



UNICAMP - CAMPUS
CAMPINAS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: miRNAs E POLIMORFISMOS NO RECEPTOR DA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA 2 COMO POSSÍVEIS BIOMARCADORES DE DOENÇA INDUZIDA PELO SARS-CoV-2

Pesquisador: Patricia Moriel

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 36041420.0.0000.5404

Instituição Proponente: Hospital Estadual Sumaré Dr. Leandro Francheschini

Patrocinador Principal: Capes Coordenação Aperf Pessoal Nível Superior

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.214.696

Apresentação do Projeto:

O parecer inicial é elaborado com base na transcrição editada do conteúdo do registro do protocolo na Plataforma Brasil e dos arquivos anexados à Plataforma Brasil. Os pareceres de retorno, emendas e notificações são elaborados a partir dos dados e arquivos da última versão apresentada.

Introdução: 1.1 COVID-19 O coronavírus SARS-CoV-2 (Síndrome Respiratória Aguda Grave Coronavírus 2), agente causador da COVID-19 (doença coronavírus 2019), se tornou a mais recente emergência mundial, responsável por 619.150 mortes em todo o mundo até o dia 23 de julho de 2020 e um total de 15.012.731 casos confirmados (WHO, 2020c) Dados do Ministério da Saúde informam que o Brasil, na mesma data, soma 1.145.906 casos confirmados e 52.645 mortes por COVID-19 (BRASIL, 2020) O primeiro caso relatado da doença ocorreu em dezembro de 2019, em Wuhan, na China. Acredita-se que a contaminação tenha ocorrido por transmissão zoonótica em um mercado de frutos do mar, que também comercializavam animais selvagens vivos (LU; STRATTON; TANG, 2020). O SARS-CoV-2 é um vírus de RNA, pertencente ao gênero betacoronavírus, da subfamília Orthocoronavirinae, família Coronaviridae e ordem Nidovirales. Apresenta 79% de similaridade com o SARS-CoV e 98% de similaridade com o coronavírus de morcego, o RaTG13. Dentre as coronaviroses conhecidas, quatro (229E, NL63, OC43 e HKU1) causam infecções no trato respiratório superior e são responsáveis por sintomatologias leves, e

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: 4.214.696

três podem se replicar no trato respiratório inferior e causar pneumonias graves, sendo elas a SARS-CoV, MERS-CoV e a mais recente SARS-CoV-2 (VIRUSES, 2020). Sabe-se até o momento que o vírus pode ser transmitido por inalação de gotículas respiratórias contendo o vírus ou por contato das mãos em superfícies que contêm o vírus e posterior contaminação ao levar as mãos aos olhos, boca e nariz. O tempo de incubação pode variar de 4-5 dias até aproximadamente 11-12 dias e os sintomas incluem febre e tosse seca na maioria dos pacientes, podendo ser acompanhada de dificuldade respiratória, mialgia e/ou artralgia, dor de cabeça, tontura, perda do paladar, náusea e diarreia (GUAN; ZHONG, 2020). Os casos severos de COVID-19 podem progredir para Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS), em média entre o oitavo e nono dia após os sintomas iniciais (TAY; POH; RÉNIA; MACARY et al., 2020). O vírus pode induzir uma cascata inflamatória intensa, muitas vezes chamada de “tempestade inflamatória”, o que explica a agressão pulmonar grave, visualizada em imagens de tomografia computadorizada e que induz a formação de microtrombos, resultando em lesões renais e cardíacas, entre outras (COPERCHINI; CHIOVATO; CROCE; MAGRI et al., 2020). O SARS-CoV-2 infecta as células que expressam em suas superfícies os receptores da enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2) e da protease transmembrana serina 2 (TMPRSS2) (CHEN; GUO; PAN; ZHAO, 2020; TAY; POH; RÉNIA; MACARY et al., 2020; WALLS; PARK; TORTORICI; WALL et al., 2020). O receptor de ECA2 é uma glicoproteína transmembrana do tipo 1, composta por 805 aminoácidos e apresenta um único domínio catalítico extracelular que remove um único aminoácido da angiotensina II, formando a angiotensina-(1-7). Este receptor também converte a angiotensina I em angiotensina1-9, que depois se transforma na angiotensina-(1-7) (VICKERS; HALES; KAUSHIK; DICK et al., 2002). É altamente expresso nas células epiteliais do pulmão, onde o vírus é capaz de provocar um grande processo inflamatório (YUKI; FUJIOGI; KOUTSOGIANNAKI, 2020). O primeiro passo no processo de entrada do vírus na célula é a ligação da porção N-terminal da proteína viral, unidade S1, no receptor de ECA2 (HOFFMANN; KLEINE-WEBER; SCHROEDER; KRÜGER et al., 2020). Polimorfismos no gene ECA2 foram documentados primeiramente na população chinesa com três variantes (rs4240157, rs4646155 e rs4830542), associadas com hipertensão (YI; GU; WANG; AN et al., 2006), e um estudo brasileiro demonstrou haver associação entre os polimorfismos ECA2 G8790A (rs2285666) e ECA I/D e hipertensão (PINHEIRO; SANTOS; JARDIM; SILVA et al., 2019). Estes polimorfismos podem alterar o equilíbrio entre ECA1 e ECA2, diminuindo os efeitos biológicos de vasodilatação, proteção vascular e antifibróticos, decorrentes da ação da ECA2 e exacerbando os efeitos de edema, inflamação, lesão tecidual, trombose, fibrose, entre outros, induzidos pela supre-expressão da ECA1 e aumento da concentração de angiotensina II (GEMMATI; BRAMANTI; SERINO;

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: 4.214.696

SECCHIERO et al., 2020). Devido à sua grande importância nos mecanismos de infecção pelo SARS-CoV-2 e nos processos de proteção vascular, vasodilatação, entre outros, é possível que polimorfismos no gene ECA2 possam influenciar a susceptibilidade e evolução da COVID-19 (DEVAUX; ROLAIN; RAOULT, 2020). O segundo passo é a clivagem entre as unidades S1 e S2 pela TMPRSS2. Após esta clivagem, a unidade S2 sofre um rearranjo conformacional, que direciona e completa a fusão entre as membranas da célula hospedeira e viral, com consequente entrada do vírus na célula (HOFFMANN; KLEINE-WEBER; SCHROEDER; KRÜGER et al., 2020). Após entrada na célula, a replicação ativa e liberação do vírus fazem com que a célula hospedeira entre em piroptose (morte inflamatória da célula) com liberação de padrões moleculares associados ao dano celular (DAMP), incluindo ATP, ácidos nucleicos e oligômeros ASC (TAY; POH; RÉNIA; MACARY et al., 2020). Estes produtos são reconhecidos por células epiteliais vizinhas, células endoteliais e macrófagos alveolares, desencadeando a produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias (incluindo IL-6, IP-10, proteína inflamatória 1a de macrófagos (MIP1), MIP1 e MCP1) (TAY; POH; RÉNIA; MACARY et al., 2020). Há ainda um aumento da CXCL10 e CXCL8 (COPERCHINI; CHIOVATO; CROCE; MAGRI et al., 2020). Estas proteínas induzem a migração de monócitos, macrófagos e linfócitos T para o local de infecção, que por sua vez promovem uma inflamação adicional e produção de IFN, estabelecendo um loop de feedback pró-inflamatório (CHEN; ZHOU; DONG; QU et al., 2020; KONIG; POWELL; STAEDTKE; BAI et al., 2020; TAY; POH; RÉNIA; MACARY et al., 2020; XAVIER; SILVA; ALMEIDA; CONCEIÇÃO et al., 2020) Na reposte imune adequada, a inflamação inicial atrai linfócitos T vírus-específicos para o foco da infecção, onde podem eliminar as células contaminadas antes da liberação de novos vírus ao microambiente. Anticorpos neutralizantes nestes indivíduos podem bloquear a infecção viral e macrófagos alveolares reconhecem estas partículas virais ligadas aos anticorpos e, por opsonização, fagocitam e eliminam o vírus, assim como os restos celulares. Por fim, esses processos levam à eliminação mais rápida do vírus, o que diminui os danos causados às células pulmonares e resultam em recuperação do indivíduo (TAY; POH; RÉNIA; MACARY et al., 2020). A maioria dos pacientes sintomáticos desenvolve sintomas leves, no entanto, alguns pacientes podem progredir para doença grave, como pneumonia, síndrome respiratória aguda grave, disfunção múltipla de órgãos e morte (CDC, 2020b). Ainda, idosos e pessoas com comorbidades (ex., diabetes, hipertensão, doenças cardiovasculares) têm maior risco para desenvolver a forma grave da doença (CDC, 2020b). Por outro lado, os neonatos, lactentes e crianças são menos afetados pela COVID-19 (SINGHAL, 2020). Em todo o mundo, estima-se que aproximadamente 5% dos casos confirmados vão a óbito (WHO, 2020b) Muitos estudos estão sendo conduzidos para verificar a eficácia e a segurança de vários tratamentos para

