



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação dos mecanismos da ativação da hemostasia em pacientes com COVID-19

Pesquisador: Erich Vinicius de Paula

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 36528420.3.0000.5404

Instituição Proponente: Centro de Hematologia e Hemoterapia - HEMOCENTRO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.237.393

Apresentação do Projeto:

a) As informações contidas nos campos "Apresentação do Projeto", "Objetivo da Pesquisa", "Avaliação dos Riscos e Benefícios" e "Comentários e Considerações sobre a Pesquisa" foram obtidas dos documentos apresentados para apreciação ética pelo CEP e das informações inseridas pelo Pesquisador responsável pelo estudo, na Plataforma Brasil.

1. A pandemia pelo novo coronavírus (SARS-CoV-2) e a COVID-19 A pandemia causada pela infecção pelo vírus agora denominado SARS-CoV-2 ("severe acute respiratory syndrome corona virus 2") teve início documentado em dezembro de 2019 na cidade Wuhan [1], de onde se espalhou rapidamente pelo planeta [2]. A doença causada por este vírus, denominada pela Organização Mundial de Saúde como COVID-19 [3] é caracterizada por um quadros assintomáticos e/ou leves (sintomas gripais isolados) em aproximadamente 80% dos infectados, mas em cerca de 20% dos pacientes pode evoluir para pneumonia e alterações inflamatórias sistêmicas, com necessidade de suporte intensivo em parte significativa destes pacientes [4,5]. Embora a definição precisa da letalidade da COVID-19 seja ainda desconhecida, devido à grande variação nas estratégias de testagem de assintomáticos e sintomáticos, valores em torno de 0,4% a 1% são mais frequentemente citados. A COVID-19 é caracterizada por sintomas gripais como tosse seca, febre, odinofagia e mialgia [6], sendo seu agravamento em geral caracterizado por hipoxemia e dispneia cerca de uma semana após o início dos sintomas, associados a infiltrados pulmonares, mais frequentemente com padrão de "vidro fosco" na tomografia computadorizada. Estes sintomas

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br

Continuação do Parecer: 4.237.393

podem evoluir para Síndrome da Angústia Respiratória Aguda (SARA) [4] com necessidade de ventilação mecânica e elevada mortalidade. Um dos aspectos intrigantes da fisiopatologia da COVID-19 é a intensa ativação da hemostasia observada particularmente no grupo de pacientes que evoluem com os piores desfechos. Esta ativação é caracterizada tanto por alterações laboratoriais (em particular, aumento de dímeros D) e clínicas, caracterizadas por risco elevado de tromboembolismo venoso (TEV) [5,7–9]. A partir destas constatações, vários centros vêm explorando o uso de drogas antitrombóticas nestes pacientes [10].

2. O modelo de imunotrombose e a ativação da hemostasia nas infecções Hemostasia e imunidade inata são hoje considerados dois elementos da resposta individual a patógenos e a danos teciduais [11,12]. As evidências desta associação incluem dados filogenéticos, estudos em modelos animais e dados epidemiológicos. Uma revisão abrangente desta associação foi publicada por nosso grupo em 2015 de modo que detalhes serão omitidos [13]. Embora estas evidências já estivessem disponíveis há menos uma década, sua formulação em um modelo fisiopatológico unificado ocorreu de forma definitiva em 2013, quando Engelmann & Massberg propuseram o termo imunotrombose [11], a partir das evidências então emergentes de que os neutrófilos, através da liberação de redes extracelulares (NETs, do inglês “neutrophil extracellular traps”), poderiam contribuir tanto para a erradicação de patógenos, quanto para a fisiopatologia de eventos tromboembólicos, entre os quais a CIVD. De acordo com o modelo de imunotrombose, a ativação local da hemostasia é essencial para a compartimentalização de focos infecciosos (ou para reparo de dano tecidual), pois facilita tanto a migração de fagócitos quanto sua atividade microbicida. Um esquema dos elementos desta resposta é mostrado na figura 1, e incluem entre outros: (i) expressão de fator tecidual (o principal ativador da hemostasia) por monócitos e por micropartículas circulantes; (ii) a ativação da via intrínseca da coagulação através do DNA liberado pela formação de NETs; e (iii) a modulação da integridade da barreira endotelial (BE) de modo a facilitar o acesso de fagócitos aos tecidos. Por outro lado, se ativado de forma muito intensa, ou em locais onde não haveria necessidade de ativação, este mesmo processo pode contribuir para a fisiopatologia de diversas doenças, como a trombose venosa profunda, as tromboes arteriais e a CIVD. O modelo de imunotrombose é portanto útil para a compreensão da frequente coativação da hemostasia em doenças inflamatórias e/ou infecciosas. Analogamente, o estudo de vias celulares de ativação da hemostasia durante uma infecção ou inflamação - que não são exatamente as mesmas utilizadas em caso de lesão tecidual - pode abrir caminho para a compreensão da fisiopatologia destas doenças. Figura 1. Imunotrombose. Este desenho esquemático elaborado por Engelman & Massberg [11] mostra o efeito de patógenos (em verde) sobre diferentes

