi:10.1016/S0168-9525(97)01057-3
9. Vargiu L, Rodriguez-Tomé P, Sperber GO, et al. Classification and characterization of human endogenous retroviruses; mosaic forms are common. *Retrovirology.* 2016;13(1):7. doi:10.1186/S12977-015-0232-Y
10. Grandi N, Tramontano E. Type W Human Endogenous Retrovirus (HERV-W) Integrations and Their Mobilization by L1 Machinery: Contribution to the Human Transcriptome and Impact on the Host Physiopathology. *Viruses.* 2017;9(7). doi:10.3390/V9070162
11. Bustamante Rivera YY, Brütting C, Schmidt C, Volkmer I, Staeger MS. Endogenous Retrovirus 3 – History, Physiology, and Pathology. *Front Microbiol.* 2017;8(JAN):2691. doi:10.3389/FMICB.2017.02691

12. Medstrand P, Landry JR, Mager DL. Long Terminal Repeats Are Used as Alternative Promoters for the Endothelin B Receptor and Apolipoprotein C-I Genes in Humans *. *Journal of Biological Chemistry*. 2001;276(3):1896-1903. doi:10.1074/JBC.M006557200
13. Sha M, Lee X, Li X ping, et al. Syncytin is a captive retroviral envelope protein involved in human placental morphogenesis. *Nature* 2000 403:6771. 2000;403(6771):785-789. doi:10.1038/35001608
14. Frese S, Ruebner M, Suhr F, et al. Long-Term Endurance Exercise in Humans Stimulates Cell Fusion of Myoblasts along with Fusogenic Endogenous Retroviral Genes In Vivo. *PLoS One*. 2015;10(7). doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0132099
15. Partridge TA, Davies KE. Myoblast-based gene therapies. *Br Med Bull*. 1995;51(1):123-137. doi:10.1093/OXFORDJOURNALS.BMB.A072942
16. Søe K, Andersen TL, Hobolt-Pedersen AS, Bjerregaard Bolette B, Larsson LI, Delaissé JM. Involvement of human endogenous retroviral syncytin-1 in human osteoclast fusion. *Bone*. 2011;48(4):837-846. doi:10.1016/J.BONE.2010.11.011
17. Ting CN, Rosenberg MP, Snow CM, Samuelson LC, Meisler MH. Endogenous retroviral sequences are required for tissue-specific expression of a human salivary amylase gene. *Genes Dev*. 1992;6(8):1457-1465. doi:10.1101/GAD.6.8.1457
18. SenGupta D, Tandon R, Vieira RGS, et al. Strong Human Endogenous Retrovirus-Specific T Cell Responses Are Associated with Control of HIV-1 in Chronic Infection. *J Virol*. 2011;85(14):6977. doi:10.1128/JVI.00179-11
19. Brinzevich D, Young GR, Sebra R, et al. HIV-1 Interacts with Human Endogenous Retrovirus K (HML-2) Envelopes Derived from Human Primary Lymphocytes. *J Virol*. 2014;88(11):6213. doi:10.1128/JVI.00669-14
20. Hurst TP, Magiorkinis G. Activation of the innate immune response by endogenous retroviruses. *J Gen Virol*. 2015;96(Pt 6):1207-1218. doi:10.1099/JGV.0.000017
21. 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. doi:10.1111/APM.12487
22. Geginat J, Paroni M, Pagani M, et al. The Enigmatic Role of Viruses in Multiple Sclerosis: Molecular Mimicry or Disturbed Immune Surveillance? *Trends Immunol*. 2017;38(7):498-512. doi:10.1016/J.IT.2017.04.006