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: 4.214.696

a COVID-19, como azitromicina, lopinavir/ritonavir, remdesivir, ribavirina, interferons, glicocorticoides, plasma convalescente, entre outros. Entretanto, no momento ainda não há nenhum tratamento efetivamente comprovado contra a doença e possíveis vacinas estão sendo desenvolvidas (JEAN; LEE; HSUEH, 2020). Os pacientes com quadros leves são tratados em domicílio e medicados com sintomáticos (ex., antitérmicos). Casos moderados a graves requerem hospitalização para oxigenioterapia, como cateter nasal, ventilação não invasiva e até ventilação mecânica. O tempo médio de hospitalização de um paciente com a COVID-19 é de 10 dias e 25-30% dos pacientes necessitam de admissão em unidade de terapia intensiva (SINGHAL, 2020) com taxa de mortalidade de 42% neste grupo (ARMSTRONG; KANE; COOK, 2020). Desta forma, a medida mais efetiva ainda é a prevenção da COVID-19. Então, a população deve seguir rigorosamente as recomendações das autoridades para diminuir a transmissão do SARS-CoV-2, incluindo distanciamento social, uso de máscaras e higienização das mãos (WHO, 2020a) No estágio inicial da doença, os achados laboratoriais indicam leucocitose ou leucopenia, com linfopenia acentuada, incluindo diminuição importante dos linfócitos T CD4 e CD8. Na medida que a doença avança, pode-se observar redução na concentração de hemoglobina e da albumina sérica, bem como aumento da proteína C reativa, VHS (velocidade de hemossedimentação), TP (tempo de protrombina), ALT (alanina aminotransferase), AST (aspartato aminotransferase), LD (lactato desidrogenase), procalcitonina, dímero-D, creatina quinase, ureia e creatinina (XAVIER; SILVA; ALMEIDA; CONCEIÇÃO et al., 2020), porém, estes achados laboratoriais apresentam baixa ou nenhuma sensibilidade diagnóstica para a COVID19. As tomografias computadorizadas (CT) de tórax de pacientes diagnosticados com a COVID-19 mostram opacidades pulmonares em vidro fosco e consolidações, com distribuição predominantemente periférica, por vezes associadas a reticulado fino, espessamento vascular e o sinal do halo invertido e são consideradas confirmatórias para as suspeitas, baseadas nos sinais e sintomas clínicos dos pacientes (CHATE; FONSECA; PASSOS; TELES et al., 2020). Sabe-se que alguns fatores estão associados com o agravamento da doença, como a hipertensão arterial sistêmica, diabetes mellitus tipo 2, obesidade, idade, entre outros (CDC, 2020a). Porém, pacientes que apresentam as mesmas condições clínicas podem evoluir de forma diferenciada à COVID-19. Uma possível explicação para esta variação pode estar relacionada com a variação genética dos indivíduos, como a diferente expressão de miRNAs.

1.2 MicroRNAs Os MiRNAs são moléculas pequenas de cadeia simples de RNA formadas por aproximadamente 22 nucleotídeos não codificantes, que participam da regulação pós-transcricional da expressão gênica (LAGOS-QUINTANA; RAUHUT; LENDECKEL; TUSCHL, 2001; LAU;

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: 4.214.696

LIM; WEINSTEIN; BARTEL, 2001; LEE; AMBROS, 2001). A maior parte dos miRNAs se liga complementarmente à região 3' não traduzida (3'-UTR) do RNA mensageiro (mRNA) alvo (BAEK; VILLÉN; SHIN; CAMARGO et al., 2008; MISHRA; HUMENIUK; LONGO-SORBELLO; BANERJEE et al., 2007; SELBACH; SCHWANHÄUSSER; THIERFELDER; FANG et al., 2008), e dependendo da complementariedade dessa ligação, eles podem ocasionar a degradação do mRNA (quando a complementariedade é perfeita) ou inibir a transcrição do mRNA (quando a complementariedade é imperfeita), e conseqüentemente regular a síntese proteica (BARTEL, 2004). No entanto, existem vias não canônicas em que os miRNAs podem se ligar a outras regiões, incluindo a região 5'-UTR, regiões codificantes e (BROUGHTON; LOVCI; HUANG; YEO et al., 2016) Além disso, já se tem conhecimento que miRNAs podem inclusive ativar a expressão de alguns genes (VASUDEVAN, 2012). Desde a sua descoberta em *C. elegans* (LEE; FEINBAUM; AMBROS, 1993; WIGHTMAN; HA; RUVKUN, 1993), os miRNAs vêm sendo estudados frequentemente, com um aumento exponencial de estudos nos últimos anos, destacando o papel dos miRNAs em regular diversas funções celulares. Estimam-se que ao menos 60% dos mRNAs em humanos podem ser regulados por miRNAs, sugerindo que cada miRNA é capaz de regular centenas de mRNAs diferentes (FRIEDMAN; FARH; BURGE; BARTEL, 2009). Em relação à biogênese dos miRNAs, os genes que codificam miRNAs são transcritos pela RNA polimerase II, gerando na maior parte das vezes um miRNA primário (pri-miRNA), composto aproximadamente por 500 a 3000 bases em uma estrutura em forma de grampo. Essa estrutura é a chave para que pri-miRNA gerado seja reconhecido e processado pela ribonuclease (RNase) Drosha, resultando no pré-miRNA, composto por aproximadamente 60 a 70 nucleotídeos. O pré-miRNA é posteriormente translocado do núcleo para o citoplasma por poros nucleares com o auxílio da Exportina-5. No citoplasma, o pré-miRNA é clivado pela Dicer, uma RNase III/endonuclease, e são formadas duas moléculas de RNA (RNA dupla fita). A fita guia do RNA direciona a ligação do complexo proteico Argonauta e auxilia na ligação do complexo de indução do silenciamento do RNA (RISC) ao miRNA (BERNSTEIN; CAUDY; HAMMOND; HANNON, 2001). O complexo RISC, quando ativado, identifica seu sítio de ligação na região 3'-UTR do mRNA alvo (CULLEN, 2004; LAGOS-QUINTANA; RAUHUT; LENDECKEL; TUSCHL, 2001). Também existem vias não canônicas de biogênese de miRNAs, as quais incluem diferentes combinações de outras proteínas com proteínas envolvidas na via canônica, como a Drosha e a Dicer (O'BRIEN; HAYDER; ZAYED; PENG, 2018). Os MiRNAs podem ser encontrados em diversos fluidos biológicos, como urina, plasma, fluido lacrimal, saliva, leite materno, entre outros (WEBER; BAXTER; ZHANG; HUANG et al., 2010), e apesar destes fluidos conterem uma concentração relativamente alta de enzimas capazes de degradar RNA, os miRNAs são bastante estáveis pelo

