



UNICAMP - CAMPUS
CAMPINAS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: USO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS NA IMUNOMODULAÇÃO EM PACIENTES COM DOENÇA INFLAMATÓRIA INTESTINAL - DOENÇA DE CROHN

Pesquisador: Raquel Franco Leal

Área Temática:

Versão: 8

CAAE: 32213214.8.0000.5404

Instituição Proponente: Centro de Hematologia e Hemoterapia - HEMOCENTRO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.938.434

Apresentação do Projeto:

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

Introdução:

Doença inflamatória intestinal (DII) é o termo empregado para denominar a doença de Crohn (DC), a retocolite ulcerativa (RCU), e as colites indeterminadas, que são caracterizadas pela inflamação crônica do intestino (Baumgart DC et al 2007). Os fatores que diferem essas doenças são: área do trato gastrointestinal afetada, a profundidade do tecido comprometido, e a fisiopatologia, muito embora ainda não esteja completamente esclarecida. Existem associações entre fatores genéticos (que predispõe o indivíduo ao desenvolvimento da doença), fatores ambientais (favorecem o desencadeamento e sua modulação), composição da flora bacteriana, dieta e condições higiênicas e sanitárias no aparecimento e evolução da doença (Schirbel A. et al 2010). A DII atinge indivíduos de diversos países, sendo que pode ser rara em alguns países, e em outros pode ser considerada um problema de saúde pública, e por isso é considerada uma doença de distribuição não heterogênea (Logan I et al 2010). A DII é mais comum nos países da América do Norte e no norte da Europa Ocidental, regiões urbanizadas e industrializadas, prevalecendo em indivíduos de raça caucasiana (Logan I et al 2010). Estudos epidemiológicos no Brasil, segundo dados do Governo

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: 3.938.434

Federal, demonstraram que a região Norte apresenta o menor número de internações relacionadas com DII, em torno de 1,16/100.000 habitantes/ano. As regiões que apresentam maior número de internações devido a DII são: Centro-Oeste com 3,32/100.000 habitantes/ano; Sul com 3,07/100.000 habitantes/ano e Sudeste com 2,42/100.000 habitantes/ano. No entanto, possivelmente o número de pacientes nas regiões Sul e Sudeste é subestimado, pois são regiões em que o atendimento privado é superior ao atendimento pelo Sistema Único de Saúde (Cardozo WS et al 2012). Os fatores imunológicos que influenciam efetivamente no desenvolvimento da DII ocorrem em duas frentes distintas, porém simultaneamente: imunidade inata e imunidade adaptativa. A imunidade inata representa a primeira linha de defesa de um organismo, agindo contra microorganismos invasores e outros agentes nocivos, portanto é inespecífica. Atua minutos após a invasão pelo microorganismo podendo se estender a algumas horas, e não apresenta memória imunológica (Medzhitov R et al 2000). Apenas dois tipos celulares agem de forma ativa na imunidade inata: os macrófagos e as células dendríticas (Cardozo WS et al 2012). Os tecidos afetados pela DII possuem macrófagos ativados, que ainda expressam o marcador monocítico CD14 (Cluster Differentiation), e são fenotipicamente heterogêneos, diferentemente do intestino normal. No intestino normal os macrófagos são limitados pelo microambiente mucoso expressando fenótipos não inflamatórios, que são decodificados por expressão infrarregulada de receptores da imunidade inata, e conseqüentemente uma produção restrita de citocinas pró-inflamatórias, como as interleucinas (IL): IL-1; IL-1 e TNF-alfa (Fator de Necrose Tumoral) (Smith PD et al 2005; Selby WS et al 1983). As células dendríticas (CD) são células apresentadoras de antígenos e por isso estão diretamente associadas ao desencadeamento e à regulação imunológica local. As CD também participam da imunidade adaptativa (Rescigno M et al 2009). O microambiente da mucosa intestinal é responsável por modular as funções desse tipo celular na própria mucosa, induzindo tolerância, mediando a inflamação, além de fornecer defesa e proteção (Bilborough J. et al 2004). Na DII, as células dendríticas são ativadas e estão em número reduzido, porém apresentam receptores microbianos fortemente expressos, o que induz uma produção exacerbada de algumas citocinas pró-inflamatórias, como as IL-6 e IL-12 (Cardozo WS et al 2012). Simultaneamente à imunidade inata, a resposta adaptativa atua como uma segunda linha de defesa contra microorganismos invasores e outros antígenos. O período de desenvolvimento compreende algumas horas a vários dias após contato com o antígeno, é antígeno-específica, e diferente da resposta inata, apresenta memória imunológica (Hoebe K et al 2004). A imunidade adaptativa é composta pela imunidade humoral (células B), e imunidade celular (células T). Os anticorpos produzidos pelas células B, e a síntese e secreção de IgM, IgG e IgA são alterados, com aumento

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: 3.938.434

tanto sérico quanto na mucosa (MacDermott RP et al 1981). As células mais envolvidas no desenvolvimento da DII são as T helper CD4+ 1 (Th1) e Th2, que são subgrupos das células Th (Cardozo WS et al 2012). As células Th1 são produtoras de IFN-gama e as Th2 produzem IL-4, IL-5 e IL-13, que estão diretamente associados ao desencadeamento da doença (Annunziato F et al 2007).