23. Küry P, Nath A, Créange A, et al. Human Endogenous Retroviruses in Neurological Diseases. *Trends Mol Med*. 2018;24(4):379. doi:10.1016/J.MOLMED.2018.02.007
24. do Olival GS, Faria TS, Nali LHS, 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*. 2013;4(JUN). doi:10.3389/FMICB.2013.00172
25. Zhang M, Liang JQ, Zheng S. Expressional activation and functional roles of human endogenous retroviruses in cancers. *Rev Med Virol*. 2019;29(2). doi:10.1002/RMV.2025
26. Srinivasachar Badarinarayan S, Shcherbakova I, Langer S, et al. HIV-1 infection activates endogenous retroviral promoters regulating antiviral gene expression. *Nucleic Acids Res*. 2020;48(19):10890. doi:10.1093/NAR/GKAA832
27. Cegolon L, Salata C, Weiderpass E, Vineis P, Palù G, Mastrangelo G. Human endogenous retroviruses and cancer prevention: Evidence and prospects. *BMC Cancer*. 2013;13(1):1-10. doi:10.1186/1471-2407-13-4/FIGURES/3
28. Xue B, Sechi LA, Kelvin DJ. Human Endogenous Retrovirus K (HML-2) in Health and Disease. *Front Microbiol*. 2020;11. doi:10.3389/FMICB.2020.01690
29. Garcia-Montojo M, Doucet-O'Hare T, Henderson L, Nath A. Human Endogenous Retrovirus-K (HML-2): A comprehensive review. *Crit Rev Microbiol*. 2018;44(6):715. doi:10.1080/1040841X.2018.1501345
30. Li F, Karlsson H. Expression and regulation of human endogenous retrovirus W elements. *APMIS*. 2016;124(1-2):52-66. doi:10.1111/APM.12478
31. Wang PS, Aguilar-Gaxiola S, Alonso J, et al. Worldwide Use of Mental Health Services for Anxiety, Mood, and Substance Disorders: Results from 17 Countries in the WHO World Mental Health (WMH) Surveys. *Lancet*. 2007;370(9590):841. doi:10.1016/S0140-6736(07)61414-7
32. Global, regional, and national burden of 12 mental disorders in 204 countries and territories, 1990-2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet Psychiatry*. 2022;9(2):137-150. doi:10.1016/S2215-0366(21)00395-3
33. American Psychiatric Association. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-5)*. 5th ed. (American Psychiatric Publishing, ed.); 2013.
34. MedlinePlus. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). Mental Disorders.

35. Rush AJ, Trivedi MH, Wisniewski SR, et al. Acute and longer-term outcomes in depressed outpatients requiring one or several treatment steps: A STAR*D report. *American Journal of Psychiatry*. 2006;163(11):1905-1917. doi:10.1176/AJP.2006.163.11.1905/ASSET/IMAGES/LARGE/R114F4.JPEG
36. Harrison PJ, Geddes JR, Tunbridge EM. The Emerging Neurobiology of Bipolar Disorder. *Trends Neurosci*. 2018;41(1):18. doi:10.1016/J.TINS.2017.10.006
37. Owen MJ, Sawa A, Mortensen PB. Schizophrenia. *Lancet*. 2016;388(10039):86. doi:10.1016/S0140-6736(15)01121-6
38. Köhler O, Krogh J, Mors O, Benros ME. Inflammation in Depression and the Potential for Anti-Inflammatory Treatment. *Curr Neuropharmacol*. 2016;14(7):732. doi:10.2174/1570159X14666151208113700
39. Anthony DC, Couch Y, Losey P, Evans MC. The systemic response to brain injury and disease. *Brain Behav Immun*. 2012;26(4):534-540. doi:10.1016/J.BBI.2011.10.011
40. Muneer A. Bipolar Disorder: Role of Inflammation and the Development of Disease Biomarkers. *Psychiatry Investig*. 2016;13(1):18. doi:10.4306/PI.2016.13.1.18
41. Jones GH, Vecera CM, Pinjari OF, Machado-Vieira R. Inflammatory signaling mechanisms in bipolar disorder. *J Biomed Sci*. 2021;28(1):45. doi:10.1186/S12929-021-00742-6
42. Köhler-Forsberg O, Müller N, Lennox BR. Editorial: The Role of Inflammation in the Etiology and Treatment of Schizophrenia. *Front Psychiatry*. 2020;11:603296. doi:10.3389/FPSYT.2020.603296
43. Fond G, Lançon C, Korchia T, Auquier P, Boyer L. The Role of Inflammation in the Treatment of Schizophrenia. *Front Psychiatry*. 2020;11:160. doi:10.3389/FPSYT.2020.00160
44. Smith SEP, Li J, Garbett K, Mirnics K, Patterson PH. Maternal immune activation alters fetal brain development through interleukin-6. *J Neurosci*. 2007;27(40):10695-10702. doi:10.1523/JNEUROSCI.2178-07.2007
45. Berk M, Williams LJ, Jacka FN, et al. So depression is an inflammatory disease, but where does the inflammation come from? *BMC Med*. 2013;11(1):200. doi:10.1186/1741-7015-11-200