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: 4.214.696

fato de se encontrarem principalmente em vesículas, como os exossomos (CORTEZ; CALIN, 2009; KOSAKA; IGUCHI; OCHIYA, 2010) ou ligados a complexos proteicos como o complexo argonauta e lipoproteínas de alta densidade (ARROYO; CHEVILLET; KROH; RUF et al., 2011; VICKERS; PALMISANO; SHOUCRI; SHAMBUREK et al., 2011). Muitos miRNAs são encontrados em fluidos específicos, enquanto outros podem ser encontrados em vários fluidos diferentes. No que diz respeito a presença de miRNAs específicos, o biofluido que apresenta um espectro mais diferente dos demais é o plasma, provavelmente devido a captação de miRNAs de diferentes tipos celulares circulantes que entram em contato com o sangue. Os fluidos que possuem miRNAs mais distintos entre si são o plasma e a urina (WEBER; BAXTER; ZHANG; HUANG et al., 2010). Pelo fato dos miRNAs serem altamente estáveis nos diversos fluidos extracelulares e devido à sua expressão específica em diferentes tecidos e estados patológicos, os miRNAs circulantes têm sido alvos de investigações como possíveis biomarcadores de algumas doenças e de toxicidades induzidas por medicamentos (WANG; ZHANG; MARZOLF; TROISCH et al., 2009). Em relação a doenças virais, sabe-se, por exemplo, que pacientes contaminados com o vírus da influenza A/H1N1 que super-expressam o miR-150 evoluem para doença severa, quando comparados com pacientes que apresentam sintomas leves da doença (MORÁN; RAMÍREZ-MARTÍNEZ; JIMÉNEZ-ALVAREZ; CRUZ et al., 2015) . Um estudo realizado em Cingapura avaliou as alterações na expressão de miRNAs no sangue total de pacientes infectados com a cepa H1N1 do vírus Influenza A, em comparação com indivíduos saudáveis. Utilizando PCR quantitativo, foram detectados 14 miRNAs altamente desregulados, distinguindo claramente os indivíduos infectados (TAMBYAH; SEPRAMANIAM; MOHAMED ALI; CHAI et al., 2013). A expressão desregulada de alguns miRNAs pode, por exemplo, modular a transcrição e tradução de genes relacionados com os fatores imunomoduladores que podem inibir ou potencializar a resposta inflamatória, bastante acentuada em casos graves de COVID-19. Dessa forma, essas pequenas moléculas de RNA podem funcionar como biomarcadores favoráveis, oferecendo valor diagnóstico promissor e previsão de gravidade da resposta inflamatória para COVID-19 (TAMBYAH; SEPRAMANIAM; MOHAMED ALI; CHAI et al., 2013). Outras pesquisas também reportam possíveis miRNAs sobre a influenza (miR-323, miR-491, miR-485, miR-654, e miR-3145) estes relacionados a região codificadora do gene PB1 da influenza PB1, os quais degradam o RNA e inibem a translocação viral reduzindo assim o acúmulo de partículas virais (TAMBYAH; SEPRAMANIAM; MOHAMED ALI; CHAI et al., 2013). Porém, existem estudos que sugerem que alguns miRNAs podem ter efeito positivo na replicação viral, como por exemplo, o miR-122 para o vírus hepatotrófico, o qual aumenta a estabilidade viral. (KHONGNOMNAN; MAKKOCH; POOMIPAK; POOVORAWAN et al., 2015; MACHLIN; SARNOW; SAGAN, 2011). Na

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: 4.214.696

literatura recente, três trabalhos de bioinformática descrevem possíveis miRNAs marcadores de doença e gravidade relacionados a COVID-19 (ARISAN; DART; GRANT; ARISAN et al., 2020; FULZELE; SAHAY; YUSUFU; LEE et al., 2020; SAÇAR DEMIRCI; ADAN, 2020. Como exemplo, os trabalhos de Fulzele S, et al. 2020 e o trabalho de Arisan ED, et al. 2020, que por bioinformática propõem o estudo de 7 miRNAs que podem estar diretamente ligados à gravidade da COVID-19. O estudo de Arisan ED, et al. 2020 propõe o estudos dos miRs 8066, 5197, 3611, 3934-3p, 1307-3p, 3691-3p e 1468-5p; já o de Fulzele S, et al. 2020 propõe o estudos dos miRs miR-15b-5p, miR-15a-5p, miR-548c-5p, miR-548d-5p, miR-409-3p, miR -30b-5p e miR-505-3p (FULZELE; SAHAY; YUSUFU; LEE et al., 2020). Até o momento não existem trabalhos de validação de miRNAs como biomarcadores de gravidade ou de diagnóstico em amostras humanas.

Delineamento da pesquisa: Trata-se de estudo clínico observacional, analítico, de coorte, retrospectivo com amostragem não probabilística consecutiva, em duas etapas distintas. A PRIMEIRA ETAPA compreende estudo observacional, analítico, transversal, com amostragem não probabilística consecutiva, que envolverá 100 indivíduos adultos, pacientes do Hospital Estadual de Sumaré (HES), divididos em dois grupos; grupo Caso (n=50, com teste referência (RT-PCR) positivo para SARS-CoV-2) e grupo controle (n=50 com teste referência (RT-PCR) negativo para SARS-CoV-2). As amostras do primeiro grupo serão obtidas junto à soroteca do HES, as do segundo grupo serão coletadas dos pacientes. A SEGUNDA ETAPA compreende estudo observacional analítico, de coorte, transversal, retrospectivo, de amostragem não probabilística consecutiva, que envolverá 200 indivíduos adultos, pacientes do Hospital Estadual de Sumaré (HES), positivos para SARS-CoV-2 no teste em RT-PCR. Amostras dos participantes da segunda etapa serão obtidas junto à soroteca do HES e dados demográficos, clínicos, sobre os medicamentos utilizados e resultados de exames complementares serão obtidos junto aos prontuários dos pacientes. Assim, o objetivo deste projeto é avaliar miRNAs e polimorfismos no gene da ECA2 como possíveis biomarcadores da COVID-19. O objetivo principal foi dividido em dois objetivos específicos principais. 1) Identificar através de sequenciamento os principais miRNAs plasmáticos que possam ser biomarcadores de diagnóstico da COVID-19; Este é um estudo observacional, analítico, transversal, cuja amostragem é não probabilística do tipo consecutiva. Para identificar miRNAs que possam ser biomarcadores de diagnóstico da COVID-19 (estudo transversal), serão formados dois grupos, grupo Caso (50 pacientes): amostra de sujeitos do Hospital Estadual de Sumaré (HES) que tiveram seu exame para SARS-CoV-2 positivo no teste referência [Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (RT-PCR)]; e grupo Controle (50

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: 4.214.696

pacientes): amostra de voluntários que tiveram seu exame negativo para SARS-CoV-2 no teste referência (RT-PCR). Os miRNAs serão extraídos de plasma, utilizando kit comercial, de 6 amostras do grupo Caso e 6 amostras do grupo Controle para realização da montagem da biblioteca, sequenciamento e análise diferencial dos miRNAs expressos. Posteriormente, os miRNAs selecionados serão validados nas demais amostras. 2) Identificar através de sequenciamento os principais miRNAs plasmáticos e polimorfismos no receptor ECA relacionados à gravidade induzidas pela COVID-19; Este é um estudo observacional, analítico, coorte retrospectivo, cuja amostragem é não probabilística do tipo consecutiva. Para identificar miRNAs e polimorfismos no gene da ECA2 que possam ser biomarcadores de gravidade da COVID-19 (coorte retrospectivo), as amostras do grupo Caso (200 pacientes) serão estratificadas pela gravidade da doença (doença leve-moderada e doença grave-crítica) através de parâmetros clínicos e tomografia computadorizada de pulmão. Os miRNAs serão extraídos de 6 amostras de plasma dos pacientes que apresentaram doença leve-moderada e de 6 amostras dos pacientes que apresentaram doença grave-crítica, para posterior montagem da biblioteca, sequenciamento, análise diferencial e validação. O sequenciamento será dividido em dois tempos de coleta: antes de dois dias para verificar algum miRNA preditor de gravidade e após 7 dias para verificar algum miRNA marcador de gravidade. A análise de polimorfismos no gene da ECA2 será feita por RT-PCR. Este estudo só terá início após a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UNICAMP.

Critérios de inclusão: OBJETIVO 1. Critérios de inclusão Sujeitos de ambos os sexos, entre 18 e 80 anos. Para o grupo Caso, a amostra dos sujeitos de pesquisa que tiveram seu exame para SARS-CoV-2 positivo no teste referência (RT-PCR). Para o grupo Controle, no momento da coleta não ter nenhum sintoma de COVID-19 e não ter estado em nenhum ambiente que sabidamente tivesse pessoas positivas para COVID-19 nos últimos 15 dias. OBJETIVO 2 Critérios de inclusão Sujeitos de ambos os sexos, entre 18 e 80 anos que tiveram seu exame para SARS-CoV-2 positivo no teste referência (RT-PCR).

Critérios de exclusão: OBJETIVO 1. Critérios de exclusão Dados incompletos nos prontuários. Para o grupo Controle as amostras de sujeitos que tiveram seu exame positivo no momento da coleta de sangue para SARS-CoV-2 no teste referência. OBJETIVO 2 Critérios de exclusão Dados incompletos nos prontuários.

MÉTODOS:

Dados comuns aos objetivos específicos:

Local do estudo: A inserção de pacientes no estudo será realizada no Hospital Estadual Sumaré (HES), localizado na cidade de Sumaré, no estado de São Paulo. O HES se trata de um hospital

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: 4.214.696

terciário e que presta serviços ao SUS. As amostras serão obtidas a partir da soroteca do Laboratório de Análises Clínicas do HES, a quantidade de amostra necessária para a realização dos experimentos é muito pequena, portanto, é possível conseguir a amostra da soroteca do laboratório.