1.1 DOENÇA DE CROHN (DC)

A DC foi descrita pela primeira vez em 1612 por Gullielmus Fabricius Hildenus, que demonstrou na necropsia de um rapaz, a obstrução do íleo, tornando impossível a passagem do conteúdo intestinal ao cólon. Essa porção intestinal extraída apresentava-se ulcerada e fibrótica (Arnott IDR et al 2003). Combe e Saunders, no início do século XIX, descreveram o caso de um paciente que apresentava dores abdominais crônicas, que na necropsia mostrava espessamento, inflamação e estenose do íleo (Kirsner JB et al 1995). Porém, somente no século XX foi publicado um artigo, por Crohn et al 1932, em que se definiu claramente essa doença, que posteriormente levaria seu nome: Doença de Crohn (Medisa; 2007). DC é uma doença inflamatória crônica segmentar e transmural que pode atingir qualquer parte do trato gastrointestinal, desde a boca até o anus, localizando-se principalmente na região do íleo terminal. Caracteriza-se pela formação de ulcerações, fístulas, estenoses e granulomas intestinais, com períodos de agravamento e remissão. Podem também ser observadas várias manifestações extra-intestinais (Ribeiro ICT et al 2009). A prevalência é maior na faixa etária que compreende a segunda e terceira décadas de vida, sendo também recorrente no intervalo de 60 a 80 anos (Fauci AS et al 2008). A DC acomete com mais frequência mulheres (relação M/H é de 1:1 a 1,8:1), de classes socioeconômicas mais elevadas (Hanauer et al 2006). Quanto ao grupo étnico, a DC é mais frequentemente observada em judeus, judeus caucasianos, hispânicos, e asiáticos (Fauci AS et al 2008). Por ser uma doença também influenciada pelos fatores ambientais, possui uma incidência variável de acordo com a localização geográfica, sendo a taxa de incidência mundial de 0,1-16/105.000 habitantes (Lakatos PL et al 2006). As maiores incidências de DC foram observadas na Europa Ocidental e do Norte, EUA, enquanto as menores estão na África, América do Sul, e Ásia (Lakatos PL et al 2006). Diante disso, foi constatado que é mais comum em países desenvolvidos e industrializados, indicando a urbanização como um fator de risco (Lakatos PL et al 2006).

1.1.2 FISIOPATOLOGIA DA DCA

fisiopatologia da DC ainda não está bem esclarecida; assim, existem várias hipóteses de sua origem: defeitos na barreira da mucosa intestinal; disbiose; infecção patogênica persistente, e desregulação imunológica. Porém, acredita-se que haja uma interação entre diversos fatores, como: genético, ambiental, presença de micro-organismos e epitélio intestinal. Os fatores genéticos alteram a função da barreira epitelial da mucosa intestinal, as respostas imunitárias, e a eliminação bacteriana. As alterações da barreira epitelial consistem

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: 3.938.434

em alterações tight junctions, na produção de muco, na presença de IgA e defensinas, juntamente com o aumento da permeabilidade, que contribuem para a inflamação persistente, que é característica da DC (Ribeiro ICT et al 2009). Uma alteração no equilíbrio entre microorganismos protetores e patogênicos na microflora intestinal altera a homeostasia, favorecendo uma inflamação crônica em indivíduos susceptíveis, que caracteriza a disbiose. Os agentes patogênicos que podem desencadear a DC são principalmente: *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica* e paramixovírus (Ribeiro ICT et al 2009). Em um microambiente como o intestinal, o sistema imunológico da mucosa deve ser capaz de manter a tolerância às bactérias comensais e aos alimentos, e, sobretudo ter a capacidade de obter respostas de defesa diante de patógenos; porém, os pacientes com DC possuem de forma deficitária (Torres MI et al 2008). A tolerância pode ser mediada essencialmente pelas células epiteliais intestinais (CEI), células T regulatórias (Treg), Linfócitos B, e CD, que são responsáveis por secretar IL-10, INF- γ e TGF- β (Sartor RB et al 2006). As CEI são as células de maior importância para manutenção da tolerância, pois, possuem tight junctions, com produção de muco, defensinas e de imunoglobulinas, que impedem o contato direto dos antígenos com o tecido folicular, evitando o desenvolvimento de respostas inflamatórias (Ribeiro ICT et al 2009). Um tipo de CEI mais especializada são as células M, que são responsáveis por transportar antígenos para as CD e CAA, induzindo uma resposta imunológica (tolerância) ao estimular as células TCD4+ efectoras (TH1/Th17) ou as células Treg (O'Hara AM et al 2006). Na DC, as CD produzem mais IL-12, que ativa as células Th1, que são responsáveis pelas respostas inflamatórias (Ribeiro ICT et al 2009). O equilíbrio entre as células TCD4+ e as Treg é imprescindível para manutenção da homeostasia da mucosa (Kucharzik T et al 2006). Os principais tipos de Treg envolvidos na DC são: Treg CD4+/CD25+, Treg 1, células Th3, e as TCD8+/CD28-. Essas células inibem a produção de IL inflamatórias pelos macrófagos, e diminuem a ativação das células Th1 e CAA, através da produção das citocinas IL-10 e TGF- β (Kucharzik T et al 2006). Na DC, as respostas imunológicas inata e adaptativa são inadequadas. O estímulo exercido pela ativação do NF- κ B (Nuclear Factor Kappa B) sobre a expressão de diversas moléculas que influenciam na ativação das células T são IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, IL-23, TNF- α , moléculas de adesão, e moléculas co-estimuladoras (CD40, CD80, CD86) (Shih DQ et al 2008). O TNF- α é um dos mediadores mais importantes no desenvolvimento da DC. É produzido por vários tipos celulares, e tem entre outras funções, o estímulo à produção de moléculas de adesão e citocinas inflamatórias, a ativação da coagulação, indução da apoptose celular, recrutamento de neutrófilos para os locais inflamados, e indução da formação de granulomas (Sandborn WJ et al 1999). Por isso, o desequilíbrio entre a secreção e inibição de TNF- α está associado à patogênese da doença. As moléculas de adesão, como

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: 3.938.434

por exemplo, as integrinas e ICAM-1 (Intracellular cell Adhesion Molecule 1), estão aumentadas, e isso faz com que ocorra migração de leucócitos para a região inflamada (Ribeiro ICT et al 2009). Os macrófagos pró-inflamatórios CD14⁺ estão em número aumentado e tem produção excessiva de IL-23 e TNF- α , ocasionando a formação de INF- γ pelas células T locais (Kamada N et al 2008). Além disso, os macrófagos e as CD expressam de forma exacerbada TLR2 (Toll Like Receptors) e TLR4, moléculas co-estimuladoras; e por fim, produzindo mais citocinas pró-inflamatórias como IL-12 e IL-6, e conseqüentemente a ativação de células Th1 (Danese F et al 2006). Simultaneamente, as CD produzem menos IL-10, o que reduz as respostas reguladoras (Bamias G et al 2007). A imunidade adaptativa representa papel importante na patogênese da doença. Existem dois tipos de células T CD4⁺ efetoras que são relevantes no desenvolvimento da DC: Th1 e Th2, que são responsáveis por causar uma inflamação crônica local. Na DC predominam as respostas Th1 (Ribeiro ICT et al 2009). As CAA produzem IL-12, que induz a formação de células Th1 produtoras de INF- γ , IL-2 e TNF- α ; as células Th2 produzem IL-4, que estimula a produção de IL-5 e IL-10 (Torres MI et al 2008). As células Th1 aumentam a expressão de moléculas de MHC-II (Major Histocompatibility Complex II) nas CAA, ativa células T CD8⁺ e macrófagos, e aumenta a produção de IgG pelos linfócitos B (Goldsby RA et al 2003). As principais citocinas inflamatórias produzidas na DC como resposta imunológica adaptativa são o INF- γ , e a IL-17. Além das respostas imunológicas descritas anteriormente, outra que se destaca no processo de desenvolvimento da DC é o aumento da IL-23/IL-17 nos tecidos (Shih DQ et al 2008). A IL-23 é produzida pelas CAA, tais como CD e macrófagos, e é responsável por estimular a produção de IL-17, TNF- α e IL-6 pelas células Th17 (Torres MI et al 2008). Portanto, a DC pode ser definida como uma resposta do tipo Th1, induzida primeiramente pelas IL-12 produzidas a partir de CD ativas, mediada pela produção exacerbada de INF- γ (Monteleone I et al 2002). Segundo Maynard e colaboradores (Maynard CL et al 2009), as células T da mucosa produzem altas concentrações de IL-17, a partir das células Th-17 induzidas pelas IL-23. Portanto a DC pode ser dependente de Th-1, Th-17 ou de ambas. A imunidade humoral também é alterada, e as células B produzem e secretam uma quantidade desregulada de anticorpos, especialmente IgG, IgM e IgA (MacDermont et al 1981). Na DC os níveis de IgG1, IgG2 e IgG3 são aumentados tanto em níveis séricos quanto na mucosa intestinal, quando comparados a indivíduos saudáveis (Cardoso WS et al 2012).

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DC De acordo com a classificação de Montreal (2006) (Satsangi J et al 2006), a DC pode ser definida de acordo com sua localização, que pode acometer a região do íleo terminal, cólon, íleo-cólon e trato gastro intestinal superior; e pelo padrão da patologia como não-estenotante, não-penetrante, penetrante. A idade também está associada à classificação, que possui dois grupos organizados

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: 3.938.434

por faixas etárias: os menores de 40 anos e os superiores ou iguais a 40 anos (Gasche C et al 2000). Com relação à região acometida, cerca de 30-40% dos casos estão restritos ao intestino delgado, 40-55% envolvem intestino delgado e cólon, e 15-25% tem apenas colite (Fauci AS et al 2008). No caso da DC, o reto é pouco afetado, e 75% dos casos com lesão no intestino delgado tem também acometimento do íleo terminal (Fauci AS et al 2008). Os sinais e sintomas são variáveis de acordo com o local afetado: ileocolite, jejunoileíte, colite, doença perianal e doença gastroduodenal (Ribeiro ICT et al 2009). Na ileocolite, ocorrem fases recorrentes de diarreia, febre moderada, dor crônica, perda de peso, obstrução intestinal, formação de fístulas para o intestino adjacente, pele, vagina e bexiga. Na jejunoileíte, frequentemente os pacientes apresentam má absorção de nutrientes, o que acarretará hipocalcemia, hipomagnesemia, coagulopatia, hipoalbuminemia e anemia megaloblástica. Também apresentam diarreia, esteatorreia, fraturas vertebrais decorrentes da deficiência de cálcio e vitamina D, e por uso prolongado de corticoides. Na colite existem episódios frequentes de cólicas abdominais, diarreia, indisposição, hematoquezia, febre moderada, estenoses e fístulas. Quanto à doença perianal, ocorrem episódios frequentes de incontinência fecal, formação de estenoses, fístulas e abscessos. E por fim, na doença gastroduodenal, o paciente apresenta náuseas, vômitos, dor epigástrica, gastrite e formação de fístulas (Ribeiro ICT et al 2009).

2. TRATAMENTO FARMACOLÓGICO DAS DII

tratamento farmacológico convencional para controle das DII se fundamenta no uso dos aminossalicilatos, corticóides, antibióticos e imunossupressores. Com os tratamentos convencionais, cerca de 50-60% mantem a estabilidade da DC. Porém, a maioria dos medicamentos são de uso contínuo, com gasto mensal de R\$ 500,00 a R\$ 600,00 para o paciente, e quando necessitam de terapia biológica esse gasto aumenta para aproximadamente R\$ 2900,00, segundo a Associação Brasileira de Colite e Doença de Crohn (ABCD). Além do alto valor dos medicamentos, eles apresentam reações adversas em vários casos, como náuseas, vômito, piora dos sintomas característicos, inibição do sistema imunológico, e possibilidade de complicações infecciosas. A terapia biológica (anti-TNF-) foi aprovada primeiramente para DC em 1998 nos EUA, e posteriormente para a RCU. Os principais medicamentos que fazem parte desta classe de drogas são o Infiximabe e o Adalimumabe. O advento da terapia biológica certamente foi um avanço no manejo clínico das DII; no entanto, até 40% dos pacientes perde a resposta no acompanhamento a longo prazo (Leal et al. Gut 2014). As principais reações adversas são as reações infusionais como dispnéia, rubor, rash cutâneo e cefaleia (Santos RV. et al 2006). Outros efeitos são mialgias, poliartalgias e febre, não sendo aconselhável a pacientes cardiopatas (Santos RV. et al 2006). Atualmente diversas classes de medicamentos estão sendo desenvolvidas para o tratamento das DII, porém poucas demonstram

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: 3.938.434

eficácia na resposta clínica, ou mesmo remissão clínica e/ou endoscópica. Exemplo de drogas promissoras que podem fazer parte do arsenal do tratamento das DII são o Vedolizumabe (anti-integrina -4 -7), e o Tofacitinibe (anti-JNK). Contudo, como citado anteriormente, o custo com esses tratamentos é muito elevado, sendo considerados tratamentos de alto custo, comprometendo de forma significativa as verbas disponíveis do SUS.3. PLASMA RICO EM PLAQUETAS E IMUNOMODULAÇÃO plasma rico em plaquetas (PRP) é um produto derivado do processamento do sangue autólogo (Garcia RLL et al 2005). Esse produto apresenta alta concentração de plaquetas que estão diluídas em pequenos volumes de plasma (Marx, 2004). Essa concentração corresponde de 4 a 7 vezes o valor basal de plaquetas, ou seja, aproximadamente 1 milhão de plaquetas por L (Eppley et al., 2006, Marx, 2004). O processamento desse produto ainda é muito diversificado, e ainda não estão estabelecidos padrões de força ou tempo de centrifugação para uso comum em todas as aplicações clínicas (Liao et al., 2013). Estudos do uso do PRP em diversas situações clínicas demonstraram sua eficácia no tratamento de condropatias, osteoartrose e úlceras crônicas de pele (Patel et al., 2013; Li et al., 2011; Torrero et al., 2012; Sarvajnamurthy et al., 2013). Outros estudos estão sendo realizados para comprovar a eficácia do PRP em inflamações e lesões degenerativas músculo-esqueléticas. No estudo de Lippross et al (2011) em modelos animais, foi utilizado o PRP no tratamento de artrite reumatoide, com quadro inflamatório intenso. Muito embora tenham sido feitas apenas aplicações intra-articulares, observou-se um efeito sistêmico nas concentrações dos marcadores inflamatórios, com redução de IL-6, VEGF, IGF-1 e IL-1 (Lippross et al., 2011). Quanto à análise proteica do PRP nesse estudo, demonstrou-se uma quantidade atípica de proteínas secretoras associadas à modulação da inflamação, como a IL-1, que é uma citocina típica do catabolismo pró-inflamatório, que está em concentrações reduzidas no PRP, o que justifica seu uso como anti-inflamatório. Outra citocina importante encontrada em grandes quantidades no PRP é a IL-6, que tem vários papéis na inflamação e regeneração, e sobretudo é considerada um modulador imune (Lippross et al., 2011). As plaquetas apresentam um papel fundamental no PRP devido aos -grânulos e os grânulos densos. Dentro dos -grânulos existem fatores de crescimento, e sete deles são considerados os mais importantes: fator de crescimento derivado das plaquetas e seus isômeros (PDGF-AA, PDGF-BB e PDGF-AB), fator de transformação do crescimento (TGF-1 e TGF-2), fator de crescimento derivado do endotélio (VEGF), e fator de crescimento epitelial (EGF) (Eppley et al., 2006). As plaquetas e os fatores de crescimento liberados são essenciais para regular os eventos celulares que ocorrem após um dano tecidual. Elas aderem, agregam, ativam a coagulação, desencadeando a formação da malha de fibrina, e subsequentemente liberam uma grande variedade de fatores de crescimento e citocinas

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: 3.938.434

(Lippross et al., 2011). Assim, atualmente as pesquisas estão avaliando de forma mais abrangente o papel das plaquetas, não limitando apenas às suas funções hemostáticas. As plaquetas participam do processo de inflamação, liberando diferentes substâncias que são capazes de modular a resposta inflamatória via interação com células endoteliais e leucócitos. Os principais imunomoduladores descritos são: PDGF, TGF- β , CD40L e CD154 (Cognasse et al., 2006). O TGF- β é o principal imunossupressor, e evidências sugerem que a diferenciação de Treg é dependente do TGF- β . Isto ficou evidente quando pacientes com trombocitopenia imune, que caracteristicamente apresentam diminuição de células Treg e TGF- β , foram tratados com terapias que aumentam o número de plaquetas, como a imunoglobulina e a dexametasona, e observou-se a restauração funcional e quantitativa de células Treg (Semple et al., 2011). Além disso, o CD154 que é expresso em plaquetas ativadas pode afetar a imunidade adaptativa. Este receptor pode dar suporte à diferenciação de células B, e promover respostas protetoras de células T após infecções (Semple et al., 2011). Um estudo comparou as culturas de células tronco mesenquimais (MSC) derivadas da medula óssea ou de gordura, suplementadas com lisado de plaquetas ou com soro fetal bovino. Os resultados evidenciaram que a cultura de MSCs derivadas de gordura suplementadas com lisado de plaquetas apresentavam aumento dos níveis de IDO e TSG-6. O primeiro tem efeito central na função supressora de células T, e o segundo diminuiu o recrutamento de neutrófilos. Em relação aos efeitos colaterais e riscos, não há relatos na literatura de qualquer efeito prejudicial relacionado ao uso de PRP. Apesar de não haver nenhum estudo em relação ao papel do PRP como imunomodulador, como o seu emprego em diversas situações clínicas com outras finalidades demonstrou alterações sistêmicas que sugerem esse efeito, torna-se bastante atrativo a investigação dessa possibilidade na prática clínica.

Hipótese:

Estudos do uso do PRP em diversas situações clínicas demonstraram sua eficácia no tratamento de condropatias, osteoartrose e úlceras crônicas de pele (Patel et al., 2013; Li et al., 2011; Torrero et al., 2012; Sarvajnamurthy et al., 2013). Outros estudos estão sendo realizados para comprovar a eficácia do PRP em inflamações e lesões degenerativas músculo-esqueléticas. No estudo de Lippross et al. (2011) em modelos animais, foi utilizado o PRP no tratamento de artrite reumatoide, com quadro inflamatório intenso. Muito embora tenham sido feitas apenas aplicações intra-articulares, observou-se um efeito sistêmico nas concentrações dos marcadores inflamatórios, com redução de IL-6, VEGF, IGF-1 e IL-1 (Lippross et al., 2011). Quanto à análise proteica do PRP nesse

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: 3.938.434

estudo, demonstrou-se uma quantidade atípica de proteínas secretoras associadas à modulação da inflamação, como a IL-1, que é uma citocina típica do catabolismo pró-inflamatório, que está em concentrações reduzidas no PRP, o que justificou seu uso como anti-inflamatório. Outra citocina importante encontrada em grandes quantidades no PRP é a IL-6, que tem vários papéis na inflamação e regeneração, e sobretudo é considerada um modulador imune (Lippross et al., 2011). As plaquetas apresentam um papel fundamental no PRP devido aos grânulos e os grânulos densos. Dentro dos grânulos existem fatores de crescimento, e sete deles são considerados os mais importantes: fator de crescimento derivado das plaquetas e seus isômeros (PDGF-AA, PDGF-BB e PDGF-AB), fator de transformação do crescimento (TGF-1 e TGF-2), fator de crescimento derivado do endotélio (VEGF), e fator de crescimento epitelial (EGF) (Eppley et al., 2006). As plaquetas e os fatores de crescimento liberados são essenciais para regular os eventos celulares que ocorrem após um dano tecidual. Elas aderem, agregam, ativam a coagulação, desencadeando a formação da malha de fibrina, e subsequentemente liberam uma grande variedade de fatores de crescimento e citocinas (Lippross et al., 2011). Assim, atualmente as pesquisas estão avaliando de forma mais abrangente o papel das plaquetas, não limitando apenas às suas funções hemostáticas. As plaquetas participam do processo de inflamação, liberando diferentes substâncias que são capazes de modular a resposta inflamatória via interação com células endoteliais e leucócitos. Os principais imunomoduladores descritos são: PDGF, TGF-, CD40L e CD154 (Cognasse et al., 2006). O TGF- é o principal imunossupressor, e evidências sugerem que a diferenciação de Treg é dependente do TGF-. Isto ficou evidente quando pacientes com trombocitopenia imune, que caracteristicamente apresentam diminuição de células Treg e TGF-, foram tratados com terapias que aumentam o número de plaquetas, como a imunoglobulina e a dexametasona, e observou-se a restauração funcional e quantitativa de células Treg (Semple et al., 2011). Além disso, o CD154 que é expresso em plaquetas ativadas pode afetar a imunidade adaptativa. Este receptor pode dar suporte à diferenciação de células B, e promover respostas protetoras de células T após infecções (Semple et al., 2011). Um estudo comparou as culturas de células tronco mesenquimais (MSC) derivadas da medula óssea ou de gordura, suplementadas com lisado de plaquetas ou com soro fetal bovino. Os resultados evidenciaram que a cultura de MSCs derivadas de gordura suplementadas com lisado de plaquetas apresentavam aumento dos níveis de IDO e TSG-6. O primeiro tem efeito central na função supressora de células T, e o segundo diminuiu o recrutamento de neutrófilos. Apesar de não haver nenhum estudo em relação ao papel do PRP como imunomodulador, como o seu emprego em diversas situações clínicas com outras finalidades demonstrou alterações sistêmicas que sugerem esse efeito, torna-se bastante atrativo 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

Continuação do Parecer: 3.938.434

investigação dessa possibilidade. Portanto, a hipótese é de que o PRP é imunomodulador na doença de Crohn.