46. Patel JP, Frey BN. Disruption in the Blood-Brain Barrier: The Missing Link between Brain and Body Inflammation in Bipolar Disorder? *Neural Plast.* 2015;2015. doi:10.1155/2015/708306
47. Misiak B, Ricceri L, Sasiadek MM. Transposable Elements and Their Epigenetic Regulation in Mental Disorders: Current Evidence in the Field. *Front Genet.* 2019;10(JUN). doi:10.3389/FGENE.2019.00580
48. Wang X, Liu Z, Wang P, et al. Syncytin-1, an endogenous retroviral protein, triggers the activation of CRP via TLR3 signal cascade in glial cells. *Brain Behav Immun.* 2018;67:324-334. doi:10.1016/J.BBI.2017.09.009
49. Wang X, Huang J, Zhu F. Human Endogenous Retroviral Envelope Protein Syncytin-1 and Inflammatory Abnormalities in Neuropsychological Diseases. *Front Psychiatry.* 2018;9(SEP). doi:10.3389/FPSYT.2018.00422
50. Perron H, Mekaoui L, Bernard C, Veas F, Stefan I, Leboyer M. Endogenous Retrovirus Type W GAG and Envelope Protein Antigenemia in Serum of Schizophrenic Patients. *Biol Psychiatry.* 2008;64(12):1019-1023. doi:10.1016/J.BIOPSYCH.2008.06.028
51. Yao W, Zhou P, Yan Q, et al. ERVWE1 Reduces Hippocampal Neuron Density and Impairs Dendritic Spine Morphology through Inhibiting Wnt/JNK Non-Canonical Pathway via miR-141-3p in Schizophrenia. *Viruses.* 2023;15(1). doi:10.3390/V15010168/S1
52. Li F, Sabunciyan S, Yolken RH, Lee D, Kim S, Karlsson H. Transcription of human endogenous retroviruses in human brain by RNA-seq analysis. *PLoS One.* 2019;14(1). doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0207353
53. Ellul P, Groc L, Leboyer M. Les rétrovirus endogènes humains, une implication dans la schizophrénie et le trouble bipolaire. *médecine/sciences.* 2017;33(4):404-409. doi:10.1051/MEDSCI/20173304010
54. Charvet B, Brunel J, Pierquin J, et al. SARS-CoV-2 induces human endogenous retrovirus type W envelope protein expression in blood lymphocytes and in tissues of COVID-19 patients. *medRxiv.* Published online January 21, 2022:2022.01.18.21266111. doi:10.1101/2022.01.18.21266111
55. 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.* 2006;3(1):1-11. doi:10.1186/1742-4690-3-44/TABLES/2