A coleta de sangue dos pacientes controles, assim como a montagem das bibliotecas e o sequenciamento de miRNAs, assim como ensaios quantitativos de reação em cadeia da polimerase (qPCR), serão realizados no Laboratório de Farmácia Clínica (CliPharm) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF) da UNICAMP. Os ensaios de RT-PCR para detecção de SARS-CoV-2 e a coleta de amostras de swab serão realizados no Laboratório do Prof. Marcelo Lancellotti da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF) da UNICAMP (laboratório nível 2). A determinação de vitamina D plasmática será realizada no laboratório de toxicologia do Prof. Dr. José Luís da Costa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF) da UNICAMP. Aprovação em Comitê de Ética: O estudo será enviado ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da UNICAMP.

Grupos de estudo: No total serão 200 amostras do grupo Caso (sujeitos de pesquisa que tiveram seu exame para SARS-CoV-2 positivo no teste referência (RT-PCR)) e 50 amostras para o grupo Controle (sujeitos que tiveram seu exame negativo para SARS-CoV-2 no teste referência). A divisão destas amostras por objetivo está demonstrada na figura 3.

OBJETIVO ESPECÍFICO 1: Identificar miRNAs plasmáticos que possam ser biomarcadores de diagnóstico da covid-19

Desenho de estudo: Este é um estudo observacional, analítico, transversal, cuja amostragem é não probabilística do tipo consecutiva.

Grupos do estudo: Serão realizados dos grupos a saber: grupo Caso (amostra de 50 sujeitos de pesquisa que tiveram seu exame para SARS-CoV-2 positivo no teste referência (RT-PCR)) e grupo Controle (amostra de 50 sujeitos que tiveram seu exame negativo para SARS-CoV-2 no teste referência).

As amostras do grupo Casos serão obtidas da soroteca do Laboratório de Análises Clínicas do HES; para as amostras do grupo Controle será realizado convite a comunidade UNICAMP para sujeitos que gostariam de se voluntariar para pesquisa, será aplicado o TCLE para o grupo controle. Este convite será realizado para pessoas que já estejam trabalhando presencialmente na UNICAMP, com isso eles não irão se deslocar para ir até a UNICAMP para fazer a coleta, eles já estarão na UNICAMP e facilmente podem se deslocar de seu local de trabalho para o local da coleta (FCF/UNICAMP); recomendamos que o deslocamento seja feito a pé, ou em automóvel próprio. Em

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: 4.214.696

relação ao contato com o pesquisador para apresentação do projeto e assinatura do TCLE, este poderá ocorrer por telefone ou por meios eletrônicos. No momento da coleta o sujeito da pesquisa assina o TCLE. O contato deste com os pesquisadores só será no momento das coletas onde os pesquisadores estarão equipados com todos os EPIs recomendados para tal (luvas, máscara n95, faceshield e avental descartável), o sujeito deverá estar de máscara, só retirando a mesma no momento da coleta do swab. Portanto, entendemos que não há previsão de ressarcimento pelo deslocamento, pois ele será mínimo dentro da UNICAMP.

Critérios de inclusão e exclusão: Critérios de inclusão Sujeitos de ambos os sexos, entre 18 e 80 anos. Para o grupo Caso, a amostra dos sujeitos de pesquisa que tiveram seu exame para SARS-CoV-2 positivo no teste referência (RT-PCR). Para o grupo Controle, no momento da coleta não ter nenhum sintoma de COVID-19 e não ter estado em nenhum ambiente que sabidamente tivesse pessoas positivas para COVID-19 nos últimos 15 dias. Critérios de exclusão: Dados incompletos nos prontuários. Para o grupo Controle as amostras de sujeitos que tiveram seu exame positivo no momento da coleta de sangue para SARS-CoV-2 no teste referência.

Caracterização dos pacientes: Serão coletados dados demográficos, incluindo identificação do sujeito, idade, sexo e cor da pele. Serão coletados também dados referentes, estado civil, presença de comorbidades.

Coleta e separação de plasma para os experimentos laboratoriais: Serão necessários 300 uL de plasma dos sujeitos de pesquisa para determinação de miRNA. Para o grupo Caso, as amostras serão obtidas da soroteca do HES. Para o grupo Controle, será coletado um tubo de 4 mL de sangue contendo EDTA (etilenodiamino-tetracético) como anticoagulante. O sangue coletado será centrifugado a 2.500 rpm, 4°C por 10 minutos. O plasma será alíquotado e armazenado em freezer -80°C até a realização dos experimentos.

Gostaria de salientar que a manipulação de sangue total ou plasma de pacientes em infecção ativa de SARS-CoV-2, até o momento, parece ser segura aos manipuladores. A revisão sistemática realizada por Andersson M, et al. 2020, demonstrou que o RNA viral foi detectado em um número muito pequeno de amostras de sangue de pacientes com infecção ativa e nos que foram detectados existia uma baixa concentração de RNA viral, mas que este, pelos estudos não era infectante (ANDERSSON; CARCAMO; AUUCKLAND; BAILLIE, 2020).

Para o grupo Controle também será necessário realizar a coleta de swab nasal para determinação da presença de SARS-CoV-2 por RT-PCR, todo procedimento será realizado em laboratório de nível 2.

Reação em cadeia mediada pela polimerase precedida de transcrição reversa (RTPCR) para

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: 4.214.696

Detecção de SARS-CoV-2: O RNAv será extraído das amostras dos pacientes controles, utilizando-se kit comercial PureLink® Viral RNA/DNA Mini Kit (Invitrogen by Life Technologies, EUA), seguindo as orientações do fabricante. Depois de extraído o RNA será estocado a -70°C ou imediatamente submetido a RT-PCR.

A RT-PCR será conduzida com emprego do kit comercial Superscript® (Invitrogen by Life Technologies, EUA). As reações de RT-PCR serão realizadas em um volume final de 25 µL contendo 5,0 µL de RNA viral, 6,0 µL de H₂O livre de DNase e RNase, 12,5 µL de PCR Master Mix (2x), 0,5 µL de Forward Primer 50 µM, 0,5 µL de Reverse Primer 50 µM, e 0,5 µL de Super Script IIIITM One-Step RT-PCR System with Platinum Taq. Na amplificação a mistura será submetida a 48°C por 30 min, 95°C por 10 min, seguida por 45 ciclos de PCR cada um composto de 95o C por 15 s e 60o C por 1 min. Todas as etapas da reação serão realizadas na plataforma Applied Biosystems7500 Real-Time PCR. Cada conjunto de amostras submetido à amplificação será acompanhado de um controle negativo e um controle positivo.

miRNAs: Extração dos miRNAs Para realização do sequenciamento e análise diferencial dos miRNAs expressos serão extraídos os miRNAs de amostras de plasma de 6 pacientes positivos e de 6 pacientes negativos para SARS-CoV-2. As extrações dos miRNAs para sequenciamento e validação serão realizadas utilizando o miRNeasy Serum/Plasma Kit (Qiagen, Cat No. /ID: 217184). Serão adicionados 200 µL de cada amostra em 1 mL de QIAzol e incubados em temperatura ambiente por 5 minutos após homogeneização. Nesta etapa, serão adicionadas 3x10⁷ cópias do controle exógeno (spike-in) cel-miR-39 para normalização das amostras utilizadas para validação. Este miRNA será sintetizado pela Integrated DNA Technologies (IDT), atentando-se para fosforilação na região 5' para o spike-in ser compatível com TaqMan™ Advanced miRNA Assays que utilizamos para validação por qPCR. Após adição do controle, 200 µL de clorofórmio serão adicionados na amostra, a qual será homogeneizada e incubada por 3 minutos a temperatura ambiente. Logo após, será realizada a primeira centrifugação a 13.000 rcf por 15 minutos a 4C. A seguir, a fase aquosa será retirada e transferida para um novo tubo com 1,5 vezes seu volume em etanol 100%. Após homogeneização, será transferido todo volume da amostra para coluna de eluição e a mesma será centrifugada a 13.000 rcf por 15 segundos à temperatura ambiente. Após eluição de toda amostra, 700 µL de tampão RWT serão adicionados a coluna, a qual será centrifugada novamente a 13.000 rcf por 15 segundos à temperatura ambiente para retirada dos possíveis restos celulares presentes na amostra. Desta vez, serão adicionados 700 µL de tampão RPE (para retirada de possíveis fragmentos de DNA que ainda estiverem presentes na amostra) e centrifugado novamente nas mesmas condições, passo este repetido por mais uma vez e seguido

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: 4.214.696

da adição de 500 µL de etanol 80% à coluna. A mesma será centrifugada a 13.000g por 2 minutos à temperatura ambiente e logo após centrifugada novamente por 5 minutos a velocidade máxima a fim de secar a coluna por completo. Por fim, a coluna de eluição será transferida para novo tubo e onde serão adicionados 14 µL de água livre de RNase. Após incubação de 10 minutos à temperatura ambiente, a coluna será centrifugada por 1 minuto em velocidade máxima para eluição de todo miRNA contido no filtro. Após secagem do filtro, a coluna será então descartada e o tubo com os miRNAs extraídos será armazenado em freezer - 80 °C até a realização das próximas etapas.

Sequenciamento dos miRNAs: Após a extração dos miRNAs conforme descrito no item anterior, será realizada a montagem das bibliotecas para posterior sequenciamento. A Figura 3 mostra as etapas necessárias para análise dos miRNAs por sequenciamento.

A montagem das bibliotecas de miRNAs será realizada utilizando o QIAseq™ miRNA Library Kit (Qiagen, Cat No./ID: 331502). A montagem das bibliotecas se baseia na ligação de adaptadores nos grupos hidroxil 3' e fosfato 5' dos miRNAs maduros, permitindo a transcrição reversa através de primers específicos, contendo Identificadores Únicos Moleculares (UMI), que se ligam na região do adaptador 3'. Em seguida é realizada a limpeza do cDNA através da adsorção do DNA em esferas magnéticas na presença de álcool. Após a limpeza, é realizada a amplificação da biblioteca através do pareamento de primers forward, ligados a identificadores específicos para cada amostra, e de um primer reverso universal. Por fim é feita uma limpeza da biblioteca utilizando novamente esferas magnéticas. A Figura 4 mostra todas as etapas realizadas durante a montagem das bibliotecas.

Será realizado o controle de qualidade das bibliotecas antes do sequenciamento através da análise do tamanho das mesmas pelo 4200 TapeStation Instrument (Agilent Technologies) e da concentração (em ng/µL) pelo Qubit Fluorometric Quantitation (Thermo Fisher Scientific). A molaridade de cada biblioteca será calculada segundo a equação $(X \text{ ng}/\mu\text{L})(106)/(112450) = Y \text{ nM}$ e as bibliotecas serão então diluídas para 4 nM para realização do sequenciamento. O sequenciamento em si será realizado utilizando o MiSeq Reagent Kit v3, 150-cycle (Illumina, MS-102-3001). Será utilizado um kit para cada 8 amostras (total 4 kits), gerando uma quantidade de 2.000.000 a 5.000.000 leituras por amostras, número adequado para análise de sequenciamento de miRNAs. A análise do sequenciamento será realizada através do GeneGlobe Data Analysis Center (Qiagen). Será utilizado o método DESeq2 para normalização. DESeq2 se trata de um método para testar a expressão diferencial através de modelo linear generalizado com distribuição binomial negativa. O próprio GeneGlobe software nos fornece o Fold-change (FC = expressão

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: 4.214.696

grupo caso/ expressão grupo controle), o Fold-Regulation ($FR = FC$ quando $FC \geq 1$ e $FR = 1/FC$, quando $FC < 1$), e o p valor, calculado com base no teste de Wald.

Análise in silico dos potenciais alvos dos miRNAs identificados no seqüenciamento: Serão selecionados para análise in silico os miRNAs plasmáticos diferentemente expressos com $FR > 2,5$ ou $FR < -2,5$. Para a identificação de potenciais genes alvos preditos desses miRNAs, será utilizado o miRWalk 2.0 (<http://zmf.umm.uniheidelberg.de/mirwalk2>) 177. O miRWalk nos fornece os alvos preditos de acordo com 12 bases de dados diferentes, incluindo o TargetScan (www.targetscan.org) 178 . Serão selecionados para as análises posteriores apenas os genes alvos preditos pelo TargetScan e por no mínimo 5 bases de dados diferentes.

A fim de visualizar a integração conjunta dos diferentes miRNAs e seus genes alvos, serão construídas matrizes. Após ordenadas essas matrizes de acordo com os genes preditos por mais miRNAs diferentes, serão selecionados todos genes preditos por no mínimo 2 miRNAs diferentes para realizar uma análise de enriquecimento não supervisionada pelo software Ingenuity Pathway Analysis (IPA®, Qiagen bioinformatics) a fim de identificar as principais vias de sinalização canônicas nas quais os miRNAs diferentemente expressos estão envolvidos.

Validação dos miRNAs selecionados: Neste momento as amostras serão cegadas para o pesquisador responsável por executar e interpretar as análises. O cegamento será realizado pela coordenadora do projeto. Serão selecionados até 3 miRNAs de plasma diferentemente expressos que apresentaram um $FR > 5,0$ ou $FR < -5,0$ e valor de $p < 0,05$. Após a extração dos miRNAs conforme descrito, será realizada a síntese de cDNA utilizando o TaqMan™ Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit (Applied Biosystems, Cat No. /ID: A28007) e a qPCR utilizando o TaqMan™ Advanced miRNA Assays (Applied Biosystems, Cat No./ID:A25576). Além dos miRNAs selecionados para validação, também será realizada a qPCR do controle exógeno cel-miR-39 e do controle endógeno hsa-miR-16 para normalização. A análise dos miRNAs será feita através do QuantStudio™ Real Time PCR Software 6. As expressões relativas dos miRNAs serão obtidas através do método 2-CT 181, onde $CT = CT_{miR\ candidato} - CT_{cel-miR-39}$ e $CT = CT - médiaCTs$ dos pacientes controle.

Metodologia de análise de dados: As frequências dos dados clínicos/demográficos e caracterização da gravidade serão apresentadas com valores de frequência absoluta (n) e percentual (%) e medidas descritivas (média, desvio padrão). A análise estatística será feita utilizando o Statistics Program for Social Science for Windows (SPSS® 16.0, SPSS Inc, Chicago, IL, EUA). Para dados paramétricos será utilizado o teste t Student. Para dados não paramétricos será utilizado o teste de Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis. Para comparar as frequências das variáveis

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: 4.214.696

qualitativas será realizado o teste de qui-quadrado ou Exato de Fisher. Análises de regressão logística/linear poderão ser realizadas de acordo com a necessidade. O nível de significância adotado para o estudo será de 5%. Será realizado o cálculo da força da amostragem ao final do estudo.

OBJETIVO ESPECÍFICO 2: Identificar através de sequenciamento os principais miRNAs plasmáticos e polimorfismos no gene do receptor ECA relacionados à gravidade induzidas pela COVID-19.

Desenho de estudo: Este é um estudo observacional, analítico, coorte retrospectivo, cuja amostragem é não probabilística do tipo consecutiva.

Critérios de inclusão: Sujeitos de ambos os sexos, entre 18 e 80 anos que tiveram seu exame para SARSCoV-2 positivo no teste referência (RT-PCR).

Critérios de exclusão: Dados incompletos nos prontuários.

Caracterização dos pacientes: Serão coletados de 200 pacientes dados demográficos, incluindo identificação do sujeito, idade, sexo e cor da pele. Serão coletados também dados referentes a estado civil e presença de comorbidades nos prontuários. Serão avaliados nos prontuários os medicamentos utilizados durante a internação e possíveis eventos adversos a estes, como também, os resultados de exames laboratoriais e exames de imagem (tomografia) para posterior relação com a gravidade e com os miRNAs.

Obtenção do plasma para os experimentos laboratoriais: Serão necessários 300 uL de plasma dos sujeitos de pesquisa para determinação de miRNA. As amostras serão obtidas da soroteca do HES em dois momentos da internação do paciente, nos primeiros dois dias e após 7 dias de internação. O plasma será armazenado em freezer -80°C até a realização dos experimentos. Gostaria de salientar que a manipulação de sangue total ou plasma de pacientes em infecção ativa de SARS-CoV-2, até o momento, parece ser segura aos manipuladores. A revisão sistemática realizada por Andersson M, et al. 2020, demonstrou que o RNA viral foi detectado em um número muito pequeno de amostras de sangue de pacientes com infecção ativa e nos que foram detectados existia uma baixa concentração de RNA viral, mas que este, pelos estudos não era infectante (ANDERSSON; CARCAMO; AUCKLAND; BAILLIE, 2020).

Avaliação da gravidade: Para as análises de relação da gravidade da infecção causada pela COVID-19 com os polimorfismos e miRNAs os pacientes serão separados em grupos dependo da gravidade apresentada durante a internação. A gravidade será classificada segundo quadro 1.

Metodologia radiologia: De forma rotineira, todo paciente com diagnóstico confirmado ou suspeito de Covid-19 realiza uma tomografia de tórax de alta resolução no momento da internação. Este

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: 4.214.696

exame de rotina será usado para avaliar a extensão da lesão pulmonar e correlacioná-la com os achados de miRNAs. A extensão da lesão pulmonar será avaliada seguindo a mesma metodologia utilizada por Francone M, et al. 2020, (FRANCONE; IAFRATE; MASCI; COCO et al., 2020) na qual: 1. Os aspectos radiológicos de vidro-fosco, pavimentação em mosaico e consolidação seguem o glossário da Fleischner Society (HANSELL; BANKIER; MACMAHON; MCLOUD et al., 2008). 2. Uma pontuação semi-quantitativa da gravidade da TC proposta será calculada para cada um dos 5 lobos, considerando a extensão do envolvimento anatômico: 0, nenhum envolvimento; 1, envolvimento 75% de envolvimento. A pontuação global da TC resultante será a soma de cada pontuação lobar individual, variando de 0 a 25 como resultado final (PAN; YE; SUN; GUI et al., 2020). Quando presentes, também serão descritas características relacionadas a fibrose, linhas subpleurais, “sinal de halo” invertido, derrame pleural e linfadenopatia. 3. A distribuição da lesão também será descrita entre: predominantemente periférica, central ou ambas; além de anterior e posterior (ZHOU; WANG; ZHU; XIA, 2020).

Determinação de vitamina D plasmática: Serão utilizados 200 uL de plasma para detecção de vitamina D (25-OH-Vit D2 e 25-OH-Vit D3). A determinação será realizada por HPLC-MS-MS seguindo a metodologia descrita por Garg U, et al. 2012 (GARG; MUNAR; FRAZEE; SCOTT, 2012).

miRNAs, Extração dos miRNAs: Para realização do sequenciamento e análise diferencial dos miRNAs expressos serão extraídos os miRNAs de amostras de plasma de 6 pacientes que apresentaram gravidade de leve a moderada e de 6 pacientes que apresentaram gravidade grave ou crítica para COVID-19. O sequenciamento será dividido nos dois tempos de coleta, o primeiro tempo (antes dos dois dias) para verificar algum miRNA preditor de gravidade e após 7 dias algum miRNA marcador de gravidade. As extrações dos miRNAs para sequenciamento e validação, assim como as análises de sequenciamento, validação e análise in silico dos potenciais alvos dos miRNAs identificados no sequenciamento serão realizadas conforme já descrito anteriormente no projeto no item 3.2.

Análise das Variantes Genéticas (polimorfismos na ECA): A pesquisa de variantes genéticas será realizada pelo sistema de genotipagem TaqMan® Genotyping Assays [Life Technologies (Foster City, CANA)]. A genotipagem dos pacientes para as variantes genéticas na ACE1DD-genotype (rs4646994, rs1799752, rs4340, rs13447447) e ACE28790 A-allele (rs2285666), serão realizados através da técnica de PCR em tempo real (qPCR) utilizando os ensaios TaqMan® Genotyping (Thermo Fisher Scientific Inc., Foster City, Califórnia, EUA). A reação de PCR será realizada em um aparelho de sistema StepOnePlus® (AppliedBiosystems®, Foster City, CA, EUA) utilizando um volume de 5 L por poço, consistindo em 2,5 L de TaqMan® GTXpresSTM Master Mix (2), 25 L

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: 4.214.696

de TaqMan genotyping assay mix (20) e 1,0 L de DNA (10 ng) diluídos em água livre de nuclease (1,25 L). O ensaio de qPCR terá fase inicial de 20 segundos a 95°C, seguida de 40 ciclos de 3 segundos a 95°C e 20 segundos a 60°C. A precisão da genotipagem será avaliada por análise em duplicata de 20% das amostras selecionadas aleatoriamente e, além disso, serão incluídas amostras de controle em cada experimento.

Análise estatística: As frequências dos dados clínicos/demográficos e caracterização da gravidade serão apresentadas com valores de frequência absoluta (n) e percentual (%) e medidas descritivas (média, desvio padrão). A análise estatística será feita utilizando o Statistics Program for Social Science for Windows (SPSS® 16.0, SPSS Inc, Chicago, IL, EUA). Para dados paramétricos será utilizado o teste t Student. Para dados não paramétricos será utilizado o teste de Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis. Para comparar as frequências das variáveis qualitativas será realizado o teste de qui-quadrado ou Exato de Fisher. Análises de regressão logística/linear poderão ser realizadas de acordo com a necessidade. O nível de significância adotado para o estudo será de 5%. Será realizado o cálculo da força da amostragem ao final do estudo.

Objetivo da Pesquisa:

Justificativa: Acredita-se que este estudo contribuirá para o melhor entendimento da gravidade causadas pela COVID-19. Reconhecer antecipadamente qual paciente poderá ter um quadro mais grave da COVID-19 é importante para o direcionamento precoce de cuidados e para melhorar a estratégia do tratamento. A identificação de biomarcadores mais sensíveis e específicos de gravidade, assim como possível marcador de doença (diagnostico mais sensível e específico) permitirá o melhor controle da mesma na prática clínica, e conseqüentemente, melhorando o tratamento. Por fim, o trabalho também contribuirá para a caracterização das gravidades geradas pela COVID-19 em pacientes com a doença, fornecendo informações importantes para a personalização terapêutica.

Hipótese: Nossas principais hipóteses são: que a COVID-19 induz a expressão diferencial de alguns miRNAs específicos dependendo da gravidade da doença; que a presença/ausência de polimorfismos na ECA2 estarão relacionadas a gravidade da doença; que o SARS-CoV-2 induz a expressão diferencial de alguns miRNAs específicos que só existirão na presença deste.

Objetivo primário: Avaliar miRNAs e polimorfismos no gene do receptor da ECA2 como possíveis biomarcadores de doença induzida pelo COVID-19.

Objetivos secundários: Objetivos específicos comuns • Caracterizar os pacientes em relação à idade, sexo, peso, altura, etnia, estado civil, tabagismo/etilismo, presença de comorbidades; e dados referentes a evolução da doença; • Caracterizar os pacientes em relação aos medicamentos

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: 4.214.696

utilizados; • Determinar a concentração de vitamina D plasmática.

Objetivo específico 1 • Identificar através de sequenciamento os principais miRNAs plasmáticos que possam ser biomarcadores de diagnóstico da COVID-19; • Realizar análise in silico dos miRNAs identificados pelo sequenciamento a fim de visualizar as vias de sinalização nas quais os miRNAs atuam e a integração entre os miRNAs e seus genes alvos envolvidos no diagnóstico da COVID-19 • Validar a expressão dos miRNAs plasmáticos como diagnóstico diferentemente expressos selecionados pelo sequenciamento. Objetivo específico 2 • Identificar através de sequenciamento os principais miRNAs plasmáticos e polimorfismos no receptor ECA relacionados à gravidade induzidas pela COVID-19; • Caracterizar os sujeitos em relação à gravidade da doença COVID-19; • Realizar análise in silico dos miRNAs identificados pelo sequenciamento a fim de visualizar as vias de sinalização nas quais os miRNAs atuam e a integração entre os miRNAs e seus genes alvos envolvidos na gravidade da COVID-19; • Avaliar polimorfismos no receptor ECA e sua relação com a gravidade da doença; • Validar a expressão dos miRNAs plasmáticos diferentemente expressos selecionados pelo sequenciamento.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os pesquisadores informaram quanto aos riscos e desconfortos previstos para os participantes da pesquisa que “Para o grupo Caso não existe risco relativo à coleta de amostras uma vez que estas serão obtidas da soroteca; Para o grupo Controle existe o risco do desconforto no momento da coleta do swab nasal e da coleta de sangue. Na coleta de sangue o braço poderá ficar roxo após coleta”.