Metodologia Proposta:

Os pacientes com diagnóstico de DC e que potencialmente possam participar do estudo assinarão o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (anexo). Os pacientes elegíveis coletarão uma amostra de sangue para exames laboratoriais. O protocolo clínico laboratorial incluirá dados de identificação, história da doença, uso de medicamentos, antecedentes pessoais e familiares, o exame físico referente aos vários órgãos e sistemas, e a realização dos seguintes exames laboratoriais: hemograma, determinação do VHS (Wintrobe), urina I, dosagem da uréia, creatinina, aminotransferases, bilirrubina, fosfatase alcalina, pesquisa do fator antinuclear (FAN), e sorologias para hepatites B, C e HIV. Após a avaliação desses resultados, os pacientes que preencherem todos os critérios de inclusão e exclusão serão incluídos no estudo. No dia da inclusão todos os pacientes responderão a um questionário, que inclui dados relativos ao diagnóstico, tratamento, e evolução clínica. Dados relativos a todas essas questões também serão levantados do prontuário clínico no Gastrocentro da Unicamp. Também será feito um exame físico detalhado e programação do exame de ileocolonoscopia. No dia do exame endoscópico, serão coletadas amostras de sangue para avaliação de marcadores imunológicos e de atividade da doença, como velocidade de hemossedimentação, proteína C reativa, hemoglobina, plaquetas, e albumina. Serão calculados os índices de atividade clínica da doença (IADC) (Best WR et al 1976) e endoscópicos (CDEIS e SES-CD) (Mary JY et al 1989,). Para os pacientes com DC perianal, além dos critérios clínicos e laboratoriais, será calculado também o índice de atividade da DC perianal (IADCP) (Daperno M. et al 2004, Irvine EJ et al 1995). Os pacientes serão agendados para coleta e preparação do PRP para tratamento, conforme protocolo descrito a seguir. O PRP preparado será o L-PRP, isto é, PRP rico em leucócitos. O sangue dos pacientes será coletado através de punção venosa em 4 tubos de 8,5 ml contendo o anticoagulante citrato dextrose (acd), e um tubo de 4,0 ml para o hemograma, contendo o anticoagulante edta. Esta quantidade de 38 ml será coletada a cada aplicação de PRP. Serão aplicados 2ml de PRP subcutâneo. Serão 18 aplicações. As avaliações serão: O PRP será preparado por dupla centrifugação (Amable et al., 2013). Após a primeira centrifugação, a 300 g por 5 minutos, o plasma será coletado junto com a camada leucocitária (buffy coat). O plasma e o buffy coat coletados serão alíquotados em tubos falcon de 15 ml, estéreis, e serão centrifugados novamente, a 700 g por 17 minutos, para concentração de plaquetas. Serão retirados 80% do volume do plasma, correspondente ao plasma pobre em plaquetas (PPP), e os 20% de plasma

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: 3.938.434

restantes no tubo serão coletados e transferidos para uma seringa de 10 ml. Ao final, após obtenção do PRP, uma alíquota será retirada para verificar a concentração de plaquetas e leucócitos, comparando com o valor basal obtido no tubo de hemograma. Serão administrados 2ml subcutâneos na região periumbilical. Total de aplicações: 18. A avaliação clínica, laboratorial e endoscópica (ileocolonosopia) dos pacientes incluídos no estudo será realizada no 3º e no 6º mês após o início da terapêutica. Os fatores de crescimento PDGF, VEGF, EGF e TGF- β serão quantificados por kits específicos para o equipamento Luminex, a fim de verificar o perfil do PRP aplicado. As interleucinas IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17, TGF- β , IFN- γ , serão quantificadas no PRP e em amostras de plasma do paciente através da plataforma CBA. Essa avaliação ocorrerá no início do tratamento e após 12 aplicações (3º mês). Será realizada também quantificação celular (Th1, Th17 e Treg), coleta das biópsias intestinais por videocolonosopia para análise de cRNA resultante será processado com Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Arrays (Affymetrix, USA) e os dados serão analisados utilizando-se o programa estatístico Bioconductor in R (V.2.15.0).

Critério de Inclusão:

Serão selecionados 10 pacientes com diagnóstico de DC refratária. Os critérios de inclusão serão: pacientes com idade entre 18 e 60 anos, que tiverem diagnóstico endoscópico e histológico de DC, sem resposta ao tratamento medicamentoso convencional e biológico, e que estão sem usar essas medicações há no mínimo 1 mês. Serão incluídos aqueles com DC de íleo distal, cólico, íleo-cólico e/ou perianal.

Critério de Exclusão:

Os critérios de exclusão serão: doença hepática, renal, outras doenças auto-imunes, neoplasia, uso de anti-inflamatórios não hormonais, tabagismo e etilismo.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Caracterizar o PRP de pacientes com DC refratária ao tratamento convencional, e avaliar os seus efeitos como imunomodulador, através de aplicação subcutânea.

Objetivo Secundário:

1) Caracterizar o PRP dos pacientes com DC através da avaliação de fatores de crescimento (PDGF, VEGF, EGF, TGF- β), citocinas e interleucinas; 2) Analisar os efeitos imunomoduladores da aplicação

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: 3.938.434

subcutânea de PRP autólogo em pacientes com DC, por meio dos níveis de fatores inflamatório-séricos antes e após utilização do PRP.3) Avaliar resposta clínica, endoscópica e marcadores de atividade da doença antes do início do tratamento, e após o 3º e 6º mês do mesmo.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo informações do pesquisador: “Riscos: Nesse tipo de tratamento, que é feito com suas próprias plaquetas, não existem relatos na literatura de riscos, porém em outras terapias com materiais autólogos já relataram alguns riscos que podem acontecer também com o PRP, como infecção local, sangramento com a infusão por agulha, início de quadro de dor local. Devemos ressaltar ainda que riscos mais graves como desenvolvimento de tumores, coma ou óbito podem ocorrer, mesmo ainda não havendo relatos na literatura médica de tal ocorrência. Outras manifestações clínicas ainda não relatadas na literatura médica podem ocorrer. Os riscos decorrentes do exame endoscópico do intestino (colonoscopia) são perfuração do intestino e sangramento, que podem ocorrer em menos de 1% dos casos, e os riscos decorrentes da medicação utilizada são alergia e diminuição da pressão. Esta medicação poderá ser ou não utilizada. Benefícios: Uso de material autólogo reduz riscos de reações alérgicas; Possível controle imunológico da doença, reduzindo/cicatrizando fístulas, úlceras, etc.”.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Este protocolo se refere a um Projeto de Pesquisa intitulado "USO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS NA IMUNOMODULAÇÃO EM PACIENTES COM DOENÇA INFLAMATÓRIA INTESTINAL – DOENÇA DE CROHN", cuja pesquisadora responsável é a Profa. Dra. Raquel Franco Leal. Também participarão do projeto a Profa. Dra. Joyce Maria Annichino-Bizzacchi, a Dra. Angela Malheiros Luzo, Dra. Francesca Aparecida Ramos da Silva e a aluna Marcia Carolina Mazzaro.

Segundo informações da pesquisadora responsável pelo projeto, presentes no documento “Carta_CEP_emenda.pdf” de 04/03/2020: “Trata-se de uma emenda para adicionar um novo membro de pesquisa, a aluna de Doutorado Marcia Carolina Mazzaro. Ela será orientada por mim, Profa. Raquel Franco Leal. A aluna em questão (Marcia Carolina Mazzaro) faz parte do programa de pós-graduação, e desenvolverá uma parte do estudo que ainda não foi realizada, porém já prevista no projeto inicial. A análise consiste na avaliação das vias inflamatórias e anti-inflamatórias em biópsias intestinais que foram coletadas dos pacientes que receberam plasma rico em plaquetas (PRP).”.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

1- “PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1520552_E4.pdf” de 19/03/2020

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: 3.938.434

- 2- "PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1386770_E3.pdf" de 19/07/2019
- 3- "4_CROHN_PROJETO_PESQUISA_FRANCESCA_14_04_2015_1.pdf"
- 4- "PROJETO_EMENDA_DOUTORADO_MARCIA.pdf"
- 5- "PLATAFORMA - PRP CROHN PROJETO PESQUISA FRANCESCA_ 10-06-2014.pdf"
- 6- "Carta_CEP_Emenda2.pdf"

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

As pendências foram devidamente respondidas pela pesquisadora responsável pelo projeto, portanto a emenda foi aprovada.

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

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: 3.938.434

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.

-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_1520552_E4.pdf	19/03/2020 19:20:30		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_EMENDA_DOUTORADO_MARCIA.pdf	19/03/2020 19:19:04	Raquel Franco Leal	Aceito
Outros	Carta_CEP_Emenda2.pdf	19/03/2020 19:15:57	Raquel Franco Leal	Aceito
Outros	Regulamento Biorrepositório (2).pdf	14/08/2014 16:41:11		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	CEP EMENDA - TCLE CROHN - 14-08-2014.pdf	14/08/2014 16:39:28		Aceito
Folha de Rosto	FOLHA DE ROSTO CROHN.pdf	10/06/2014 10:11:12		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

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: 3.938.434

CAMPINAS, 27 de Março 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