56. Rodrigues LS, Da Silva Nali LH, Leal COD, et al. HERV-K and HERV-W transcriptional activity in myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome. *Autoimmunity Highlights*. 2019;10(1):1-5. doi:10.1186/S13317-019-0122-8/FIGURES/1
57. de Jonge HJM, Fehrmann RSN, de Bont ESJM, et al. Evidence Based Selection of Housekeeping Genes. *PLoS One*. 2007;2(9):e898. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0000898
58. Balestrieri E, Pica F, Matteucci C, et al. Transcriptional Activity of Human Endogenous Retroviruses in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Biomed Res Int*. 2015;2015. doi:10.1155/2015/164529
59. Leboyer M, Tamouza R, Charron D, Faucard R, Perron H. Human endogenous retrovirus type W (HERV-W) in schizophrenia: A new avenue of research at the gene–environment interface. <http://dx.doi.org/10.3109/156229752010601760>. 2013;14(2):80-90. doi:10.3109/15622975.2010.601760
60. Arias I, Sorlozano A, Villegas E, et al. Infectious agents associated with schizophrenia: A meta-analysis. *Schizophr Res*. 2012;136(1-3):128-136. doi:10.1016/J.SCHRES.2011.10.026
61. Li X, Wu X, Li W, et al. HERV-W ENV Induces Innate Immune Activation and Neuronal Apoptosis via linc01930/cGAS Axis in Recent-Onset Schizophrenia. *Int J Mol Sci*. 2023;24(3). doi:10.3390/IJMS24033000
62. Yan Q, Wu X, Zhou P, et al. HERV-W Envelope Triggers Abnormal Dopaminergic Neuron Process through DRD2/PP2A/AKT1/GSK3 for Schizophrenia Risk. *Viruses*. 2022;14(1). doi:10.3390/V14010145
63. Perron H, Hamdani N, Faucard R, et al. Molecular characteristics of Human Endogenous Retrovirus type-W in schizophrenia and bipolar disorder. *Transl Psychiatry*. 2012;2(12):e201. doi:10.1038/TP.2012.125
64. Altamura AC, Buoli M, Pozzoli S. Role of immunological factors in the pathophysiology and diagnosis of bipolar disorder: Comparison with schizophrenia. *Psychiatry Clin Neurosci*. 2014;68(1):21-36. doi:10.1111/PCN.12089
65. Sigitova E, Fišar Z, Hroudová J, Cikánková T, Raboch J. Biological hypotheses and biomarkers of bipolar disorder. *Psychiatry Clin Neurosci*. 2017;71(2):77-103. doi:10.1111/PCN.12476

66. Watanabe Y, Someya T, Nawa H. Cytokine hypothesis of schizophrenia pathogenesis: Evidence from human studies and animal models. *Psychiatry Clin Neurosci*. 2010;64(3):217-230. doi:10.1111/J.1440-1819.2010.02094.X
67. Rosenblat JD, McIntyre RS. Bipolar Disorder and Inflammation. *Psychiatr Clin North Am*. 2016;39(1):125-137. doi:10.1016/J.PSC.2015.09.006
68. Saccaro LF, Crokaert J, Perroud N, Piguet C. Structural and functional MRI correlates of inflammation in bipolar disorder: A systematic review. *J Affect Disord*. 2023;325:83-92. doi:10.1016/J.JAD.2022.12.162
69. Quidé Y, Bortolasci CC, Spolding B, et al. Systemic inflammation and grey matter volume in schizophrenia and bipolar disorder: Moderation by childhood trauma severity. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2021;105. doi:10.1016/J.PNPBP.2020.110013
70. Freund N, Juckel G. Bipolar Disorder: Its Etiology and How to Model in Rodents. *Methods Mol Biol*. 2019;2011:61-77. doi:10.1007/978-1-4939-9554-7_4
71. Fellingner M, Waldhoer T, König D, et al. Seasonality in bipolar disorder: Effect of sex and age. *J Affect Disord*. 2019;243:322-326. doi:10.1016/J.JAD.2018.09.073
72. Häfner H, An Der Heiden W. Epidemiology of schizophrenia. *Can J Psychiatry*. 1997;42(2):139-151. doi:10.1177/070674379704200204
73. Garcia-Montojo M, Dominguez-Mozo M, Arias-Leal A, et al. The DNA Copy Number of Human Endogenous Retrovirus-W (MSRV-Type) Is Increased in Multiple Sclerosis Patients and Is Influenced by Gender and Disease Severity. *PLoS One*. 2013;8(1). doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0053623
74. Ngui EM, Khasakhala L, Ndeti D, Roberts LW. Mental disorders, health inequalities and ethics: A global perspective. *Int Rev Psychiatry*. 2010;22(3):235. doi:10.3109/09540261.2010.485273
75. Obuchowicz E, Bielecka-Wajdman AM, Paul-Samojedny M, Nowacka M. Different influence of antipsychotics on the balance between pro- and anti-inflammatory cytokines depends on glia activation: An in vitro study. *Cytokine*. 2017;94:37-44. doi:10.1016/J.CYTO.2017.04.004
76. Diem O, Schäffner M, Seifarth W, Leib-Mösch C. Influence of Antipsychotic Drugs on Human Endogenous Retrovirus (HERV) Transcription in Brain Cells. *PLoS One*. 2012;7(1). doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0030054