Os pesquisadores informaram quanto aos benefícios diretos previstos para os participantes da pesquisa que “O benefício é indireto para os sujeitos, uma vez que os mesmo não se beneficiarão diretamente com os resultados. O benefício para a sociedade é claro, uma vez que os testes diagnósticos ainda são limitados, ou por sensibilidade ou por tempo que se pode ser coletado os exames, assim se a hipótese do trabalho for respondida poderemos ter um exame diagnóstico mais sensível e preciso; e ainda poderemos entender, e talvez prever por biomarcadores, o risco do indivíduo positivo evoluir pra quadros mais graves”.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A EQUIPE DE PESQUISADORES citada na capa do protocolo e na PB (em ordem alfabética, exceto a pesquisadora responsável) inclui PATRÍCIA MORIEL (Graduada em Farmácia, Docente da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – FCF-UNICAMP, Pesquisadora Responsável), ALINE DE SOUZA NICOLETTI (Graduada em Farmácia, Doutoranda no PPG em Farmacologia da FCM-UNICAMP), CARLA REGINA DA SILVA CORREA DA RONDA (Graduada em Farmácia e Bioquímica, Doutoranda no

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: 4.214.696

PPG em Ciências Farmacêuticas da FCF/UNICAMP), EDER DE CARVALHO PINCINATO (Graduado em Farmácia e Bioquímica, Pesquisador colaborador da FCF-UNICAMP), JOSÉ LUIZ DA COSTA (Graduado em Farmácia e Bioquímica, Docente da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – FCF-UNICAMP), LAIR ZAMBON (Médico, Docente do Departamento de Clínica Médica da FCM-UNICAMP), LILIAN FERREIRA DE SOUZA SILVA (Enfermeira, Supervisora da Unidade de Terapia Intensiva Adulto no Hospital Estadual Sumaré – SP), MARCELO LANCELOTI (Graduado em Ciências Biológicas, Docente da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – FCF-UNICAMP), MARÍLIA BERLOFA VISACRI (Graduada em Farmácia, Pós-doutoranda na Faculdade de Ciências Farmacêuticas - FCF-UNICAMP) e MAURÍCIO WESLEY PERROUD JUNIOR (Médico, Docente do Departamento de Clínica Médica da FCM-UNICAMP).

O orçamento descrito na PB informa que a pesquisa terá custo de R\$ 68.500,00 para aquisição de material de consumo, material para testes e coleta de amostras e para processamento de amostras e será bancado pela “Capes - Coordenação Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior” como patrocinador Institucional Principal, conforme registrado na PB.

A pesquisa foi classificada na Grande Área 4 (Ciências da Saúde) e tem como título público “miRNAs E POLIMORFISMOS NO RECEPTOR DA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA 2 COMO POSSÍVEIS BIOMARCADORES DE DOENÇA INDUZIDA PELO SARS-CoV-2”.

A pesquisa não foi classificada nas áreas temáticas especiais, mas envolve COVID-19 e foi avaliada conforme as recomendações específicas da CONEP para esta temática.

A Instituição proponente da pesquisa é o Hospital Estadual Sumaré Dr. Leandro Francheschini – HES e não foi listada Instituição Coparticipante.

O cronograma proposto no projeto informa início da pesquisa em 10/08/2020, o término em 01/08/2022, e prevê cerca de 24 meses para conclusão da pesquisa. O cronograma descrito na PB indica que a pesquisa será iniciada em 10/08/2020 e será concluída em 01/08/2022, em cerca de 24 meses.

Foi informado que haverá uso de fontes secundárias de dados (prontuários, dados demográficos, etc), sob a seguinte descrição: “Serão avaliados nos prontuários os medicamentos utilizados durante a internação e possíveis eventos adversos a estes, como também, os resultados de exames laboratoriais e exames de imagem (tomografia) para posterior relação com a gravidade e com os miRNAs”.

Foi solicitada a dispensa da obtenção do consentimento e aplicação de TCLE aos participantes/pacientes do grupo caso, sob a seguinte justificativa: “Solicitamos a dispensa para o grupo Caso. Foi solicitado dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), pois o

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: 4.214.696

contato com estes pacientes ou responsáveis legais é restrito: por isolamento de contato do paciente dentro da instituição ou por isolamento de contato dos familiares por serem comunicantes; devido à taxa de mortalidade entre pacientes internados, é esperado que cerca de 40% dos pacientes tenham ido a óbito no momento da coleta de dados. Além disso, a exposição dos investigadores ao ambiente de internação ou ao contato com os familiares, implicaria em risco de infecção para os mesmos. A dispensa do TCLE é solicitada uma vez que as amostras serão obtidas a partir da soroteca do Laboratório de Análises Clínicas do HES, a quantidade de amostra necessária para a realização dos experimentos é muito pequena, portanto, é possível conseguir a amostra da soroteca do laboratório". Destaca-se que será aplicado TCLE aos participantes do grupo controle.

Serão elaboradas duas teses de DOUTORADO a partir dos resultados deste protocolo:

1) Doutoranda: Ms. Aline de Souza Nicoletti Doutoranda do Programa de Farmacologia da FCM/UNICAMP Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Moriel Título do projeto: MICRORNAS CIRCULANTES COMO POSSÍVEIS BIOMARCADORES DE DOENÇA INDUZIDA PELO SARS-CoV-2.

2) Doutoranda: Ms. Carla Regina da Silva Correa Da Ronda Doutoranda do Programa de Ciências Farmacêuticas da FCF/UNICAMP Orientadora: Profa. Dra. Patricia Moriel Título do projeto de doutorado: POLIMORFISMOS NO GENE DO RECEPTOR DA ECA2 COMO POSSÍVEIS BIOMARCADORES DE DOENÇA INDUZIDA PELO COVID-19.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os documentos e blocos de informação utilizados para elaboração do parecer foram:

Registro do protocolo na Plataforma Brasil: Arquivo "PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1600977.pdf" de 13/08/2020.

Carta resposta ao parecer: Arquivo "respostafinal.pdf" de 13/08/2020.

Projeto de pesquisa: Arquivo "projetofinal.pdf" de 13/08/2020.

Modelo ajustado de TCLE a ser aplicado ao grupo controle: Arquivo "TCLEcontroles.pdf" de 13/08/2020.

Modelo de TCLE a ser aplicado ao grupo Caso: Arquivo "TCLEcaso.pdf" de 13/08/2020.

Regulamento de Biorrepositório para a pesquisa: Arquivo "Biorrepositorio_covid_final.pdf" de 13/08/2020.

Autorização para acesso às amostras do Laboratório de Patologia Clínica do HES: Arquivo "carta_anuencia.pdf" de 13/08/2020.

Foi reapresentada a Folha de Rosto do protocolo: Arquivo "folha_rosto_cep_covid003.pdf" de 28/07/2020. A FR foi apresentada preenchida (250 participantes) e assinada pela pesquisadora

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: 4.214.696

responsável (Dra. Patrícia Moriel) e pela Diretora Técnica do Hospital Estadual Sumaré Dr. Leandro Francheschini de Sumaré – SP (Dra. Maria Isabel Higasi Narvion) e cita a CAPES como patrocinador institucional principal.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há mais pendências por resolver:

Pendência 1 (atendida em 13/08/2020)– Quanto à caracterização da amostra nas duas etapas da pesquisa os pesquisadores informaram que “Sim, existe superposição. Serão envolvidos um total 250 participantes, sendo 50 sujeitos no grupo Controle e 200 sujeitos no grupo Caso. Para objetivo 1 ser cumprido existe a necessidade de 50 sujeitos do grupo Caso, que serão os primeiros sujeitos do grupo Caso incluídos no estudo; para o objetivo 2 ser cumprido há necessidade de 200 sujeitos (os 50 sujeitos do objetivo 1 também fazem parte deste grupo). Para facilitar o entendimento foi acrescentado no projeto: Grupos de estudo No total serão 200 amostras do grupo Caso (sujeitos de pesquisa que tiveram seu exame para SARS-CoV-2 positivo no teste referência (RT-PCR)) e 50 amostras para o grupo Controle (sujeitos que tiveram seu exame negativo para SARS-CoV-2 no teste referência). A divisão destas amostras por objetivo está demonstrada na figura 3”.

Pendência 2 (atendida em 13/08/2020)– Quanto à questão da aplicação do TCLE ao grupo caso, os pesquisadores informaram que “Diante do exposto pelo assessor vamos apresentar o TCLE também para o grupo Caso, como sugerido “por meios eletrônicos (e-mail, whatsapp, formulários eletrônicos, etc.) ou ligação gravada”. O TCLE para o grupo caso foi acrescentado no projeto”.

Pendência 3 (atendida em 13/08/2020)– Quanto ao modo esperado de movimentação dos participantes do grupo controle os pesquisadores informaram que “Como escrito no projeto, para inclusão dos sujeitos de pesquisa do grupo Controle, será realizado convite a comunidade UNICAMP para recrutar possíveis voluntários; este convite será realizado para pessoas que já estejam trabalhando presencialmente na UNICAMP, muitos alunos de pós-graduação, docentes e funcionários tem vindo rotineiramente ao Campus, com isso eles não irão se deslocar para a UNICAMP para fazer a coleta, eles já estarão na UNICAMP e facilmente podem se deslocar de seu local de trabalho para o local da coleta (FCF/UNICAMP). Recomendamos que o deslocamento seja feito a pé, ou em automóvel próprio. Em relação ao contato com o pesquisador para apresentação do projeto e assinatura do TCLE, este poderá ocorrer por telefone ou por meios eletrônicos. No momento da coleta o sujeito da pesquisa assina o TCLE. O contato deste com os pesquisadores só será no momento das coletas onde os pesquisadores estarão equipados com todos os EPIs recomendados para tal (luvas, máscara n95, faceshield e avental descartável), o sujeito deverá

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: 4.214.696

estar de máscara, só retirando a mesma no momento da coleta do swab. Portanto, entendemos que não há previsão de ressarcimento pelo deslocamento, pois ele será mínimo dentro da UNICAMP. Em relação aos riscos e desconfortos, acrescentamos que o deslocamento do sujeito dentro do campus UNICAMP deverá seguir todas as normatizações publicadas pela reitoria da universidade para minimizar a possibilidade da contaminação pelo SARS-CoV-2, que qualquer deslocamento pode gerar risco de contaminação, mas se for seguindo as normas da UNICAMP o risco é mínimo. Foi incluída essa explicação no projeto, na plataforma e no TCLE”.

Pendência 4 (atendida em 13/08/2020)– Quando à descrição de desconforto e risco para os participantes do grupo controle os pesquisadores informaram que “O texto foi reescrito e inserido no TCLE com maior detalhamento: A coleta de sangue é um procedimento invasivo, que rotineiramente é realizada em qualquer exame de sangue e que provavelmente o senhor já deve ter realizado. No momento da coleta será colocado um garrote em seu braço, o qual faz uma leve pressão e pode causar algum desconforto; após colocação do garrote o local onde será inserida a agulha será limpo com álcool, no momento em que a agulha é inserida pode ocasionar uma dor no local, passageira. Nesse momento o todo de sangue é inserido e a amostra é coletada. Algumas pessoas podem sentir, durante o procedimento, tontura e queda de pressão relacionada principalmente ao medo do procedimento, caso haja desmaio, o profissional que está fazendo coleta é treinado para dar o suporte necessário até o paciente retomar a consciência. Após retirada da agulha e do garrote é colocado curativo, que para algumas pessoas pode dar alergia, recomenda-se a retirada do mesmo após 30 minutos. Ainda poderá ter hematoma local, que irá desaparecer em alguns dias. A coleta será realizada por profissional qualificado e você está assegurado de acompanhamento e tratamento médico dentro do Hospital Estadual Sumaré (HES), caso ocorra algum problema relacionado ao procedimento da coleta de sangue. A coleta de swab de nasofaringe (SNF) e swab de orofaringe (SOF) será realizada exclusivamente com swab de Rayon (de haste plástica). Para a coleta de swab de nasofaringe, o swab será retirado de seu envelope apenas na hora da coleta. O participante da pesquisa irá se sentar em uma cadeira e irá inclinar a cabeça para trás. O swab será introduzido no nariz até encostar na região posterior do meato nasal (no fundo do nariz) e será friccionado para obtenção de células da mucosa. Neste momento, pode haver pequeno desconforto e dor momentânea, desaparecendo minutos após o procedimento. Após o procedimento, o swab é retirado e acondicionado em um frasco contendo solução salina. Para a coleta de swab de orofaringe, o swab será retirado de seu envelope apenas na hora da coleta. O participante da pesquisa irá se sentar em uma cadeira e irá inclinar um pouco a cabeça para trás e abrirá a boca. O swab será introduzido na boca até a região posterior 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



UNICAMP - CAMPUS CAMPINAS



Continuação do Parecer: 4.214.696

faringe e tonsilas (no fundo da boca), evitando tocar na língua. Neste momento, pode haver pequeno desconforto, dor e náusea momentânea, desaparecendo minutos após o procedimento. O swab será friccionado para obtenção de células da mucosa, depois será retirado e acondicionado em um frasco contendo solução salina”.

Pendência 5 (atendida em 13/08/2020)– Quanto à possibilidade de que eventuais amostras do grupo controle resultem positivas para SARS-CoV-2 os pesquisadores informaram que “Caso o resultado do participante do grupo controle seja positivo, uma vez que os sujeitos são da comunidade UNICAMP, iremos informá-lo sobre todas as recomendações relativas ao seu isolamento e prevenção de contágio de outras pessoas e orientá-lo a procurar o CECOM. Também daremos a informação ao CECOM para convocar o participante para teste confirmatório oficial da Universidade. Essa informação foi acrescentada no TCLE”.

Pendência 6 (atendida em 13/08/2020)– Os dados do pesquisador ÉDER foram atualizados na capa do projeto de pesquisa.

Pendência 7 (atendida em 13/08/2020)– Os dados da pesquisadora ALINE foram atualizados na capa do projeto de pesquisa.

Pendência 8 (atendida em 13/08/2020)– Os dados da pesquisadora CARLA foram atualizados na capa do projeto de pesquisa.

Pendência 9 (atendida em 13/08/2020)– Os cronogramas descritos no projeto de pesquisa e na PB foram harmonizados quanto à duração (24 meses).

Pendência 10 (atendida em 13/08/2020)- Foi apresentado o regulamento de Biorrepositório para a pesquisa: O material biológico (DNA extraído provenientes de sangue e plasma) será armazenado em equipamentos de congelação (freezers -20C e -80C) específicos e utilizados somente para este fim, localizada na Faculdade de Ciências Farmacêuticas, na Universidade Estadual de Campinas. As amostras serão codificadas apenas por números e a chave de ligação entre números e nomes dos indivíduos será armazenada em programa de computador protegido por senha. O material biológico condicionado em tubos próprios e os dados clínicos a ele correspondente (idade, sexo, raça e número de registro no Hospital Estadual de Sumaré) dispostos em planilhas pertinentes, acompanhados dos respectivos Termos de Consentimento dos pacientes, serão transferidos e mantidos no Biorrepositório da Faculdade de Ciências Farmacêuticas. O material biológico humano dos pacientes será armazenado durante todo o período da pesquisa, do momento da aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa até o momento da defesa da tese de doutorado que é a origem deste projeto e 10 anos após o término do doutorado para a publicação de artigos científicos relacionados ao tema da tese. O material será mantido em Biorrepositório por

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: 4.214.696

10 anos após o término do doutorado para a publicação de artigos científicos relacionados ao tema da tese mediante aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa e, após este período, será descartado.

Pendência 11 (atendida em 13/08/20)– Foi apresentada a anuência da responsável pela soroteca do HES com o uso das amostras, assinada pela Dra Adriana Eguti, Supervisora do Laboratório de Patologia Clínica do HES.

Pendência 12 (atendida em 13/08/20)– O item da PB “Haverá retenção de amostras para armazenamento em banco?” foi assinalado como “Sim”.

Pendência 13 (atendida em 13/08/20)– Foi apresentado o modelo ajustado de TCLE a ser aplicado aos participantes/pacientes negativos para SARS-CoV-2.

Pendência 14 (atendida em 13/08/20)– Foi apresentado o modelo de TCLE a ser aplicado aos participantes ou responsáveis pelos participantes do grupo caso.

Pendência 15 (atendida em 13/08/20)– Foi informado que o estudo será utilizado como tese de doutorado de duas pesquisadoras, devidamente identificadas, conforme pode ser visto ao final do bloco de texto do item “comentários e considerações sobre a pesquisa” acima.

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

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: 4.214.696

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 semestrais e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente seis meses após a data deste parecer de aprovação e ao término do estudo.

- 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_1600977.pdf	13/08/2020 10:17:50		Aceito
Outros	respostafinal.pdf	13/08/2020 10:17:07	Patricia Moriel	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEcontroles.pdf	13/08/2020 10:16:00	Patricia Moriel	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEcaso.pdf	13/08/2020 08:37:39	Patricia Moriel	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projetofinal.pdf	13/08/2020 08:35:51	Patricia Moriel	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Biorepositorio_covid_final.pdf	13/08/2020 08:30:53	Patricia Moriel	Aceito
Declaração de concordância	carta_anuencia.pdf	13/08/2020 08:30:30	Patricia Moriel	Aceito
Folha de Rosto	folha_rosto_cep_covid003.pdf	28/07/2020 15:20:49	Patricia Moriel	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: 4.214.696

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CAMPINAS, 15 de Agosto de 2020

Assinado por:
Maria Fernanda Ribeiro Bittar
(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