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br

Continuação do Parecer: 4.237.393

compartimentos da hemostasia tais como ativação plaquetária, expressão de fator tecidual em monócitos, e da via intrínseca (FXII) via NETs. 3. Mecanismos de ativação da hemostasia durante processos infecciosos Como já destacado, os mecanismos de ativação da hemostasia diferem conforme o contexto em que ela ocorre. Em estados não inflamatórios e na ausência de lesão tecidual, o endotélio atua como superfície anticoagulante, enquanto as plaquetas circulam de forma inativada, e o fator tecidual encontra-se separado do ambiente intravascular, ou em forma críptica. Quando ocorre lesão tecidual, a ativação plaquetária ocorre e a ativação das cascata da coagulação ocorrem pelas vias canônicas baseadas nas glicoproteínas IIb/IIIa e exposição de fator tecidual respectivamente [14]. Um aspecto relevante para nosso estudo é que em estados inflamatórios, mesmo na ausência de lesão tecidual, a hemostasia é ativada por vias descritas mais recentemente tais como a ativação da via intrínseca da hemostasia pelo DNA livre liberado pelos NETs [15] e por polifostatos [16], ativação via fator tecidual expresso em micropartículas (MPs) circulantes [17,18], a via das angiopoietinas (Ang) 1 e 2 e do receptor tirosina quinase Tie2 [19], e a via que envolve a podoplanina e os receptores plaquetários CLEC-2 [20]. Independente do mecanismo, o desfecho final será um aumento da geração de trombina, seguido por ativação do sistema fibrinolítico, cuja intensidade e regulação definirá se o processo contribui apenas para a erradicação do patógeno (resposta fisiológica) ou se também concorrerá para lesão secundária, como explicado no modelo de imunotrombose. De fato, embora as infecções sejam reconhecidas como uma das principais causas de ativação da coagulação, se sabe muito pouco sobre como diferentes patógenos modulam a hemostasia, e qual a relevância fisiopatológica desta modulação. 4. A ativação da hemostasia na COVID-19 Uma das características mais intrigantes da COVID-19 é a frequência com que quadros graves são acompanhados por aumento sustentando dos níveis de dímeros D, e também pela alta incidência de tromboembolismo venoso (TEV). Em um estudo retrospectivo com 191 pacientes de Wuhan, China, o aumento de dímeros D na admissão foi um fator independente de mortalidade para pacientes com Covid-19 [5], fato replicado em muitos outros centros. Quanto à frequência de TEV, incidências próximas a 50% já foram relatadas, embora estudos mais recentes estejam descrevendo valores entre 10 e 20%, o que já representa um aumento em comparação a outras infecções [8,9,21]. Além disso, um grupo chinês reportou recentemente que o uso de heparina em dose profilática se associou a ganho de sobrevida em pacientes com Covid-19 [10], abrindo caminho para uma série de estudos clínicos explorando o uso de drogas antitrombóticas para tratamento desta condição. Em conjunto, estas informações suscitam a seguinte questão: seria a ativação da hemostasia na Covid-19 apenas uma consequência da resposta inflamatória, ou ela também um mecanismo efetor de lesão tecidual?

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br

Continuação do Parecer: 4.237.393

Embora a resposta a esta pergunta só possa ser respondida por estudos clínicos randomizados, acreditamos que uma análise dos mecanismos pelos quais a hemostasia é ativada nesta doença possa ser importante para o eventual desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para as formas graves da Covid-19, assim como para condições relacionadas que possam porventura emergir no futuro. 5. A regulação da integridade da BE como parte da imotrombose e seu crosstalk com a ativação da hemostasia A quebra da BE é parte essencial da resposta imune inata, pois dela depende a migração de fagócitos para os tecidos (diapedese) [22]. No entanto, da mesma forma que ativação desregulada da hemostasia pode gerar dano secundário, acredita-se que a ativação desregulada de vias que modulam a quebra da BE também possa contribuir com a quebra da barreira alveolo-capilar observada na SARA [23]. As vias pelas quais a integridade da BE é regulada durante a resposta imune envolvem mediadores como o VEGF-A e as angiopoietinas 1 e 2, que atuam sobre seus receptores VEGFR-1 e 2, e Tie2 respectivamente [24,25]. As vias de sinalização ativadas por estes receptores modulam o tráfego da VE-caderina, principal proteína das junções aderentes entre células endoteliais, e Rho GTPases que regulam as interações entre proteínas das junções com o citoesqueleto de actina. Há dados que mostram que o nível de VEGF-A, Ang1, Ang2 e VE-caderina solúvel encontram-se aumentados em pacientes com sepse, e que este aumento se associa à gravidade do quadro clínico [26,27]. Interessantemente, foi demonstrado em 2018 o crosstalk entre esta via de regulação da integridade da BE dependente de Ang1/2 e Tie2 com a ativação da coagulação mediada pela expressão de fator tecidual [19]. Esta interação faz sentido segundo o modelo de imotrombose, já que ambos os processos fazem parte do arsenal usado pelo sistema imune durante a resposta inflamatória. Considerando que a Covid-19 é uma condição associada tanto à ativação da hemostasia quanto a lesão pulmonar aguda, entendemos ser relevante também o estudo desta via, bem como sua correlação com desfechos clínicos, nestes pacientes. 6. Modulação da hemostasia e da integridade da barreira alveolo capilar por inibidores de bradicinina na Covid-19 Um importante elemento adicional relacionado à fisiopatologia da COVID-19 que torna relevante o estudo destas duas vias é a possibilidade de que estes pacientes apresentem aumentos dos níveis de Des-Arg-Bradicinina (DABK), secundário a uma redução adquirida da atividade da enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2), que serve como receptor para o SARS-CoV-2 [28]. De fato, já foi demonstrado que o LPS induz o acúmulo de DABK ao reduzir a atividade de ACE2, e que isto leva a um aumento da inflamação pulmonar, mediado pelas ações da bradicinina ligadas a seu receptor B1. Além disso, é também conhecido que a ativação da via intrínseca da coagulação e a produção de bradicinina são mediadas por vias comuns, dependentes do fator XII da coagulação [29,30], cujo papel na ativação

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br

Continuação do Parecer: 4.237.393

da hemostasia durante a Covid-19 é desconhecido. Desta forma, torna-se razoável a hipótese de que o uso de inibidores da bradicinina possam modular ao menos parcialmente os mecanismos que regulam a integridade da BE e/ou a ativação da hemostasia em pacientes com Covid-19. HIPÓTESE A infecção pelo SARS-Cov-2 (COVID-19) está associada a ativação da hemostasia e a quebra de barreira endotelial, e estes efeitos podem ser modificados pelo uso de inibidores de bradicinina.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo geral

Avaliar a presença de perturbações em vias de ativação da hemostasia e modulação da integridade da barreira endotelial em pacientes com COVID-19 em uso de inibidores de bradicina ou em tratamento de suporte padrão.

Objetivos específicos

- 1) Avaliar alterações no padrão da ativação da hemostasia em pacientes com COVID-19 na admissão e durante o seguimento.
- 2) Avaliar alterações em mediadores inflamatórios que atuam na regulação da integridade da barreira endotelial em pacientes com COVID-19 na admissão e durante o seguimento.
- 3) Correlacionar os achados laboratoriais com dados clínicos dos pacientes, e com as modalidades de tratamento utilizadas.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo o pesquisador responsável:

Os riscos de participação no projeto estão relacionados à coleta das amostras. Como as amostras serão obtidas em uma mesma punção venosa utilizada para coleta de exames usados no tratamento dos pacientes, não haverá punção específica para os pacientes. Para os controles saudáveis, os riscos se referem à punção venosa. Nesta punção, que é um procedimento de rotina, o participante poderá sentir leve dor, ou apresentar pequenas manchas roxas no local da picada. Para amenizar estes possíveis desconfortos a coleta de sangue será realizada por uma equipe treinada que a realiza diariamente. Cuidados locais serão tomados para a diminuição do desconforto, tais como: compressão do local puncionado por cerca de 5 minutos e uso de curativo conforme avaliação de necessidade pela equipe de enfermagem. Quanto à privacidade, dados dos participantes serão codificados, de modo que a identidade não será revelada em nenhum momento do estudo.

Benefícios:

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 4.237.393

Não há benefícios diretos na participação neste projeto. No entanto, sua participação neste estudo será importante para melhor entendimento sobre esta doença.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de um projeto de pesquisa a ser realizado por um docente do Departamento de Clínica Médica-Faculdade de Ciências Médicas (FCM)-Unicamp, no Laboratório de Hemostasia e Inflamação, coordenado pelo próprio docente.

MATERIAIS E MÉTODOS

Estratégia geral e aspectos éticos do estudo

O estudo será realizado a partir da análise de parâmetros laboratoriais da coagulação em amostras de pacientes internados no Hospital de Clínicas da Unicamp, Campinas, SP com diagnóstico de COVID-19. Serão incluídos pacientes duas coortes independentes: a primeira consiste em pacientes (n=30) que participaram de ensaio clínico sob responsabilidade do Prof. Dr. Lício A. Velloso intitulado “Ensaio Clínico de Inibição de Bradicicina em Adultos Hospitalizados com COVID-19 Grave” já aprovado pelo Comitê de Ética (CAAE 30227920.9.0000.5404; Parecer 3.979.595). Estes participantes já consentiram a avaliação da atividade inflamatória nas amostras coletadas do estudo (um dos objetivos secundários do estudo) e nosso laboratório será responsável por parte desta análise. Para tal, apresentamos a anuência do pesquisador principal do projeto, com autorização para o uso das amostras do biorrepositório do ensaio clínico (anexo 1). Estas amostras serão analisadas nos seguintes momentos: admissão, +4, +8 e no dia da alta (ou 28º dia), que foram os tempos previstos na aprovação. A segunda coorte consiste em pacientes com diagnóstico confirmado de COVID-19 recrutados prospectivamente (n=30) de forma específica para este estudo, mediante assinatura do TCLE específico deste projeto (anexo 2). Quanto aos indivíduos saudáveis que serão utilizados como controle, as amostras serão obtidas de duas fontes: (a) recrutamento ativo de familiares/acompanhantes de pacientes do Hemocentro da Unicamp ou colaboradores do staff da mesma instituição (n=30), mediante assinatura de TCLE específico (anexo 3); ou (b) amostras de controles saudáveis armazenadas no biorrepositório (n=30) de um outro projeto, intitulado “Avaliação do papel da ativação endotelial na fisiopatologia Leucemia Promielocítica” sob responsabilidade do Prof. Erich V. de Paula (também responsável pela presente proposta) CAAE 13426919.0.0000.5404, aprovado pelo CEP no parecer 3.532.780 de 26/08/2019. Em tempo, este outro projeto também explora a ativação da hemostasia e a ativação endotelial, de modo que os voluntários saudáveis que consentiram sua participação o fizeram para esta mesma análise. Para tal, anexamos a autorização do responsável sobre o uso destas amostras de controle (anexo 4).

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br

Continuação do Parecer: 4.237.393

População do estudo

PACIENTES

Os pacientes da coorte 2 serão recrutados em até 72 horas da admissão hospitalar. Os critérios de inclusão e exclusão da coorte 2 serão idênticos aos utilizados para recrutamento da coorte 1 (estudo clínico já aprovado), a saber:

Critérios de inclusão:

18 anos ou mais, com diagnóstico confirmado de Covid-19 por PCR em tempo real, saturação de oxigênio em ar ambiente de 94% ou menos e pneumonia confirmada por tomografia computadorizada, e consentimento para participação mediante assinatura de TCLE.

Critérios de exclusão:

Gestação, amamentação, transplantados renais ou pacientes em diálise prévia, AST ou ALT maior que cinco vezes o valor da normalidade, presença de imunodeficiências congênitas, câncer em tratamento, angioedema hereditária, antecedente de coronariopatia isquêmica ou tromboembolismo venoso.

CONTROLES SAUDÁVEIS

Critérios de inclusão:

18 anos ou mais.

Critérios de exclusão:

Gestação, amamentação, presença de qualquer quadro inflamatório (agudo ou crônico) no momento da coleta; presença de antecedentes pessoais de tromboes arteriais ou venosas.

Coleta e processamento das amostras

O procedimento de coleta dos participantes incluídos prospectivamente mediante assinatura do TCLE será o mesmo do utilizado para obtenção das amostras obtidas dos biorrepositórios. As amostras serão coletadas durante a coleta de amostras de rotina das enfermarias, por punção venosa periférica ou por catéter central, sendo que neste caso, os 3 ml de sangue iniciais serão descartados. Amostras de sangue total serão coletadas em tubos com o anticoagulante citrato de sódio 3,2% (2 tubos com 4,5 ml) ou EDTA K2 (2 tubos com 3,5ml cada). As amostras em citrato de sódio serão submetidas a dois ciclos de centrifugação em temperatura ambiente, a 1.800g por 15 minutos. Após o primeiro ciclo, o plasma pobre em plaquetas será transferido para um tubo de polipropileno e recentrifugado para produção de plasma isento de plaquetas, que será congelado em alíquotas de 300 uL a -80° C, até o momento das análises. As amostras coletadas em tubos com EDTA K2 serão submetidas a um ciclo de centrifugação em temperatura ambiente, a 1800g por 15 minutos. Alíquotas de 300 uL de plasma serão congeladas a -80° C até o momento da

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br

Continuação do Parecer: 4.237.393

análise. Para experimentos de tromboelastometria ou para estímulo de células endoteliais com monócitos, o sangue total será imediatamente utilizado na análise (estas duas últimas análises só serão realizadas nas amostras prospectivas). As alíquotas não utilizadas serão mantidas no biorrepositório do estudo por dez anos, conforme regimento específico anexo.

Metodologia para análise laboratorial

Avaliação da hemostasia

Serão utilizados testes coagulométricos (em que se avalia a formação de fibrina), cromogênicos (que utilizam substratos de elementos enzimáticos da hemostasia) ou imunológicos para avaliação de pontos específicos da hemostasia. A lista de ensaios é descrita nas tabelas 1 e 2. A depender dos resultados, ensaios complementares avaliando mais detalhadamente o mesmo processo podem ser necessários.

Tabela 1. Parâmetros da hemostasia/imunotrombose

Biomarcador Método Amostra Descrição / o que avalia?

Tempo de protrombina Coagulométrico Citrato Teste de triagem da hemostasia

TTPa Coagulométrico Citrato Teste de triagem da hemostasia

Fibrinogênio Coagulométrico Citrato Via final comum

Fator X Coagulométrico Citrato Via final comum

TAT* Elisa Citrato Ativação global da hemostasia

Dímeros D Imunoturbidimetria Citrato Ativação global da hemostasia

PAI-1** Elisa Citrato Inibidor da fibrinólise

Quantificação de MP% Citometria^ Citrato Quantif. MPs circulantes

APC*** dependente de fator tecidual em MP Cromogênico Citrato Papel do FT na ativ. hemostasia

Tromboelastometria Viscoelástico Citrato Teste global da hemostasia

Agregação plaquetária Transmissão de luz Citrato Agregação plaquetária

*Complexos trombina-antitrombina; ** PAI-1: inibidor de ativação do plasminogênio 1; % MP: micropartículas; ***APC: atividade prócoagulante; ^ citometria realizada no equipamento CytoFlex, Beckman Coulter

Os ensaios para avaliação da via intrínseca são mostradas na tabela 2.

Tabela 2. Marcadores da ativação da via intrínseca

Biomarcador Método Amostra Descrição / o que avalia?

Fator XII Coagulométrico Citrato Via intrínseca

Fator XI Coagulométrico Citrato Via intrínseca

Atividade de FXIIa Coagulométrico Citrato Ativação da via intrínseca

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br

Continuação do Parecer: 4.237.393

Dosagem de calicreína Elisa Citrato Ativação da via intrínseca

Dosagem de cininogênio clivado Elisa Citrato Ativação da via intrínseca

Complexo FXIIa:C1* Elisa Citrato Ativação da via intrínseca

Complexo PKa:C1* Elisa Citrato Ativação da via intrínseca

* C1: inibidor de C1 esterase

Dosagem de moduladores de integridade da BE e de marcadores de ativação endotelial

Será realizada por métodos imuno-enzimáticos (Elisa) utilizando kits comerciais. O painel de ensaios, bem como a técnica que será utilizada, são mostrados na tabela 3. Em alguns casos, o método de Elisa pode ser substituído ou complementado pela plataforma Luminex para ensaios imunológicos multiplex. A depender dos resultados, ensaios complementares avaliando mais detalhadamente o mesmo processo podem ser necessários.

Tabela 3. Biomarcadores relacionados a ativação endotelial (inclui integridade da BE)

Biomarcador Método Amostra* Descrição/objetivo

VEGF-A Elisa EDTA Mediador da integridade da BE**

Angiopietina 1 Elisa EDTA Mediador da integridade da BE**

Angiopietina 2 Elisa EDTA Mediador da integridade da BE**

Tie2 solúvel Elisa EDTA Mediador da integridade da BE**

VE-caderina solúvel Elisa EDTA Mediador da integridade da BE**10

Trombomodulina solúvel Elisa EDTA Marcador de ativação endotelial

Fator de Von Willebrand Elisa Citrato Marcador de ativação endotelial

C5b-9 solúvel Elisa EDTA Ativação de via terminal complemento * Plasma; ** BE: barreira endotelial

Dados clínicos e laboratoriais

Dados demográficos, dados do hemograma, e desfechos clínicos serão obtidos dos prontuários dos pacientes, e das fichas clínicas do ensaio clínico (coorte 1). Em relação aos controles, os dados demográficos serão obtidos no momento da coleta.

Uso das amostras para estímulo em ensaios em cultura de células

Células endoteliais pulmonares microvasculares (HULEC-5a) obtidas da ATCC (CRL-3244) foram obtidas pelo Prof. Dr. Fábio Costa. Estas células serão usadas em (i) ensaios para avaliação da integridade da barreira endotelial (BE), em estudos funcionais e morfológicos; e (ii) ensaios de expressão gênica e/ou proteínas. Utilizaremos como estímulo, amostras de plasma, microvesículas extraídas ou monócitos separados das amostras de sangue total coletadas em citrato de sódio. De forma breve, as células serão cultivadas em frascos de 75 cm² em meio EBM-2 suplementado com

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br

Continuação do Parecer: 4.237.393

o kit de fatores de crescimento EGM-2 e incubadas a 37 ° C com 5% de CO₂ até 80% de confluência. Todos os experimentos utilizarão células entre a 3^a e 6^a passagem.

- Ensaios funcionais de integridade da BE: será realizado no equipamento ECIS (Electric Cell Impedance Sensing) e monocamadas estimuladas com plasma de pacientes com COVID-19 diluído em meio de cultura (1:5 v/v), por 6 horas.
- Ensaios morfológicos por imunofluorescência: utilizará marcação com anticorpos anti VEcadherina, que marca as junções intercelulares. As células serão cultivadas até confluência por no mínimo 48 horas em lamínulas de vidro de microscopia pré-revestidas com fibronectina, inibidas durante 2 horas como meio starving e então estimuladas com o plasma diluído (1:5 v/v) durante 30 minutos. Em seguida, as células serão fixadas e o protocolo de coloração será seguido.

Análises estatísticas

Os dados quantitativos serão expressos como mediana, percentis, valores mínimos e máximos, além de média e desvio padrão. Para comparação entre grupos e experimentos, as variáveis serão tratadas por métodos paramétricos ou não-paramétricos, conforme a distribuição. As comparações entre variáveis independentes serão feitas pelos testes t ou Mann-Whitney (comparações de até 211 grupos) ou teste de Anova ou Kruskal Wallis (3 ou mais grupos). Variáveis dependentes serão comparadas pelos testes de t pareado ou Wilcoxon (2 grupos) ou Anova pareado ou Friedman (3 ou mais grupos). Correções para o número de comparações serão aplicadas. Correlações serão avaliadas pelo teste de Pearson ou Spearman, conforme a distribuição das variáveis. Significância estatística será considerada quando $P < 0,05$. Dados qualitativos serão analisados pelo teste de Fisher ou qui-quadrado. As análises serão realizadas com o software Graphpad Prism v 7.0.

CRONOGRAMA DE ATIVIDADES

8 trimestres 1 2 3 4 5 6 7 8

1	x	x	x	x	x	x	x	x
2		x	x	x	x			
3		x	x	x				
4		x	x	x	x	x	x	
5			x	x	x	x		
6			x	x	x	x		

1. Revisão bibliográfica
2. Aquisição de reagentes e células

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 4.237.393

3. Recrutamento de participantes (controles e pacientes)
4. Experimentos com métodos imunológicos, hemostasia e ensaios celulares
5. Consolidação e análise dos resultados
6. Produção de manuscritos científicos

Equipe da pesquisa:

Prof. Dr. Erich Vinícius de Paula-docente-Departamento de Clínica Médica-Faculdade de Ciências Médicas-
Unicamp

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentadas a Folha de Rosto, assinada pela Coordenadora-Centro de Hematologia e Hemoterapia Unicamp, o documento com Informações Básicas do projeto, o projeto detalhado, o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, o Regulamento do Biorrepositório, assinado pelo respectivo responsável (proponente do estudo).

Recomendações:

A Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (Conep), do Conselho Nacional de Saúde (CNS) orienta a adoção das diretrizes do Ministério da Saúde (MS) decorrentes da pandemia causada pelo Coronavírus SARS-CoV-2 (Covid-19), com o objetivo de minimizar os potenciais riscos à saúde e a integridade dos participantes de pesquisas e pesquisadores.

De acordo com carta circular da CONEP intitulada "ORIENTAÇÕES PARA CONDUÇÃO DE PESQUISAS E ATIVIDADE DOS CEP DURANTE A PANDEMIA PROVOCADA PELO CORONAVÍRUS SARS-COV-2 (COVID-19)" publicada em 09/05/2020, referente ao item II. "Orientações para Pesquisadores":

- Aconselha-se a adoção de medidas para a prevenção e gerenciamento de todas as atividades de pesquisa, garantindo-se as ações primordiais à saúde, minimizando prejuízos e potenciais riscos, além de prover cuidado e preservar a integridade e assistência dos participantes e da equipe de pesquisa.
- Em observância às dificuldades operacionais decorrentes de todas as medidas impostas pela pandemia do SARS-CoV-2 (COVID- 19), é necessário zelar pelo melhor interesse do participante da pesquisa, mantendo-o informado sobre as modificações do protocolo de pesquisa que possam afetá-lo, principalmente se houver ajuste na condução do estudo, cronograma ou plano de trabalho.
- Caso sejam necessários a suspensão, interrupção ou o cancelamento da pesquisa, em decorrência dos riscos imprevisíveis aos participantes da pesquisa, por causas diretas ou indiretas, caberá aos investigadores a submissão de notificação para apreciação do Sistema CEP/Conep.

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 4.237.393

- Nos casos de ensaios clínicos, é permitida, excepcionalmente, a tramitação de emendas concomitantes à implementação de modificações/alterações no protocolo de pesquisa, visando à segurança do participante da pesquisa, assim como dos demais envolvidos no contexto da pesquisa, evitando-se, ainda, quando aplicável, a interrupção no tratamento dos participantes da pesquisa. Eventualmente, na necessidade de modificar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), o pesquisador deverá proceder com o novo consentimento, o mais breve possível.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Pendência 1: atendida

Apresentar comprovante de vínculo funcional (foto da identidade funcional) do proponente do estudo e de qualquer outro membro da equipe da pesquisa.

Resposta:

Incluído tanto como documento do projeto, quanto no cadastro da Plataforma Brasil, onde não constava. Utilizei minha identidade funcional da FCM e meu cadastro no sistema da FCM (vida funcional). Destaco que o Hemocentro é o local onde exerço as atividades docentes descritas nestes dois documentos.

Pendência 2: atendida

A Autorização para uso do Biorrepositório está assinada pelo próprio proponente do estudo, o que não pode ocorrer. Solicita-se que esta autorização seja assinada por outro pesquisador ou pela Coordenadora do Hemocentro ou esclarecer a necessidade da apresentação desse documento.

Resposta:

Feito como sugerido, e incluído como novo documento, em substituição ao anterior.

Pendência 3: atendida

Anexar orçamento do projeto.

Resposta:

Feito como sugerido.

Pendência 4: atendida

Colocar no projeto detalhado os mesmos Riscos e Benefícios que constam no documento com Informações Básicas do Projeto.

Resposta:

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br

Continuação do Parecer: 4.237.393

Feito como sugerido (destaque em vermelho na página 7 do projeto detalhado revisado).

Pendência 5: atendida

No documento com Informações Básicas do projeto consta a frase: "Quanto à privacidade, dados dos participantes serão codificados, de modo que não a identidade não será revelada em nenhum momento do estudo." Substituí-la por: "Quanto à privacidade, dados dos participantes serão codificados, de modo que a identidade não será revelada em nenhum momento do estudo."

Resposta:

Feito como sugerido.

Pendência 6: atendida

Escrever no documento com Informações Básicas do projeto que os critérios de inclusão e de exclusão são os mesmos para os participantes acometidos de Covid-19 e para os participantes saudáveis (grupo controle), conforme consta no projeto detalhado.

Resposta:

Feito como sugerido. Especificamente, incluí a frase "Os critérios de inclusão e exclusão da coorte 2 serão idênticos aos utilizados para recrutamento da coorte 1 (estudo clínico já aprovado), a saber:" no início de cada caixa (onde constam os critérios de inclusão e exclusão).

Pendência 7: atendida

O proponente afirma que "haverá uso de fontes secundárias de dados (prontuários, dados demográficos, etc.), detalhando que os dados demográficos e clínicos para correlação com os resultados laboratoriais serão obtidos dos prontuários médicos digitais dos pacientes, e transferidos para planilhas protegidas por senhas, em que os nomes serão substituídos por códigos." Considerando que as informações sobre o paciente contidas no prontuário só podem ser transmitidas a outro profissional com permissão do paciente, mediante seu consentimento livre e esclarecido e com garantias de resguardar o sigilo, privacidade e confidencialidade deste paciente, no TCLE solicitar autorização do participante da pesquisa (acometidos de Covid-19 e saudáveis) para acessar os dados do prontuário. Se prontuários usados na assistência médica tem dados que serão usados em pesquisa, há necessidade de, no TCLE, constar que serão mantidas a privacidade e sigilo desses dados e deve ser obtida autorização dos participantes (pacientes e saudáveis). Assim, no TCLE a ser aplicado aos

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br

Continuação do Parecer: 4.237.393

participantes portadores de Covid-19 colocar a frase:

() Concordo em participar do presente estudo e AUTORIZO o uso, neste estudo, dos dados existentes em meu prontuário médico.

Resposta:

Feito como indicado. A frase entrou no TCLE de pacientes, como indicado (destaque em vermelho na página 3 do TCLE). No caso de voluntários sadios (controles), modificamos discretamente a frase para se adequar ao fato de que os mesmos não possuem em princípio prontuários médicos, mas terão seus dados demográficos registrados pelos pesquisadores no momento do recrutamento. Como estes dados também irão para as mesmas planilhas, entendi ser adequado colocar frase semelhante para eles, na qual o termo "prontuário médico" foi substituído por "... dados coletados para esta pesquisa." (também em vermelho na página 3 do TCLE).

Pendência 8: atendida

NO TCLE-grupo controle, consta a frase: "A pesquisa será realizada com o sangue de pessoas (controles) saudáveis que comparecem ao ambulatório de hematologia da Unicamp como acompanhante de pacientes em tratamento, ou ainda de membros do staff do Hemocentro". Informar como será feito o convite/abordagem a estas pessoas: mediante cartazes, presencialmente (verbalmente), etc. No caso de ser usado cartaz, informar o local em que os cartazes serão afixados e enviar ao CEP o texto que será impresso no mesmo. Cada cartaz deve conter o título do estudo e a informação: Projeto aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa-Unicamp, CAAE:No caso da abordagem ser pessoal (verbalmente) informar os nomes das pessoas que farão o convite, os respectivos comprovantes dos vínculos funcionais e colocar os nomes dessas pessoas na equipe da pesquisa, nos documentos pertinentes. Esta providência também deve ser tomada caso existam outras pessoas que irão participar, como pesquisadores, do estudo.

Resposta:

O recrutamento de controles saudáveis será feito verbalmente pelo pesquisador responsável. Não utilizaremos cartazes. A descrição foi incluída no projeto detalhado, página 7 (destaque em vermelho) e na Plataforma Brasil. Também incluí na versão revisada mais três alunos de pósgraduação de meu grupo que auxiliarão nesta abordagem (o recrutamento formal será feito por mim). Conforme orientado, os documentos comprovantes dos mesmos foram incorporados ao

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br

Continuação do Parecer: 4.237.393

projeto, e seus nomes listados na equipe tanto no projeto detalhado quanto na Plataforma Brasil. Como os mesmos só auxiliarão na abordagem, e o recrutamento será formalizado por mim, não incluí seus nomes no TCLE, após orientar-me com a secretaria do CEP nesta data.

Considerações Finais a critério do CEP:

- O participante da pesquisa deve receber uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (quando aplicável).
- O participante da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (quando aplicável).
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado. Se o pesquisador considerar a descontinuação do estudo, esta deve ser justificada e somente ser realizada após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou. O pesquisador deve aguardar o parecer do CEP quanto à descontinuação, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao participante ou quando constatar a superioridade de uma estratégia diagnóstica ou terapêutica oferecida a um dos grupos da pesquisa, isto é, somente em caso de necessidade de ação imediata com intuito de proteger os participantes.
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo. É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas e aguardando a aprovação do CEP para continuidade da pesquisa. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial.
- Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente seis meses após a data deste parecer de aprovação e ao término do estudo.

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br

Continuação do Parecer: 4.237.393

-Lembramos que segundo a Resolução 466/2012 , item XI.2 letra e, “cabe ao pesquisador apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento”.

-O pesquisador deve manter os dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda e responsabilidade, por um período de 5 anos após o término da pesquisa.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1609104.pdf	24/08/2020 14:45:14		Aceito
Recurso Anexado pelo Pesquisador	Carta_resposta_CEP_COVID_hemostasia.pdf	24/08/2020 14:44:54	Erich Vinicius de Paula	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_COVID19_CEP_Unicamp_rev.pdf	24/08/2020 14:43:52	Erich Vinicius de Paula	Aceito
Outros	Anuencia_biorrep_controles.pdf	24/08/2020 14:34:41	Erich Vinicius de Paula	Aceito
Orçamento	Orcamento.pdf	23/08/2020 15:49:56	Erich Vinicius de Paula	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_controles_rev.pdf	23/08/2020 15:43:45	Erich Vinicius de Paula	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_pacientes_rev.pdf	23/08/2020 15:43:30	Erich Vinicius de Paula	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	10/08/2020 14:28:20	Erich Vinicius de Paula	Aceito
Outros	Painel_de_ensaios.pdf	10/08/2020 14:28:06	Erich Vinicius de Paula	Aceito
Outros	Anuencia_biorrep_pacientes.pdf	10/08/2020 14:27:44	Erich Vinicius de Paula	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Regulamento_biorrepositorio.pdf	10/08/2020 14:25:23	Erich Vinicius de Paula	Aceito

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br



UNICAMP - CAMPUS
CAMPINAS



Continuação do Parecer: 4.237.393

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CAMPINAS, 26 de Agosto de 2020

Assinado por:
Renata Maria dos Santos Celeghini
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br