77. Buzdin AA, Prassolov V, Garazha A V. Friends-Enemies: Endogenous Retroviruses Are Major Transcriptional Regulators of Human DNA. *Front Chem.* 2017;5(JUN). doi:10.3389/FCHEM.2017.00035
78. Perron H, Germe R, Bernard C, et al. Human endogenous retrovirus type W envelope expression in blood and brain cells provides new insights into multiple sclerosis disease. *Mult Scler.* 2012;18(12):1721-1736. doi:10.1177/1352458512441381

ANEXOS

Anexo 1 - Termo de consentimento livre e esclarecido assinado pelos voluntários do estudo

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO

Título da pesquisa: TEMPO E PADRÃO DE ATIVIDADE FÍSICA E COMPORTAMENTO SEDENTÁRIO E SUA RELAÇÃO COM INDICADORES DE SAÚDE CARDIOVASCULAR EM PESSOAS COM TRANSTORNO BIPOLAR, DEPRESSÃO E ESQUIZOFRENIA

O(a) senhor(a) está sendo convidado(a) a participar de forma livre e voluntária de uma pesquisa científica do Programa de Pós Graduação Mestrado em Ciências da Saúde da Universidade de Santo Amaro - UNISA, sendo os responsáveis a pesquisadora Tabatah Hellen Santos Gomes sob orientação do Prof. Dr. Lucas Melo Neves.

A falta de movimento do seu corpo (inatividade física e comportamento sedentário) influencia diretamente o desenvolvimento de doenças cardiovasculares e pessoas acometidas de transtorno bipolar, depressão ou esquizofrenia, apresentam mais esses comportamentos quando comparadas com pessoas sem o diagnóstico. Assim possuem maior chance de desenvolverem doenças cardiovasculares. Nosso objetivo é quantificar em minutos e identificar como sua atividade física e comportamento sedentário são realizados e verificar indicadores doenças cardiovasculares.

Caso queira participar, precisará apenas utilizar um pequeno equipamento (acelerômetro) ao lado direito de sua cintura por 7 dias consecutivos; o equipamento ficará preso em uma faixa elástica, como um cinto. Ele não interfere nas tarefas cotidianas, não faz barulho, não precisa estar em contato direto com a pele, não vibra e não causa dor. Deve ser utilizado 12 horas por dia ou mais, e retirado apenas para tomar banho e dormir. Além disso será avaliado em uma entrevista e participará de uma coleta de sangue de 5ml (um exame de sangue, onde coletamos amostra de sangue).

Assim, nossa pesquisa acontecerá da seguinte maneira:

Encontro 1:

- Apresentação e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE);
- Entrevista psiquiátrica (MINI) para verificação de diagnóstico da doença e avaliação sintomas de depressão (MADRS), sintomas de mania [Young Mania Rating Scale (YMRS)] ou Psicose [Psychosis Evaluation tool for Common use by Caregivers (PEEC)], para sintomas de esquizofrenia.
- Entrega do equipamento (acelerômetro) e entrega das orientações sobre uso.
- Avaliações cardiovasculares – coleta de sangue, IMC (peso e altura), circunferência de cintura e pressão arterial.

OBS: As amostras sanguíneas serão encaminhadas ao Laboratório de análises da Unisa – “Unisa Research Center – URC” para a avaliação e após serão descartadas.

Encontro 2:

- Entrega do equipamento para análise dos dados.
- Apresentação dos resultados e sugestões de como se tornar mais ativo.

As entrevistas serão individuais, os questionários (físicos) e os dados obtidos por meio do acelerômetro serão utilizados de forma anônima, garantindo confidencialidade à identidade dos participantes e depois serão arquivados. O participante tem o direito de não responder as perguntas que não se sentir à vontade, não participar de todo estudo, ou de todas as avaliações. Caso opte por não participar, não haverá em prejuízo nos atendimentos oferecidos normalmente pelo SUS, ou seja, isso não implicará no direito aos tratamentos e acompanhamentos que faz.

Os riscos envolvidos são pequenos ou médios. Pequenos (entrevista e uso de acelerômetros) A entrevista consiste em um diálogo similar a uma consulta. O uso de acelerômetro avalia a movimentação corporal (avaliação por acelerometria), sendo na mais intensa atividade, similar a prática de uma sessão de exercício físico. A coleta de sangue (avaliação invasiva) que apesar de representar risco médio, tem tal condição minimizada em função dos protocolos de coletas mundialmente padronizados. A punção venosa pode ocasionar, ainda que com baixa probabilidade, sensação de dor local no momento da punção e possível formação de hematoma, com ausência ou presença de vermelhidão, dor, e inchaço local. Os benefícios aos participantes são: detalhamento personalizado sobre o tempo de atividade física moderada e vigorosa, e comportamento sedentário, seguido de sugestões para aumento da movimentação corporal, como se tornar mais ativo. Além de, informações relacionadas aos graus de sintomas depressivos, ou de manias, ou positivos e negativos (esquizofrenia), obtidos através das avaliações.

A equipe de pesquisa se responsabiliza por toda a assistência que se fizer necessária por agravo imediato ou posterior, direto ou indireto, ao indivíduo ou à coletividade em decorrência da pesquisa. Caso necessário encaminhamento a serviço médico durante a coleta de dados, o participante será direcionado ao serviço médico adequado do sistema Único de Saúde, com acompanhamento. Caso ocorra fora da coleta de dados, os familiares serão orientados a encaminhar o participante ao serviço médico adequado do sistema Único de Saúde. Para tanto, é garantido o acesso, em qualquer etapa do estudo, aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas, informações ou intercorrências com o pesquisador responsável é Prof. Dr. Lucas Melo Neves, que pode ser encontrado no endereço Rua Professor Enéas de Siqueira Neto, 340, telefone (11) 94573-3515, ou com a pesquisadora mestranda Tabatah Hellen Santos Gomes, no telefone (11)96238-2568. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP- UNISA) – Rua Prof. Enéas de Siqueira Neto, 340, Jardim das Imbuías, SP – Tel.: 2141-8687 ou com o Comitê de Ética e Pesquisa da

Secretaria Municipal da Saúde (CEP/SMS): Rua Gomes de Carvalho, 250, Vila Olímpia, telefone 38464815 ramal 228.

É garantida sua liberdade de retirada de consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de qualquer benefício que você tenha obtido junto à Instituição, antes, durante ou após o período deste estudo. As informações obtidas pelos pesquisadores serão analisadas em conjunto com as de outros participantes, não sendo divulgada a identificação de nenhum deles.

Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

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.

Você receberá uma via deste Termo de Consentimento (não é uma cópia), assinada e rubricada em todas as páginas pela equipe de pesquisa e por você, esta ficará em seu poder.

São Paulo, / /

Se você concordar em participar desta pesquisa preencha no espaço determinado abaixo seu nome completo e assinatura.

Nome: (do participante):

Ass:

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.

Local, / / .

Assinatura do pesquisador responsável pelo estudo: _____

Anexo 2 - Questionário respondido pelos voluntários do estudo

QUESTIONÁRIO

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

Data: _____ Idade: _____ Sexo: () M () F

Celular: _____ Profissão ou última profissão: _____

Etnia: negra parda branca oriental indígena

Estado civil: _____

ANO DE DIAGNÓSTICO DA DOENÇA: _____

HÁ QUANTO TEMPO FREQUENTA O CAPS/Policlínica? _____

QUAIS TRATAMENTOS REALIZA? (terapia, acompanhamentos médicos etc.)

UTILIZA ALGUM TIPO DE MEDICAMENTO?

HISTÓRICO FAMILIAR DE DOENÇA AUTOIMUNE?

POSSUI ALGUMA OUTRA DOENÇA (hipertensão arterial, diabetes mellitus, distúrbios musculoesqueléticos, obesidade ou qualquer outra que estiver sendo tratada)? FAZ USO DE MEDICAMENTO PARA ELAS?

ALGUMA PESSOA DA FAMÍLIA APRESENTA O MESMO DIAGNÓSTICO QUE O SEU E/OU OUTRO TRANSTORNO MENTAL?

ESCOLARIDADE:

Ensino Fundamental

Ensino Superior

Ensino Médio

Pós-graduação

OBSERVAÇÕES RELEVANTES:
