



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO
DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Suzana Kague Schnoor

**Avaliação da carga viral do Vírus da Imunodeficiência
Humana (HIV) em plasma pobre e rico em plaquetas**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestra em Pesquisa e Desenvolvimento (Biotecnologia médica).

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Rejane Maria Tommasini Grotto

**Botucatu
2021**

Suzana Kague Schnoor

Avaliação da carga viral do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) em plasma pobre e rico em plaquetas

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestra em Pesquisa e Desenvolvimento (Biotecnologia Médica).

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rejane Maria Tommasini Grotto

Botucatu

2021

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Schnoor, Suzana Kague.

Avaliação da carga viral do Vírus da Imunodeficiência Humana em plasma pobre e rico em plaquetas / Suzana Kague Schnoor. - Botucatu, 2021

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Rejane Maria Tommasini Grotto
Capes: 90400003

1. HIV. 2. Plasma rico em plaquetas. 3. Plasma pobre em plaquetas. 4. Carga viral.

Palavras-chave: Carga viral; HIV; Plaquetas; Plasma pobre em plaquetas; Plasma rico em plaquetas.

*Para meus pais,
meus maiores exemplos
de vida!*

Agradecimentos

Agradeço primeiramente à Deus pela vida, pela saúde, pela família e pela oportunidade de evoluir como pessoa.

Aos meus pais José Paulo e Marisa pela dedicação à nossa família, por apoiarem minhas escolhas, por sempre me ajudarem e por serem exemplo de honestidade, persistência e de vida. Graças a vocês dois tive o privilégio de estudar e poder escolher o meu caminho.

Ao meu filho Lucas que mudou meu mundo e me ajudou a chegar aonde estou hoje.
Ao meu filho Leonardo que chegou quando nós menos esperávamos e completou nossa família. Amo vocês meus meninos!

Ao meu marido José Carlos pelo companheirismo, amizade, amor, apoio, paciência e por sempre estar ao meu lado!

Ao Instituto Adolfo Lutz pela oportunidade de aprender, aprimorar e crescer profissionalmente, pois graças ao trabalho desenvolvido esse mestrado se tornou realidade. Agradeço especialmente à diretora do IAL Marília, Alice Maria Ferreira Gelsi pela confiança no meu trabalho e pela amizade.

À Andressa Cruz, uma profissional espetacular que o Instituto Adolfo Lutz me presenteou e que hoje posso chamar de amiga. Obrigada pelo apoio e pelos “palpites” de sempre!

Ao diretor do Laboratório Municipal de Tupã, Edi Carlos Iacida por me apoiar durante o cumprimento dos créditos e pela confiança no meu trabalho.

Às minhas queridas amigas de sempre e para sempre Gisele Capiotto, Ayeda Sanches e Keila Escobar. Obrigada por me apoiarem e sempre estarem ao meu lado, vocês são demais!

Aos funcionários do Laboratório de Biologia Molecular do Laboratório de Biotecnologia Aplicada, especialmente Maércio, Regina e Gabi, meu muito obrigada pois sem vocês nada disso seria possível! Pessoas espetaculares com quem tive o prazer de conhecer e trabalhar.

Ao Programa de Pós-graduação em Pesquisa e Desenvolvimento pelo ensino de excelência, desde o corpo docente, as disciplinas, bem como os discentes, que por ser um programa multiprofissional permitiu uma troca de experiências única.

Aos amigos que o mestrado me deu: Lucas, Eduardo, Sheila, Natália e Bruno pelos momentos que passamos juntos, pelas risadas e pela incrível troca de experiências.

À minha orientadora Dr^a Rejane pela oportunidade de realizar este mestrado e pela confiança depositada em mim. Obrigada pela dedicação, paciência, preocupações, conhecimentos e ensinamentos transmitidos. Foi uma honra ter você como orientadora!

Resumo

SCHNOOR, S.K. **Avaliação da carga viral do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) em plasma pobre e rico em plaquetas.** Dissertação (Mestrado em Pesquisa e Desenvolvimento – Biotecnologia Médica) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2021.

A aids é consequência da infecção causada pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV). Os principais alvos do vírus são linfócitos T CD4+ e os macrófagos, porém já foi demonstrado que as plaquetas interagem com o vírus mesmo não expressando a molécula CD4 em sua superfície celular. Estudos recentes demonstraram que as plaquetas não só interagem com o HIV como são reservatórios de vírus infectantes, capazes de transmiti-lo a outras células suscetíveis. A determinação da carga viral do HIV é considerada padrão-ouro para avaliação da eficácia do tratamento antirretroviral e detecção precoce de problemas de adesão em pessoas vivendo com HIV, sendo realizada utilizando a técnica de transcrição reversa seguida da Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (RT-qPCR) em amostras de plasma pobre em plaquetas, de acordo com o protocolo estabelecido pelo Ministério da Saúde. O objetivo do presente trabalho foi avaliar comparativamente a carga viral do HIV no plasma pobre e rico em plaquetas em amostras de sangue de trinta pacientes, sem tratamento antirretroviral, portadores do vírus e que foram atendidos pelo Laboratório de Biologia Molecular do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu. Foram utilizados dois protocolos de centrifugação para obtenção do plasma pobre e rico em plaquetas, seguidos de quantificação da carga viral através da metodologia Abbott Real Time HIV-1 (*Abbott Molecular, Illinois, USA*). Os resultados demonstraram não haver diferença estatística significativa entre os dois grupos avaliados (plasma rico e pobre em plaquetas). Esperava-se que o plasma rico em plaquetas apresentasse uma carga viral maior do que o plasma pobre, uma vez que as mesmas abrigam o vírus, porém essa diferença não foi observada. No entanto, a metodologia pode explicar estes resultados. Os resultados sugerem testar novos protocolos, como utilização de colunas de sílica para extração do RNA viral, uma vez que o protocolo atual utiliza partículas magnéticas que não são específicas para ácidos nucleicos e podem sofrer interferências de outras

moléculas presentes na amostra, e outros protocolos de centrifugação para obtenção de plasma rico em plaquetas como descritos em outros estudos.

Palavras-chave: HIV; carga viral; plasma rico em plaquetas; plasma pobre em plaquetas; plaquetas

Abstract

Schnoor, S.K. **Evaluation of the viral load of the Human Immunodeficiency Virus (HIV) in poor and platelet-rich plasma.** Dissertation (Master's in Research and Development - Medical Biotechnology) – Botucatu School of Medicine, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2021.

AIDS is a consequence of infection caused by the human immunodeficiency virus (HIV). The main target of the virus is the immune system, especially CD4 + T lymphocytes and macrophages, although platelets have been shown to interact with the virus even though not expressing the CD4 molecule on their cell surface. Recent studies have shown that platelets not only interact with HIV but are also reservoirs of infecting viruses, capable of transmitting it to other susceptible cells. Laboratory monitoring of HIV viral load is considered the gold standard to assess the effectiveness of antiretroviral treatment and early detection of adherence problems in people living with HIV, and the quantification of viral load is performed using the reverse transcription technique followed by Reaction in Polymerase Chain in real time (RT-qPCR) in platelet-poor plasma samples, according to the protocol established by the Ministry of Health. Two centrifuge protocols were used to obtain poor and platelet-rich plasma, followed by quantification of viral load using Abbott *RealTime* HIV-1 (*Abbott Molecular, Illinois, USA*) methodology. The objective of the present study was to evaluate comparatively the HIV viral load in the poor and platelet-rich plasma in blood samples from patients, without antiretroviral treatment, carrying the virus and who were attended by the Molecular Biology Laboratory of the Hospital das Clínicas, Botucatu School of Medicine. The results have shown that there is no statistically significant difference between the two groups evaluated. Platelet-rich plasma was expected to have a higher viral load than poor plasma, once they fight the virus, but this difference was not observed. Therefore, we have suggest testing new protocols, such as the use of silica columns to extract viral RNA, once the current protocol uses magnetic particles that are not specific for nucleic acids and may suffer interference from other molecules present in the sample, and other centrifugation protocols to get platelet-rich plasma as described in other studies.

Keywords: HIV; viral load; platelet-rich plasma; platelet-poor plasma; platelets

Lista de Figuras

Figura 1 - Representação esquemática da estrutura do HIV.....	12
Figura 2 - Genoma do HIV-1.....	13
Figura 3 - Ciclo de replicação do HIV-1.....	15
Figura 4 - Estágios da infecção pelo HIV e biomarcadores diagnósticos segundo Fiebig.....	17
Figura 5 - Figura esquemática da purificação de ácidos nucleicos por partículas magnéticas.....	19
Figura 6 - Receptores de superfície plaquetários e suas interações com diversos vírus.....	20
Figura 7 - Representação esquemática da quantificação da carga viral no plasma pobre (PPP) e rico (PRP) em plaquetas.....	25

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Resultados das quantificações da Carga Viral do HIV no plasma pobre e rico em plaquetas.....	27
--	----

Lista de Gráficos

Gráfico 1 - Carga viral do plasma pobre em plaquetas (PPP) e plasma rico em plaquetas (PRP), Teste de <i>Wilcoxon</i>	29
--	----

Gráfico 2 - Logaritmo decimal da carga viral no plasma pobre (PPP) e rico (PRP) em plaquetas, Teste <i>T</i> de <i>Student</i>	30
---	----

Lista de Abreviaturas e Siglas

- CCL - Ligante de quimiocina
- CCR5 – Receptor de quimiocina tipo 5
- CD4 – Grupo de diferenciação 4
- cDNA – DNA complementar
- CMV – Citomegalovírus
- CR - Receptor de complemento
- CV-HIV – Carga viral do HIV
- CXCR4 – Receptor de quimiocina tipo 4
- DNA – Ácido desoxirribonucleico
- EBV - Vírus Epstein-Barr
- EDTA - Anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético
- ELISA – Ensaio imunoenzimático
- EMCV - Vírus da encefalomiocardite
- gp – Glicoproteína
- HCV - Vírus da hepatite C
- HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana
- mL – Mililitro
- p – Proteína
- PIC – Complexo de preintegração
- PPP – Plasma pobre em plaquetas
- PRP – Plasma rico em plaquetas
- RNA – Ácido ribonucleico
- RNA_m – RNA mensageiro
- RT-qPCR - Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real precedida de transcrição reversa
- SRA – Síndrome Retroviral Aguda
- TARV – Terapia antirretroviral
- TLR - Receptor tipo *toll*

Sumário

Introdução	11
Objetivos	23
Material e Métodos	24
Análises Estatísticas.....	26
Resultados e Discussões	27
Conclusão	34
Referências.....	35
Apêndice A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	41
Anexo A – Produto gerado/tecnológico.....	43
Anexo B - Parecer Consubstanciado do CEP.....	45

INTRODUÇÃO

A aids descrita como uma doença caracterizada por sinais e sintomas resultantes da debilitação do sistema imunológico, é consequência da infecção causada pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) (ABBAS; LICHTMAN, 2005).

Os primeiros casos de aids foram descritos em 1980. Desde então 76 milhões de pessoas já foram infectadas pelo vírus e 33 milhões já morreram de doenças relacionadas à aids desde o início da epidemia. Até o final de 2019 havia em torno de 38 milhões de pessoas vivendo com o vírus no mundo, enquanto no Brasil, durante o mesmo período, havia em torno de 920.000 pessoas (WHO, 2020).

De acordo com o último boletim epidemiológico divulgado pelo Ministério da Saúde, somente em 2019 foram diagnosticados 41.909 novos casos de HIV e 37.308 casos de aids, totalizando, no período de 1980 a junho de 2020, 1.011.617 de casos de aids detectados no país, sendo um grande problema de saúde pública (BRASIL, 2020).

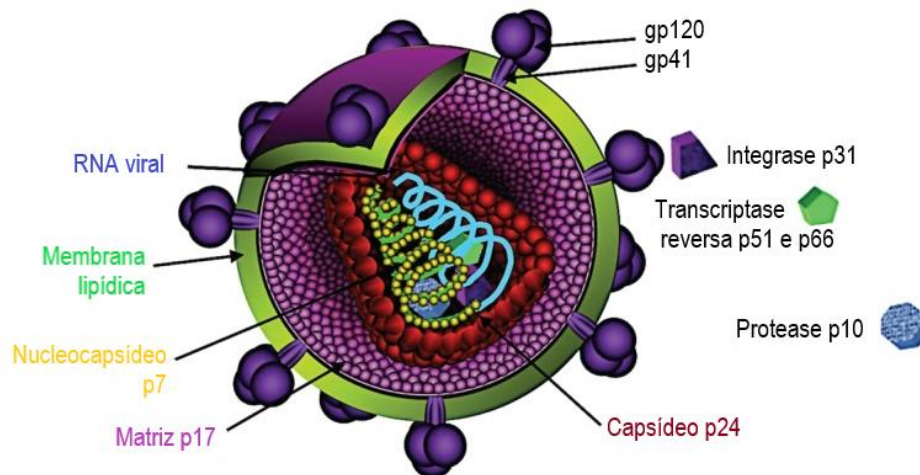
O HIV é classificado como membro da família *Retroviridae*, subfamília *Orthoretrovirinae* e gênero *Lentivirus* (ICTV, 2019). Com 100nm de diâmetro, membros dessa família possuem em seu genoma duas fitas simples idênticas de ácido ribonucleico (RNA) encapsuladas por uma camada proteica, envolta por um capsídeo em formato de cone e um envelope externo composto por uma bicamada fosfolipídica derivada da membrana plasmática da célula hospedeira (Figura 1). Os retrovírus são caracterizados pela habilidade de transcrever o seu genoma de RNA em uma molécula de ácido desoxirribonucleico (DNA) de dupla fita antes de se integrar ao genoma da célula hospedeira através de uma enzima denominada transcriptase reversa (BRASIL, 2018a e TURNER & SUMMERS, 1999).

O genoma do HIV (Figura 2) inclui três genes principais que codificam proteínas estruturais e enzimas virais: *gag*, *pol* (polimerase) e *env* (envelope). Proteínas (p) e glicoproteínas (gp) virais são identificadas por números que correspondem ao seu peso molecular em kilodaltons (kd).

O gene *gag* codifica precursores de proteínas do capsídeo, da matriz e do nucleocapsídeo. Este gene codifica a precursora p55 a partir da qual quatro proteínas estruturais são formadas: p6, p7, p17 e p24. O capsídeo que circunda o

ácido nucleico viral contém p24, a p17 se encontra na matriz, a qual reveste a superfície interna da membrana viral, a p7 se localiza no nucleocapsídeo e a p6 está envolvida na liberação da partícula viral (SEITZ, 2016).

Figura 1 – Representação esquemática da estrutura do HIV



Fonte: Adaptado de STECKBACK et al., 2013.

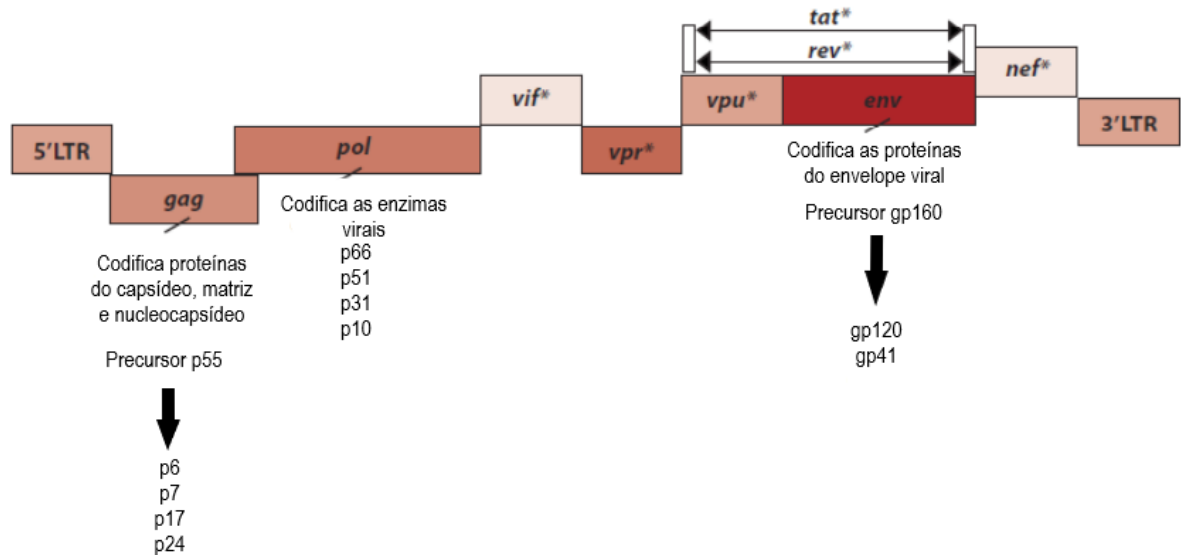
O gene estrutural *pol* codifica os precursores das enzimas transcriptase reversa, integrase e protease. As enzimas p66 e p51 são subunidades que compõem a enzima transcriptase reversa, necessária à replicação do HIV. A p31 compõe a enzima integrase que tem como função principal promover a integração do DNA viral ao genoma do hospedeiro, e a protease (p10) realiza a clivagem de precursores proteicos em unidades ativas menores após a liberação da partícula viral da célula do hospedeiro (BRASIL, 2018a).

O gene *env* codifica os precursores das glicoproteínas e proteínas transmembranas do envelope viral. A precursora gp160 é processada originando as subunidades gp120 e gp41. A gp120 se projeta na superfície viral na forma trimérica, enquanto a gp41 é uma glicoproteína transmembrana e se associa à gp120. Ambas gp120 e gp41 estão envolvidas na ligação aos receptores de HIV nas células do hospedeiro e na fusão do envelope viral com a membrana celular (BRASIL, 2018a).

Outros genes do genoma do HIV codificam produtos com função regulatória ou acessória. Dois genes regulatórios *tat* e *rev* são responsáveis pelo controle da expressão gênica em nível transcricional e pós-transcricional, respectivamente, e

quatro acessórios *nef*, *vif*, *vpr* e *vpu* são responsáveis pela modulação do ciclo viral (TURNER & SUMMERS, 1999).

Figura 2 – Genoma do HIV-1



*Genes regulatórios e acessórios. Fonte: adaptado de BRASIL, 2018a.

Foram relatados dois tipos de HIV: HIV-1 e HIV-2. O HIV-2 é encontrado, quase que, exclusivamente no Oeste da África, enquanto o HIV-1 é o tipo mais virulento e amplamente disseminado no mundo. A diferença genômica entre ambos reside na presença do gene *vpu* no HIV-1 e de *vpx* no HIV-2 (MENDONÇA; VÉRAS, 2010).

O HIV-1 é conhecido por sua extensa diversidade genética, sendo dividido em quatro grupos: grupo M (de *Major*, ou Principal), grupo O (de *Outlier*, ou fora do padrão), grupo N (não-M, não-O) e o mais recente grupo descrito P. O grupo mais comumente relatado no mundo é o grupo M. O grupo N é o menos prevalente sendo relatado apenas em Camarões; os casos do grupo O são encontrados principalmente em Camarões e no Gabão e representam 1% dos casos de HIV-1, enquanto o grupo P é o mais raro de todos, tendo sido identificado em mulheres camaronesas na França representando um total de 0,06% dos casos de HIV (BHATTI; USMAN; KANDI, 2016). Estudos filogenéticos demonstraram a existência de dez subtipos dentro do grupo M (A, B, C, D, E, F, G, H, J e K), desses subtipos

alguns se subdividem (como os subtipos A e F), além de haver ainda várias formas recombinantes circulantes e formas recombinantes complexas. Essa grande variabilidade genética tem consequências na progressão da doença, no desenvolvimento de mutações de resistência frente aos antirretrovirais, no desenvolvimento de testes de diagnósticos e carga viral, e no desenvolvimento de vacinas contra o HIV (NDJOYI-MBIGUINO et al., 2020).

As partículas do HIV ligam-se especificamente em células que expressam em sua superfície o grupo de diferenciação 4 (CD4, de *cluster of differentiation*), que possui a função de reconhecimento no sistema imunológico, sendo encontrado em linfócitos T *helper* e macrófagos, além de células dendríticas e astrócitos. A ligação ocorre por meio de ligações específicas entre a gp120 do envelope viral e o receptor CD4 na célula do hospedeiro. Essas interações são suficientes para ligação, mas não para infecção. Ao contrário de outros retrovírus, os lentivírus primatas requerem proteínas de superfície celular adicionais para promover a fusão entre o vírus e a membrana celular da célula alvo. Logo, para o HIV-1, para que ocorra a fusão das membranas é necessário a interação com co-receptores de quimiocinas, principalmente receptor de quimiocina tipo 4 (CXCR4) ou receptor de quimiocina tipo 5 (CCR5) (TURNER & SUMMERS, 1999; SEITZ, 2016).

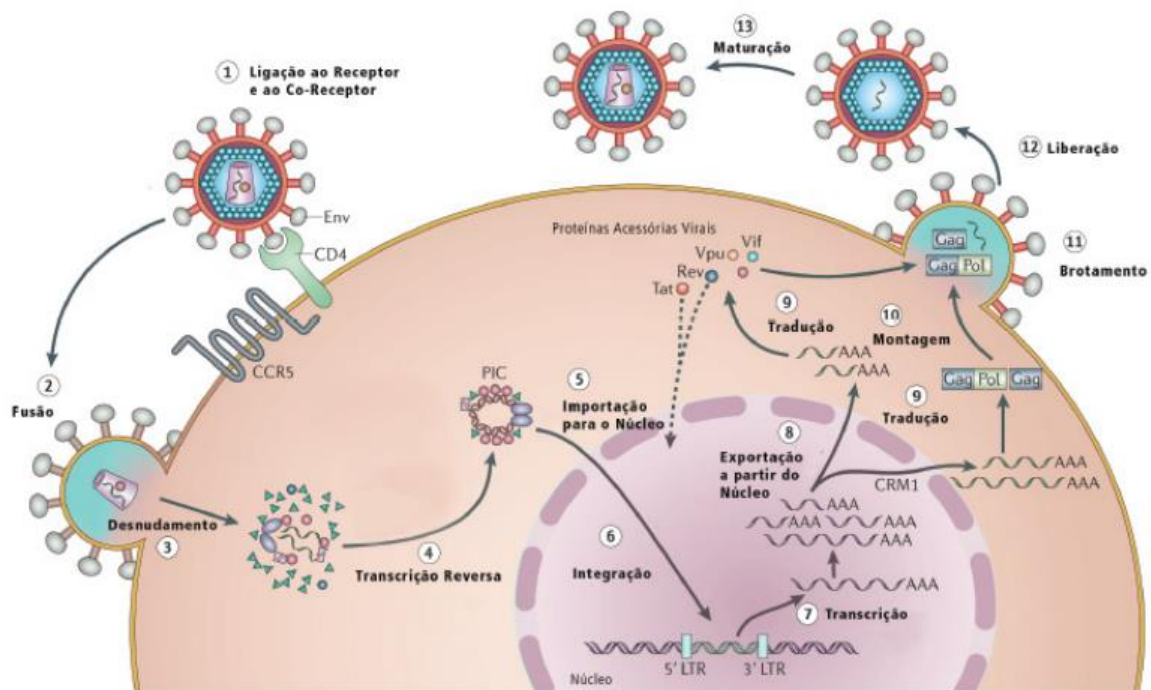
Após a ligação da gp120 (envelope viral) ao receptor da membrana da célula alvo (CD4), mudanças conformacionais acontecem na molécula gp120 ocorrendo a exposição de novos sítios de ligação, permitindo assim a interação molecular entre a gp120 e CXCR4 ou CCR5. Como resultado dessas interações, modificações conformacionais ocorrem na molécula gp41 permitindo a fusão do envelope viral com a membrana da célula alvo (FREED, 2002; COSTA, 2009). O nucleocapsídeo viral penetra no citoplasma da célula hospedeira liberando o genoma viral associado às enzimas transcriptase reversa, integrase e protease, as quais se tornam ativas, iniciando assim o processo de replicação do genoma viral (FREED, 2002).

A transcriptase reversa transcreve a fita simples de RNA viral em DNA complementar (cDNA). Paralelamente à síntese de DNA, a fita de RNA é degradada enzimaticamente pela RNase H, seguida pela conversão de cDNA de fita simples em DNA de fita dupla (DNA proviral) pela atividade da DNA polimerase dependente de DNA da TR. O DNA proviral é então associado a outras proteínas virais (integrase, transcriptase reversa, matriz e Vpr) formando um complexo de

preintegração (PIC), o qual será transportado até o núcleo da célula para ser integrado ao cromossomo celular pela atividade da integrase. A integração é um passo essencial para a replicação viral e para a persistência da infecção (COSTA, 2009; SEITZ, 2016).

A fase final de replicação do HIV inicia-se a partir da síntese de RNA mensageiro (RNAm) viral, onde haverá a síntese de RNA genômico para formação de novos vírus e RNAm que serão traduzidos no citoplasma da célula para síntese de proteínas virais. O RNA genômico e as novas proteínas virais se movem para a superfície celular para montagem de novos vírus que serão liberados da célula por brotamento onde passarão pelo processo de maturação para assim reiniciar o ciclo (COSTA, 2009) (Figura 3).

Figura 3 – Ciclo de replicação do HIV-1



Fonte: BRASIL, 2018a.

A infecção pelo HIV cursa com um amplo espectro de apresentações clínicas, desde a fase aguda até a fase avançada da doença. Em indivíduos não tratados, estima-se que o tempo médio entre a infecção e o aparecimento da doença esteja em torno de dez anos (BRASIL, 2018a).

Como em outras infecções virais agudas, a infecção pelo HIV é acompanhada por um conjunto de manifestações clínicas, denominado Síndrome Retroviral Aguda (SRA). Os principais achados clínicos de SRA são febre, cefaleia, astenia, adenopatia, faringite, exantema e mialgia. A SRA pode cursar com febre alta, sudorese e linfadenomegalia, e podem ocorrer ainda esplenomegalia, letargia, anorexia e depressão. A SRA é autolimitada e a maior parte dos sinais e sintomas desaparecem entre 3 e 4 semanas. (BRASIL, 2018b).

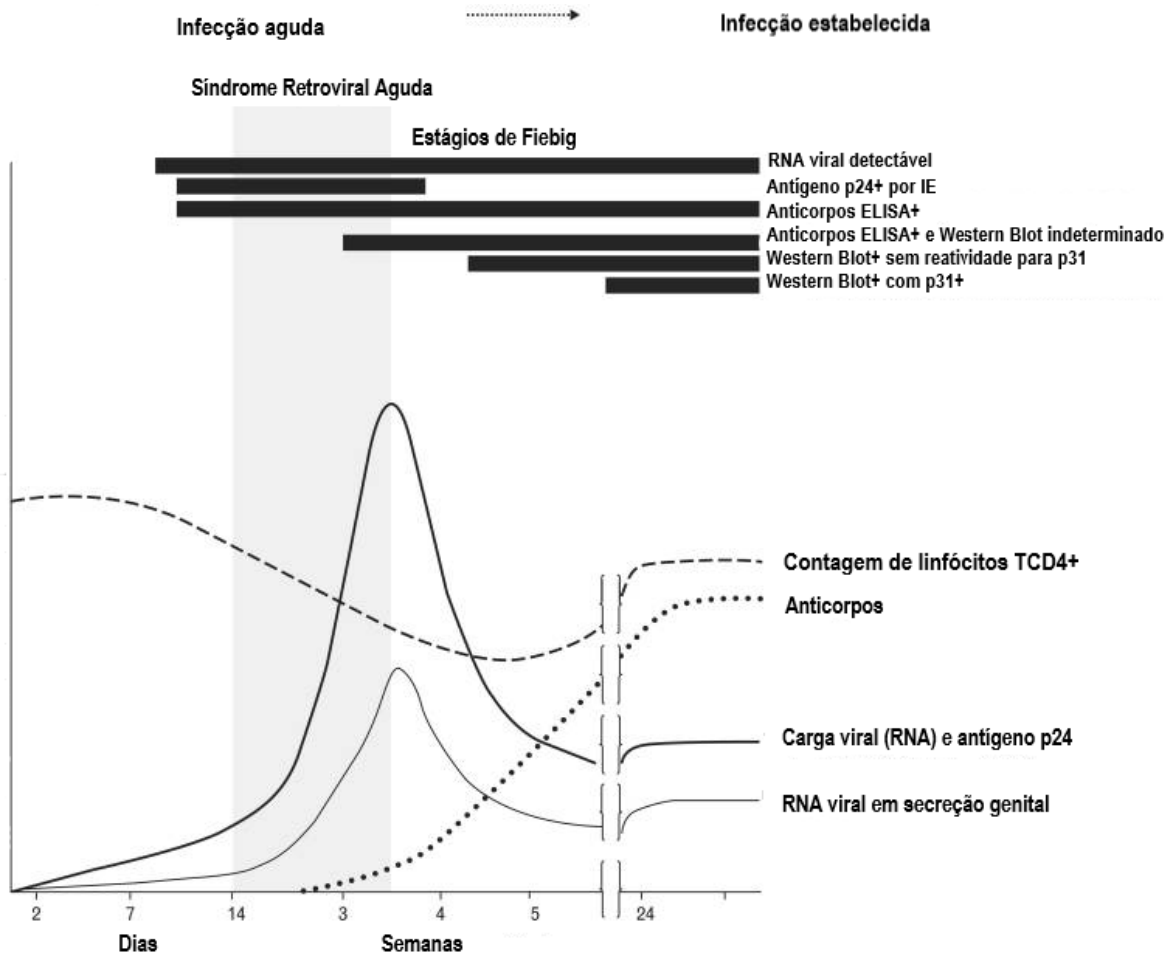
A maioria das transmissões pelo HIV-1 ocorre por meio de relações sexuais por superfícies mucosas, mas pode ocorrer por transfusão de sangue contaminado, compartilhamento de seringas, acidentes com perfurocortantes e na transmissão vertical durante a gestação, no parto e/ou na amamentação (SHAW; HUNTER, 2012).

A infecção precoce pelo HIV compreende o período desde a transmissão até o estabelecimento da infecção crônica. A infecção precoce abrange a fase eclipse (quando o HIV não é detectável no sangue) (FIEBIG et al., 2003), a infecção aguda (quando o vírus é detectável, mas a resposta imunológica – anticorpos não) e a infecção recente (quando os anticorpos são detectáveis por sensíveis testes diagnósticos, mas a resposta imune é imatura). Juntas, essas fases duram aproximadamente de 3 a 6 meses. A infecção precoce termina quando um ponto de estabilidade do vírus é alcançado, um determinante chave da subsequente progressão da doença e transmissibilidade crônica (ROSENBERG et al., 2015).

Foram definidos seis estágios de infecção precoce, baseados na maturação da viremia e na resposta imunológica, na qual podem categorizar os indivíduos contaminados dentro de um sistema proposto por Fiebig e colaboradores (2003) através de testes de diagnóstico laboratorial (ROSENBERG et al., 2015). A fase eclipse caracteriza-se pelo período aproximado de 10 dias após o contato com o vírus onde não é possível detectar seu RNA no plasma (MCMICHAEL et al., 2010). Após esse período, de acordo com a evolução da infecção, é possível detectar no sangue os seguintes marcadores: RNA do HIV-1 (Fiebig I); o antígeno viral p24 por imunoensaio (IE) (Fiebig II); anticorpos específicos por ensaio imunoenzimático ELISA (do inglês, *enzyme-linked immunosorbent assay*) (Fiebig III); e anticorpos específicos por imunoblot de proteínas, do inglês *Western Blot* (Fiebig IV: padrão de bandas indeterminado; Fiebig V: padrão de bandas de diagnóstico sem reatividade

para p31; Fiebig VI: padrão de bandas de diagnóstico com reatividade para p31) (SHAW; HUNTER, 2012) (Figura 4).

Figura 4 – Estágios da infecção pelo HIV e biomarcadores diagnósticos segundo Fiebig



Demonstração das trajetórias de contagem de linfócitos TCD4+, aparecimento de anticorpos e sintomas, bem como presença do vírus no sangue e nas secreções genitais após a infecção. As barras pretas indicam o tempo de detecção de acordo com Fiebig. Fonte: Adaptado de FACENTE et al., 2011.

A introdução da terapia antirretroviral (TARV) propiciou grandes avanços no tratamento da aids, com dramática redução da morbidade e da mortalidade associadas à doença (OLIVEIRA et al., 2011). A terapia antirretroviral é utilizada para suprimir a replicação do HIV com diferentes alvos moleculares, sendo capaz de afetar o ciclo viral em diversas fases (DE CHERCQ, 2009). Os antirretrovirais são divididos em classes: inibidores de transcriptase reversa, inibidores de protease, inibidores de entrada, inibidores de fusão e inibidores de integrase (SHAFER &

SCHAPIRO, 2008). A combinação correta destes medicamentos é essencial para a eficácia da terapia e consequente queda da carga viral.

O monitoramento laboratorial pela determinação da carga viral do HIV (CV-HIV) é considerado padrão-ouro para avaliação da eficácia da terapia antirretroviral e detecção precoce de problemas de adesão em pessoas vivendo com HIV (BRASIL, 2018a). A quantificação do RNA viral deve ser realizada a cada seis meses em pessoas vivendo com HIV em seguimento clínico, depois de oito semanas após início da terapia antirretroviral ou de novo esquema de terapia e após quatro semanas da primeira detecção do RNA viral depois de confirmação de falha virológica (BRASIL, 2018b).

No Brasil, a Rede Nacional de Laboratórios para Quantificação da Carga Viral do HIV-1 do Ministério da Saúde é responsável pela realização dos testes de determinação de carga viral através da técnica de transcrição reversa e Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (RT-qPCR) em amostras de plasma através da metodologia Abbott *RealTime* HIV-1 (*Abbott Molecular, Illinois, USA*). O método utilizado possui sensibilidade entre 40 cópias/mL (limite mínimo de detecção da técnica) e 10.000.000 cópias/mL (limite máximo de detecção da técnica) (BRASIL, 2018a).

A técnica utilizada atualmente para separação e purificação do RNA viral baseia-se em partículas magnéticas. A separação magnética é uma tecnologia emergente que utiliza magnetismo para a separação eficiente de partículas químicas ou biológicas. A aplicação desta técnica de separação foi restrita até a década de 1970, porém na última década houve um crescente interesse para purificação de compostos biológicos (ácidos nucleicos, proteínas, células, organelas celulares, entre outros) (BERENSMEIER, 2006).

O termo “magnético” significa que as partículas magnéticas podem ser facilmente removidas pela aplicação de um campo magnético, sendo uma maneira simples, rápida e eficiente de separar as partículas após a etapa de ligação ou eluição (Figura 5) (BERENSMEIER, 2006).

Após a obtenção do RNA viral no plasma, as amostras são quantificadas por RT-qPCR. Por ser uma técnica de elevada sensibilidade, acurácia com melhor custo-efetividade, a PCR em tempo real tem sido uma ferramenta aplicada em

diversas áreas biomédicas, destacando-se na pesquisa e no diagnóstico laboratorial (POLI, 2020).

Figura 5 – Figura esquemática da purificação de ácidos nucleicos por partículas magnéticas



Fonte: Adaptado de chemagen Biopolymer-Technology AG, Alemanha

A obtenção do plasma é realizada através da centrifugação do sangue total em tubo contendo anticoagulante. Dependendo da velocidade, do tempo de centrifugação, do anticoagulante empregado, do sistema de coleta e quantidade de sangue (EFEUGLU; AKÇAY; ERTÜRK, 2004), o plasma pode ser classificado como pobre ou rico em plaquetas. POLI e colaboradores (2020) padronizaram e validaram dois protocolos de centrifugação para plasma pobre e rico em plaquetas para quantificação da carga viral do vírus da hepatite B.

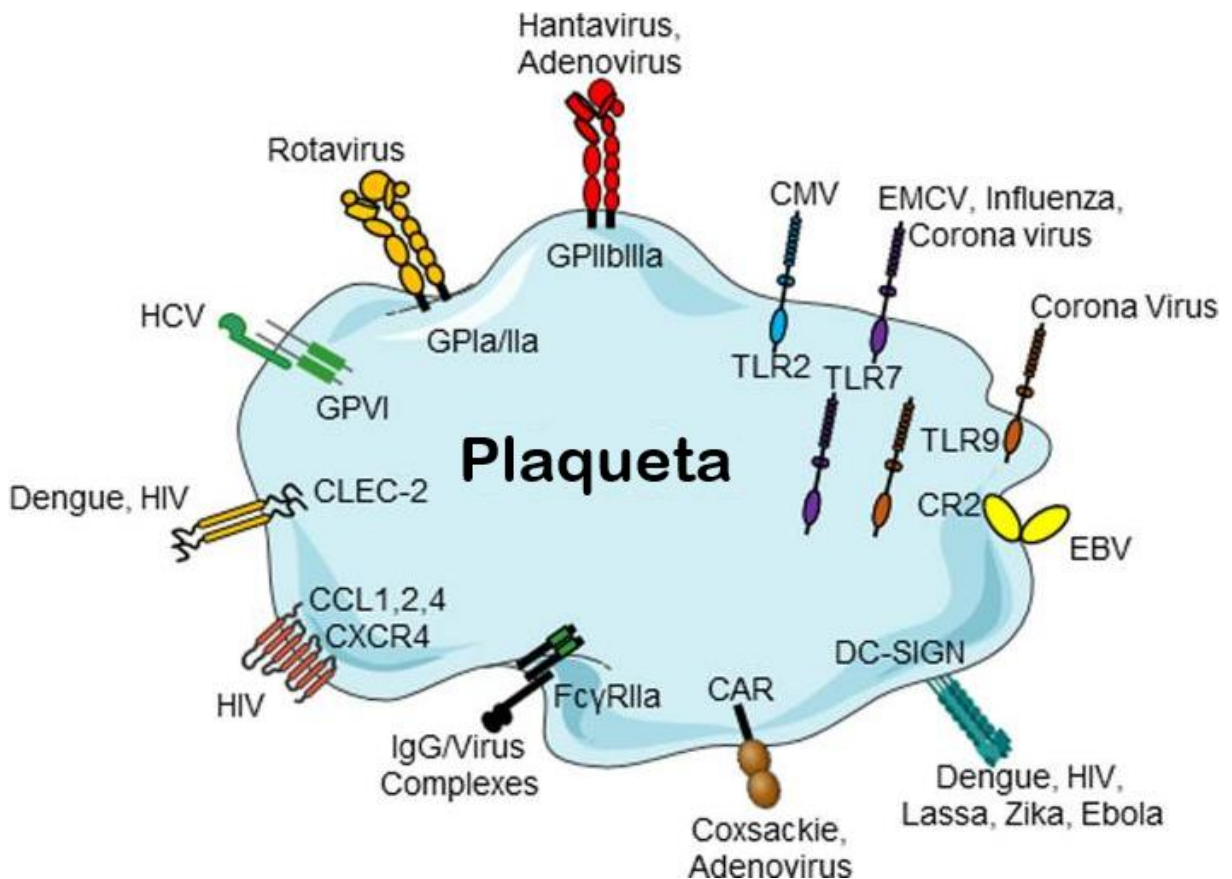
Plaquetas são fragmentos celulares anucleados produzidos a partir de megacariócitos presentes na medula óssea e são peças-chave na hemostasia. São o segundo grupo celular mais abundante no sangue periférico respondendo rapidamente ao dano vascular e atuam na atração de leucócitos aos locais de lesão. Além disso, as plaquetas desempenham outras funções imunológicas não-homeostáticas (MAOUIA et al., 2020). Do total de plaquetas presentes no organismo humano, 70% se encontram na circulação e 30% no baço, permanecendo na circulação entre 7 e 10 dias, quando são retiradas pelas células reticuloendoteliais do baço e do fígado (CASTRO et al., 2006).

Já foi demonstrado que as plaquetas contribuem para a resposta imunológica e podem internalizar patógenos virais e não virais. *In vitro*, as plaquetas interagem e/ou internalizam o HIV, o vírus da dengue, o vírus da hepatite C, o vírus influenza, bactérias como *Staphylococcus aureus*, e outros patógenos, uma vez que

expressam uma gama de moléculas em sua superfície (Figura 6) (REAL et al., 2020; MAOUIA et al., 2020).

Geralmente as infecções virais coincidem com a ativação plaquetária. As respostas inflamatórias do hospedeiro resultam na liberação de mediadores de ativação plaquetários e em um ambiente pró-oxidativo e pró-coagulante, que favorece a ativação plaquetária. No entanto, a ativação plaquetária induzida por vírus não apenas modula a contagem de plaquetas, mas também molda a resposta imune. Foi relatado que as plaquetas contribuem direta ou indiretamente para a persistência do vírus (ASSINGER, 2014).

Figura 6 - Receptores de superfície plaquetários e suas interações com diversos vírus



CMV: citomegalovírus; CCL: ligante de quimiocina CR: receptor de complemento; CXCR4: receptor de quimiocina tipo 4; EBV: vírus Epstein-Barr; EMCV: vírus da encefalomiocardite; HCV: vírus da hepatite C; GP: glicoproteína; TLR: receptor tipo toll. Fonte: Adaptado de MAOUIA et al., 2020.

Vários estudos demonstraram *in vitro* a interação direta das plaquetas (LEE et al., 1998;) e dos megacariócitos (ZUCKER-FRANKLIN & CAO, 1989) com o HIV. Enquanto os megacariócitos expressam o receptor CD4 em sua superfície facilitando a entrada do vírus, as plaquetas não possuem esse receptor em sua superfície celular, porém possuem outros receptores capazes de interagir com o HIV como CLEC-2 (receptor lectina C tipo 2), DC-SIGN (*Dendritic cell – specific ICAM3 grabbing non-integrin*), CXCR4, CCL 1,2 e 4. (CHABERT et al., 2015; MAOUIA et al., 2020).

GROTTO e colaboradores (2016) demonstraram a presença de carga viral do HIV e do vírus da hepatite C (HCV) em plaquetas expostas previamente aos vírus *in vitro*, indicando a existência de interação entre as plaquetas e esses vírus. Além disso observou-se que a carga viral nas plaquetas era maior naquelas expostas ao HIV do que naquelas expostas ao HCV, sugerindo que a ligação entre as plaquetas e o HIV poderia ser mais eficiente do que a interação com o HCV.

BANERJEE e colaboradores (2020) demonstraram que as plaquetas utilizam dinamina e proteína de membrana -3 associada à vesícula (VAMP-3) para captar e traficar o HIV intracelularmente. Parece que o HIV é traficado por meio de endossomos causando ativação plaquetária e formação de agregados plaquetários/leucocitários *in vitro*, enquanto *in vivo* a infecção leva a agregados de leucócitos e plaquetas. Esses dados sugerem que as plaquetas possuem um mecanismo na qual elas coletam amostras da circulação e respondem a potenciais patógenos que elas absorvem, agindo como sentinelas infecciosas.

Um estudo recente quantificou a carga viral do HIV no *pellet* de plaquetas de pessoas durante terapia antirretroviral, 15 pessoas apresentavam carga viral detectável no sangue, enquanto 27 apresentavam carga viral abaixo do limite de detecção. 10 dentre as 27 pessoas com carga viral suprimida apresentaram em torno de 10 vezes mais RNA do HIV em suas plaquetas do que o outro grupo que apresentava carga viral detectável no sangue. Ensaio de marcação e fluorescência confirmaram que o RNA viral e a p24 estavam presentes nas plaquetas, sugerindo que elas continham vírus intactos e, ainda foi demonstrado *in vitro* que elas eram capazes de transferir o vírus aos macrófagos durante o processo de depuração das mesmas. Além disso, pessoas com plaquetas contendo HIV apresentavam

contagem de linfócitos TCD4+ mais baixos do que aquelas com plaquetas HIV negativas, sugerindo uma ligação com a progressão da doença (REAL et al., 2020).

Outro estudo recente avaliou a presença do vírus em plaquetas isoladas de pessoas recentemente infectadas antes e 3 meses após o início da terapia antirretroviral (TARV). Em 100% dos indivíduos com infecção aguda sem a TARV foram detectados HIV nas plaquetas, e após 3 meses do início da TARV a porcentagem de plaquetas HIV positivas caiu significativamente em todos os participantes do estudo. A porcentagem de plaquetas HIV positivas correlacionou-se positivamente com a carga viral em plasma pobre em plaquetas, mas não com a contagem de linfócitos TCD4+. Através de ensaios de marcação e fluorescência, concluiu-se que as plaquetas são capazes de promover a disseminação do HIV durante o estágio agudo da infecção, por abrigar vírus infecciosos que podem transmitir a infecção para outras células suscetíveis (SIMPSON et al., 2020).

No contexto descrito acima, os estudos demonstraram não somente a existência de interação entre as plaquetas e o HIV, mas também a capacidade das mesmas abrigarem o vírus e transmiti-lo a outras células. Logo, o presente estudo visa avaliar a diferença entre a carga viral no plasma rico e pobre em plaquetas, visto que atualmente o protocolo instituído pelo Ministério da Saúde na Rede Nacional de Carga Viral do HIV-1 quantifica o RNA extraído no plasma pobre em plaquetas. Pode-se prospectar que, se a hipótese proposta por este estudo for verdadeira (a carga viral do plasma rico em plaquetas for maior do que daquela realizada atualmente – no plasma pobre em plaquetas), os resultados podem sugerir uma modificação/revisão do processo para determinação da carga viral do HIV, uma vez que as plaquetas desempenham importante papel na infecção causada pelo HIV.

OBJETIVOS

- ✓ Avaliar a carga viral do HIV em plasma pobre em plaquetas comparativamente ao plasma rico em plaquetas em amostras excedentes de sangue de pacientes portadores de HIV.
- ✓ Sugerir modificação/revisão do protocolo atual de centrifugação à área de interesse do Ministério da Saúde através de Nota Técnica.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu (número do parecer: 3.402.940).

Foram incluídos nesse estudo amostras excedente de sangue de 30 pacientes portadores de HIV atendidos pelo Serviço de Ambulatórios de Infectologia “Domingos Alves Meira” em Botucatu-SP. As amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Biologia Molecular do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, ponto executor da Rede Nacional de Laboratórios para Quantificação da Carga Viral do HIV, para execução do exame de carga viral do HIV mediante solicitação médica.

Devido a pandemia global causada pelo Sars-CoV-2 no início de 2020, os atendimentos realizados pelo Serviço de Ambulatórios de Infectologia “Domingos Alves Meira” foram suspensos/reduzidos significativamente, o que impactou no *n* amostral desse estudo.

Os critérios de seleção das amostras dos pacientes foram:

- ✓ Pacientes maiores de 18 anos, exceto gestantes;
- ✓ Sem uso de terapia antirretroviral, de preferência que estivessem fazendo o primeiro exame de quantificação de carga viral;
- ✓ Com resultado da quantificação da carga viral da rotina acima de 1000 cópias/mL. Este critério foi estabelecido a fim de se garantir quantidade razoável de vírus para comparação entre os protocolos utilizados.

Além dos critérios descritos acima, foi aplicado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido por escrito (apêndice A) aos pacientes que mantiveram seu acompanhamento no Serviço de Ambulatório e somente foram utilizadas as amostras dos que aceitaram fazer parte desse estudo.

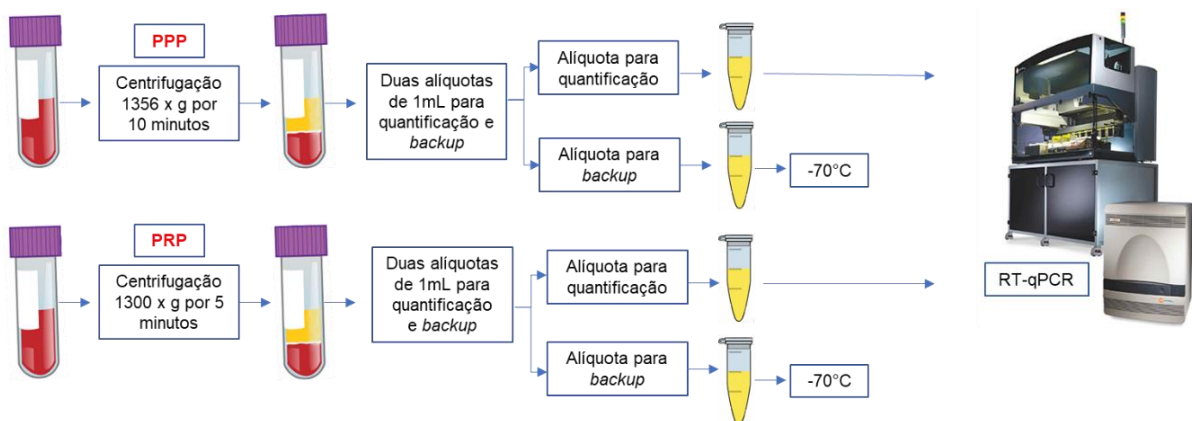
As amostras de sangue total foram coletadas em dois tubos contendo o anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), conforme rotina padronizada pelo Ministério da Saúde. Um tubo foi centrifugado por 10 minutos à 1356 x g, padrão utilizado na rotina para quantificação da carga viral do HIV (CV-HIV) pelo Laboratório de Biologia Molecular do Hospital das Clínicas da Faculdade de

Medicina de Botucatu para obtenção de plasma, sendo este caracterizado como pobre em plaquetas (PPP). O segundo tubo foi processado utilizando o protocolo estabelecido por POLI e colaboradores (2020), onde foi padronizado e validado a centrifugação por 5 minutos à 1300 x g para obtenção de plasma rico em plaquetas (PRP).

Após a centrifugação, cada amostra foi dividida em duas alíquotas de 1mL. Para a centrifugação de 1356 x g por 10 minutos, uma alíquota foi utilizada para quantificação da CV-HIV e a outra foi armazenada como *backup* à -70°C. Para a centrifugação à 1300 x g por 5 minutos, as duas alíquotas foram armazenadas à -70°C para posterior quantificação e *backup*.

Depois da obtenção dos plasmas rico e pobre em plaquetas, os mesmos foram submetidos à determinação da CV-HIV utilizando a metodologia Abbott RealTime HIV-1 no equipamento *m2000rt* (Abbott Molecular, Illinois, USA), seguindo as especificações do fabricante (Figura 7). As alíquotas de PRP somente foram submetidas à quantificação após verificação do resultado da quantificação CV-HIV em PPP e este apresentar resultado superior a 1000 cópias/mL, conforme critério definido.

Figura 7 – Representação esquemática da quantificação da carga viral no plasma pobre (PPP) e rico (PRP) em plaquetas



Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os testes estatísticos foram aplicados utilizando o software GraphPad Prism versão 9.0 (*GraphPad Prism Software, Inc., California, USA*).

Os dados foram inicialmente submetidos aos testes de normalidade *D'Agostino & Pearson*, *Shapiro-Wilk* e *Kolmogorov-Smirnov*. Em seguida foi aplicado o teste de *Wilcoxon* para os dados de carga viral do “plasma pobre em plaquetas” comparativamente ao “plasma rico em plaquetas” e o Teste *T* de *Student* para os dados de logaritmo do “plasma pobre em plaquetas” comparativamente ao “plasma rico em plaquetas”. Para todas as análises estatísticas foi considerado o nível de significância de $p\text{-valor} < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados das quantificações do RNA do HIV em plasma pobre (PPP) e rico (PRP) em plaquetas estão representados na Tabela 1. A própria plataforma Abbott *RealTime* HIV-1 exibe os resultados no formato carga viral em cópias/mL e na escala logaritmo decimal (log).

Tabela 1 - Resultados das quantificações da Carga viral do HIV no plasma pobre e rico em plaquetas

ID	CV_PPP	Log_PPP	CV_PRP	Log_PRP
1	141.547 cópias/mL	5,15	198.792 cópias/mL	5,30
2	91.643 cópias/mL	4,96	67.507 cópias/mL	4,83
3	8.054 cópias/mL	3,91	5.657 cópias/mL	3,75
4	2.849 cópias/mL	3,45	3.219 cópias/mL	3,51
5	1.494.686 cópias/mL	6,17	1.108.536 cópias/mL	6,04
6	5.813 cópias/mL	3,76	6.796 cópias/mL	3,83
7	25.041 cópias/mL	4,40	20.704 cópias/mL	4,32
8	85.625 cópias/mL	4,93	59.334 cópias/mL	4,77
9	6.983 cópias/mL	3,84	7.031 cópias/mL	3,85
10	26.083 cópias/mL	4,42	69.144 cópias/mL	4,84
11	49.391 cópias/mL	4,69	43.740 cópias/mL	4,64
12	29.658 cópias/mL	4,47	30.704 cópias/mL	4,49
13	1.941 cópias/mL	3,29	1.576 cópias/mL	3,20
14	19.970 cópias/mL	4,30	17.872 cópias/mL	4,25
15	3.804 cópias/mL	3,58	4.192 cópias/mL	3,62
16	319.350 cópias/mL	5,50	337.451 cópias/mL	5,53
17	106.023 cópias/mL	5,03	98.962 cópias/mL	5,00

ID	CV_PPP	Log_PPP	CV_PRP	Log_PRP
18	1.720 cópias/mL	3,24	2.016 cópias/mL	3,30
19	70.117 cópias/mL	4,85	41.530 cópias/mL	4,62
20	69.157 cópias/mL	4,84	79.926 cópias/mL	4,90
21	15.533 cópias/mL	4,19	15.305 cópias/mL	4,18
22	26.713 cópias/mL	4,43	31.024 cópias/mL	4,49
23	53.263 cópias/mL	4,73	78.861 cópias/mL	4,90
24	2.767 cópias/mL	3,44	2.971 cópias/mL	3,47
25	16.549 cópias/mL	4,22	28.769 cópias/mL	4,46
26	630.691 cópias/mL	5,80	389.945 cópias/mL	5,59
27	9.160 cópias/mL	3,96	8.312 cópias/mL	3,92
28	104.713 cópias/mL	5,02	84.460 cópias/mL	4,93
29	16.169 cópias/mL	4,21	10.092 cópias/mL	4,00
30	17.677 cópias/mL	4,25	13.478 cópias/mL	4,13

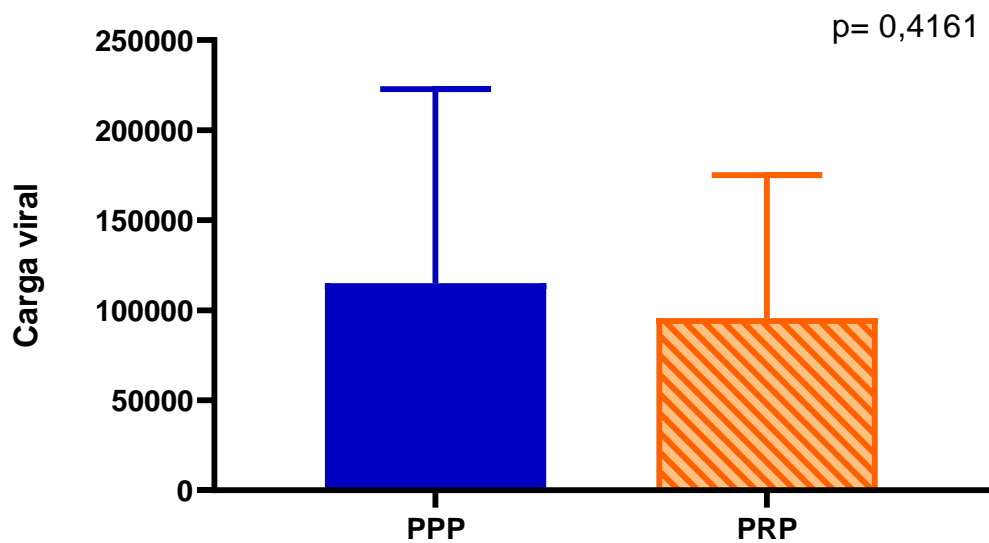
ID: identificação da amostra; CV: carga viral; Log: logaritmo decimal da carga viral; PPP: plasma pobre em plaquetas; PRP: plasma rico em plaquetas. Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

Foi realizado o teste de normalidade dos dados para definição do teste estatístico a ser utilizado. Quando o valor da carga viral em cópias/mL foi analisado no teste de normalidade verificou-se que a distribuição dos dados não era normal e o teste de *Wilcoxon* foi aplicado nas amostras de carga viral em plasma pobre em plaquetas (PPP) comparativamente às amostras de carga viral em plasma rico em plaquetas (PRP). Não houve diferença significativa entre esses dois grupos avaliados, sendo o p-valor de 0,4161 (Gráfico 1).

O mesmo procedimento foi realizado com os dados de logaritmo da carga viral em plasma pobre e rico em plaquetas. Neste caso houve distribuição normal dos dados, e logo foi aplicado o teste *T* de *Student* para amostras pareadas. Neste caso também não houve diferença significativa entre os dois grupos avaliados, sendo o p-valor de 0,6349 (Gráfico 2). Avaliando os resultados de logaritmo decimal não foi observado diferença maior que 0,5 log entre as amostras dos pacientes

estudados, o que seria considerado significativo na decisão clínica. Estudos moleculares que realizam análises comparativas da quantificação de ácidos nucleicos em amostras biológicas, consideram diferenças inferiores a 0,5 log sem significado clínico relevante para acompanhamento da eficiência do tratamento (BALERIOIA et al., 2011; BATTISTAM, 2019).

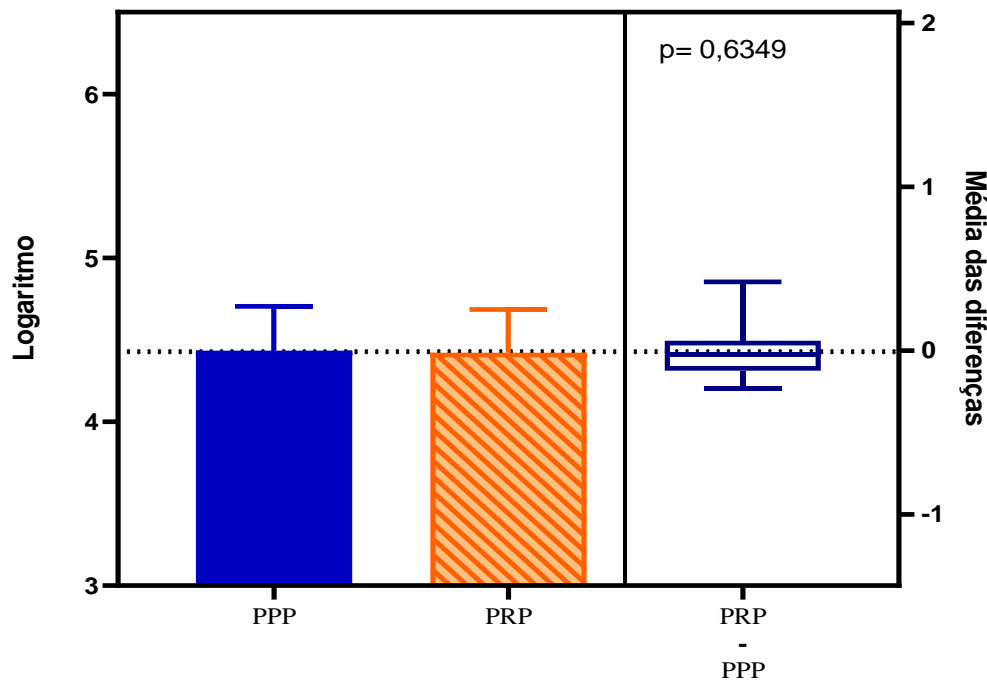
Gráfico 1 - Carga viral do plasma pobre em plaquetas (PPP) e plasma rico em plaquetas (PRP), Teste de *Wilcoxon*.



Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

Os resultados obtidos corroboram com o estudo de BATTISTAM e colaboradores (2019) onde comparou-se a carga viral do vírus da hepatite C (HCV) em plasma pobre e rico em plaquetas de 20 pacientes. No estudo de BATTISTAM, o protocolo de centrifugação para obtenção do plasma rico em plaquetas foi de 15 minutos a 1008 x g (protocolo do Ministério da Saúde) e para o plasma pobre em plaquetas foram realizadas duas centrifugações, a primeira a 1175 x g por 3 minutos, onde o plasma foi transferido para um novo tubo e em seguida foi centrifugado novamente a 2845 x g por 5 minutos, sendo então realizada a quantificação da carga viral do HCV no sobrenadante. Assim como no nosso estudo, todos os pacientes avaliados possuíam resultado de carga viral do HCV no exame de rotina acima de 3,0 log.

Gráfico 2 - Logaritmo decimal da carga viral no plasma pobre (PPP) e rico (PRP) em plaquetas, Teste *T* de Student.



Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

No estudo de POLI e colaboradores (2020) foi feita a comparação da carga viral do vírus da hepatite B (HBV) entre o plasma pobre e rico em plaquetas em amostras de 12 pacientes. Os protocolos de centrifugação utilizados no nosso estudo foram padronizados e validados pelo estudo de POLI e colaboradores. Os resultados obtidos por POLI diferiram do nosso estudo, uma vez que foi observado diferença estatística significativa entre os grupos avaliados. Porém a carga viral do HBV foi maior no plasma pobre do que no plasma rico em plaquetas, contrariando a hipótese inicial, onde esperava-se que o plasma rico apresentasse carga viral maior do que no plasma pobre, devido a interação do vírus com as plaquetas.

Nos dois estudos descritos acima, apesar dos vírus estudados serem distintos do HIV, a metodologia utilizada para a quantificação das cargas virais apresenta o mesmo princípio do presente estudo, ou seja, se baseiam na quantificação da carga viral em plasma pobre em plaquetas. Além disso, a metodologia de extração e purificação dos ácidos nucleicos virais, tanto DNA quanto RNA, se baseiam em partículas magnéticas.

A metodologia de extração de RNA utilizada neste estudo permite que as partículas magnéticas, que são carregadas positivamente, se liguem ao RNA que possui carga negativa, porém as partículas não são específicas para ácidos nucleicos, ou seja, a ligação pode ocorrer com outros componentes presentes na amostra que também possuam carga negativa, podendo haver uma competição entre esses compostos e o RNA viral. Assim sendo, a eficiência do método dependerá da concentração desses interferentes e da capacidade de saturação das partículas magnéticas.

Um estudo comparou duas metodologias de purificação de ácidos nucleicos em amostras de fezes para detecção de *Clostridium difficile* (DNA) e rotavírus (RNA) para amplificação por PCR em tempo real. Um kit utilizava partículas magnéticas e outro colunas de sílica para extração e purificação do DNA e RNA alvo. Ambos resultados para quantificação dos ácidos nucleicos foram satisfatórios em relação ao método padrão utilizado (enzima imunoensaio), porém observou-se que a metodologia que empregava partículas magnéticas sofria mais interferências de substâncias presentes na amostra, pela capacidade do contaminante se ligar às partículas, do que as colunas, uma vez que as colunas filtram os contaminantes (YOON et al., 2016).

POLI e colaboradores (2020) demonstraram que a metodologia de extração por colunas de sílica possui melhor eficiência quando comparada com a metodologia de partículas magnéticas em plasma pobre e rico em plaquetas para quantificação do vírus da hepatite B, uma vez que são específicas para ácidos nucleicos.

A metodologia de extração através de partículas magnéticas é vantajosa principalmente em relação ao custo e a necessidade de manipulação manual, porém não é específica para extração de ácido nucleicos. Logo, realizar a extração do RNA viral utilizando colunas de sílica permitiria avaliar se o uso das mesmas impactaria nos resultados obtidos.

No estudo realizado por REAL et al. (2020) onde foi quantificado a carga viral do HIV no *pellet* de plaquetas, as plaquetas foram obtidas através do plasma rico em plaquetas. O plasma rico foi obtido após centrifugação do sangue total por 10 minutos a 160 x g em temperatura de 22°C. No nosso estudo a centrifugação do sangue total para obtenção do plasma rico em plaquetas foi de 1300 x g por 5

minutos em temperatura ambiente. No estudo de SIMPSON et al. (2020), onde a quantificação da carga viral do HIV foi realizada no *pellet* de plaquetas, as plaquetas foram obtidas do plasma rico através da centrifugação do sangue total a 250 x g por 15 minutos.

Os nossos resultados não demonstraram significativa diferença estatística na comparação da carga viral do HIV entre o plasma pobre e rico em plaquetas, porém existe uma diferença a ser considerada em relação ao protocolo de centrifugação utilizado neste trabalho e nos estudos de REAL et al. e SIMPSON et al. Apesar da quantificação da carga viral do HIV ter sido realizada no *pellet* de plaquetas e não no plasma rico em plaquetas, uma nova comparação entre a carga viral no plasma pobre e rico em plaquetas utilizando os protocolos de centrifugação desses pesquisadores seria oportuna para avaliar se essa diferença é relevante ou não, uma vez que não há estudos que realizaram esta análise.

Seria oportuno ampliar os critérios estabelecidos por esse estudo para quantificação da carga viral como foi feito no estudo de REAL e colaboradores (2020), onde foram avaliados pacientes com carga viral detectável e não detectável no plasma pobre em plaquetas. No presente estudo um dos critérios para a realização da quantificação da carga viral no plasma rico em plaquetas era que o resultado da quantificação no plasma pobre apresentasse carga viral acima de 1000 cópias/mL, pois acreditava-se que a diferença seria maior quando comparada ao plasma rico em plaquetas. No estudo de REAL et al, as quantificações da carga viral nas plaquetas apresentaram resultados significativos principalmente nas amostras que apresentavam carga viral abaixo do nível de detecção no sangue, reforçando a importância das plaquetas na internalização do HIV, como reservatórios do vírus ativo e no possível envolvimento na progressão da doença como demonstrado na literatura.

Os protocolos de centrifugação avaliados no plasma pobre e rico em plaquetas (1356 x g por 10 minutos e 1300 x g por 5 minutos, respectivamente) não mostraram diferença estatística significativa na carga viral, logo a utilização do protocolo utilizado por esse estudo pela Rede Nacional de Laboratórios para Quantificação da Carga Viral do HIV do Ministério da Saúde seria oportuna a fim de se otimizar o tempo utilizado para obtenção do plasma, uma vez que os resultados

obtidos nas comparações em pacientes com resultado de carga viral acima de 1000 cópias/mL não modifica a interpretação clínica.

CONCLUSÃO

Esse estudo demonstrou que o protocolo estabelecido pelo Ministério da Saúde para quantificação da carga viral do HIV em plasma pobre em plaquetas não apresentou diferença estatística significativa em relação à quantificação da carga viral no plasma rico em plaquetas.

Alterar o protocolo de centrifugação vigente permitiria uma otimização do tempo para obtenção do plasma, uma vez que não há prejuízo no resultado da quantificação da carga viral para o monitoramento dos pacientes com carga viral acima de 1000 cópias/mL.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Imunologia Celular e Molecular**, 2005.

ABBOTT *RealTime* HIV-1 disponível em: <https://csvlab.com.br/HIV-1-Bula-Abbott.pdf>

ASSINGER, A. **Platelets and infection - An emerging role of platelets in viral infection***Frontiers in Immunology*, 2014.

BALERIOLA, C. et al. Stability of hepatitis C virus, HIV, and hepatitis B virus nucleic acids in plasma samples after long-term storage at -20°C and -70°C. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 9, p. 3163–3167, 2011.

BANERJEE, M. et al. Platelets Endocytose Viral Particles and Are Activated via TLR (Toll-Like Receptor) Signaling. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, n. July, p. 1635–1650, 2020.

BATTISTAM, D.C. **Avaliação da carga viral do vírus da hepatite C (VHC) em plasma pobre em plaquetas**. Dissertação (Mestrado em Pesquisa e Desenvolvimento – Biotecnologia Médica) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, 2019

BERENSMEIER, S. Magnetic particles for the separation and purification of nucleic acids. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 73, n. 3, p. 495-504, 2006

BHATTI, A. B.; USMAN, M.; KANDI, V. Current Scenario of HIV/AIDS, Treatment Options, and Major Challenges with Compliance to Antiretroviral Therapy. **Cureus**, v. 8, n. 3, p. 1–12, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das Doenças Sexualmente Transmissíveis, do HIV/Aids e das Hepatites Virais. **Manual técnico para o diagnóstico da infecção pelo HIV em adultos e crianças** – 4. ed. – Brasília : Ministério da Saúde, 2018a. Disponível em: < <http://www.aids.gov.br/pt-br/node/57787>> Acesso em: 26 fev. 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das Infecções Sexualmente Transmissíveis, do HIV/Aids e das Hepatites Virais. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Manejo da Infecção pelo HIV em Adultos** Brasília : Ministério da Saúde, 2018b.

Disponível em: <http://www.aids.gov.br/pt-br/pub/2013/protocolo-clinico-e-diretrizes-terapeuticas-para-manejo-da-infeccao-pelo-hiv-em-adultos> Acesso em: 03 set. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis – DCCI. **Boletim Epidemiológico HIV/AIDS 2020** Brasília : Ministério da Saúde, Dezembro 2020. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/pt-br/pub/2020/boletim-epidemiologico-hivaids-2020> Acesso em: 01 dez de 2020.

CARR, J.K. et al. Reference sequences representing the principal genetic diversity of HIV1 in the Pandemic. *Analyses: HIV-1 Genetic Subtypes*, v. III, p. 10-9,1998

CASTRO, H. C. et al. Plaquetas: ainda um alvo terapêutico. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, Rio de Janeiro, v. 42, n. 5, p. 321-332, Oct. 2006.

CHABERT, A. et al. Human platelets and their capacity of binding viruses: Meaning and challenges? **BMC Immunology**, v. 16, n. 1, p. 1–8, 2015.

CLAPHAM, P.R., WEISS, R.A. Immunodeficiency viruses. Spoilt for choice of co-receptors. **Nature** 1997;388(6639):230-1

DE CLERQ, E. The history of antiretrovirals: key discoveries over the past 25 years. **Rev. Med. Virol.**, v.19, p.287–299, 2009.

COSTA, I. B. Epidemiologia Molecular Do Vírus Da Imunodeficiência Humana 1 (Hiv-1) Em Mulheres (Mães E Grávidas) Dos Estados Do Acre E Tocantins , Brasil. v. 1, 2009.

EFEUGLU, C.; AKÇAY, Y. D.; ERTÜRK, S. A modified method for preparing platelet-rich plasma: An experimental study. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 62, n. 11, p. 1403–1407, 2004.

FACENTE, S. N. et al. Performance of risk-based criteria for targeting acute hiv screening in san francisco. **PLoS ONE**, v. 6, n. 7, 2011.

FIEBIG, E. W. et al. Dynamics of HIV viremia and antibody seroconversion in plasma donors: Implications for diagnosis and staging of primary HIV infection. **Aids**, v. 17, n. 13, p. 1871–1879, 2003.

FLAUJAC, C., BOUKOUR, S., CRAMER-BORDÉ, E. Platelets and viruses: GROTO, R.M.T et al. Human platelets antigens influence the viral load of platelets after the interaction of the platelets with HCV and HIV in vitro. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 49(4), p. 491-493, 2016

FREED, E. O. HIV-1 Replication. v. 26, n. November 2001, p. 13–33, 2002.

GROTO, R.M.T., PARDINI, M.I.C.M. Biologia molecular do HIV-1 e genética da resistência humana à AIDS. **Arq Ciênc Saúde**, v. 13(3), 2006

HU, D.J. et al The Emerging Genetic Diversity of HIV The Importance of Global Surveillance for Diagnostics, Research, and Prevention. **Jama**, v. 275(3), p. 210-216, 1996

ICTV (INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES), 2019. Disponível em: https://talk.ictvonline.org/taxonomy/p/taxonomy-history?taxnode_id=201905030 Acesso em: 05/12/2020

LEE, T.H. *et al*/ Distribution of HIV type 1 (HIV-1) in blood components: detection and significance of high levels of HIV-1 associated with platelets. **Transfusion**, v. 38, p. 580-588, 1998

MAOUIA, A., REBETZ, J., KAPUR, R., SEMPLE, J.W. The Immune Nature of Platelets Revisited. **Transfus Med Rev**, v. 34, n. 4, p. 209-220, 2020.

MCMICHAEL, A. J. et al. The immune response during acute HIV-1 infection: Clues for vaccine development. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, n. 1, p. 11–23, 2010.

MENDONÇA, N.; VÉRAS, C. História Evolutiva do HIV-1 no Brasil História Evolutiva do HIV-1 no Brasil. p. 1–60, 2010.

NDJOYI-MBIGUINO, A. et al Chapter 10 - Human Immunodeficiency Virus: A Brief Review. **Emerging and Reemerging Viral Pathogens**, Academic Press, 2020, vol.1 p.183-200

OLIVEIRA, O.C.A., OLIVEIRA, R.A., SOUZA, L.R. Impacto do tratamento antirretroviral na ocorrência de macrocitose em pacientes com HIV/AIDS do município de Maringá, Estado do Paraná. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**, v. 44, n. 1, p. 35-39, 2011

PADOVANI, J.L. et al. In vitro detection of hepatitis C virus in platelets from uninfected individuals exposed to the virus. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**, v. 46, n. 2, p. 154-155, 2013

PLANTIER, J.C., LEOZ, M., DICKERSON, J. et al. A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. **Nat Med** 15, p. 871–872 (2009). <https://doi.org/10.1038/nm.2016>.

POLI, G.B. **Avaliação da carga viral do Vírus da Hepatite B em plasma pobre em plaquetas**. Dissertação (Mestrado em Pesquisa e Desenvolvimento -Biotecnologia Médica) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, 2020.

REAL, F. et al. Platelets from HIV-infected individuals on antiretroviral drug therapy with poor CD4+ T cell recovery can harbor replication-competent HIV despite viral suppression. **Science Translational Medicine**, v. 12, n. 535, p. 1–12, 2020.

ROSENBERG, N. E. et al. How can we better identify early HIV infections? **Current Opinion in HIV and AIDS**, v. 10, n. 1, p. 61–68, 2015.

SEITZ, R. Human Immunodeficiency Virus (HIV). **Transfusion Medicine and Hemotherapy**, v. 43, n. 3, p. 203–222, 2016.

SHAFER, R.W., SCHAPIRO, J.M., HIV-1 Drug Resistance Mutations: an Updated Framework for the Second Decade of HAART. **AIDS Rev.**, v. 2, n.10, p.67–84, 2008

SHAW, G. M.; HUNTER, E. HIV transmission. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 2, n. 11, p. 1–23, 2012.

SIMPSON, S. R. et al. Platelets function as an acute viral reservoir during HIV-1 infection by harboring virus and T-cell complex formation. **Blood Advances**, v. 4, n. 18, p. 4512–4521, 2020.

STECKBACK, J.D., KUHLMANN, AS, MONTELARO, R.C C-terminal tail of human immunodeficiency virus gp41: functionally rich and structurally enigmatic. **Journal of General Virology** v.94, p 1-19, 2013.

TURNER, B.G., SUMMERS, M.F. Structural Biology of HIV. **Journal of Molecular Biology** v.285, p.1-32, 1999

WHO, 2020. Disponível em: [https://www.who.int/data/gho/data/indicators/indicator-details/GHO/estimated-number-of-people-\(all-ages\)-living-with-hiv](https://www.who.int/data/gho/data/indicators/indicator-details/GHO/estimated-number-of-people-(all-ages)-living-with-hiv) acesso em: 01/12/2020

YOON, J. G. et al. Magnetic bead-based nucleic acid purification kit: Clinical application and performance evaluation in stool specimens. **Journal of Microbiological Methods**, v. 124, p. 62–68, 2016.

ZUCKER-FRANKLIN, D., CAO, Y. Z. Megakaryocytes of human immunodeficiency virus-infected individuals express viral RNA. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** v. 86, p. 5595–5599, 1989

APÊNDICE

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE) RESOLUÇÃO 466/2012

CONVIDO, o Senhor (a) para participar do Projeto de Pesquisa intitulado “AVALIAÇÃO DA CARGA VIRAL DO VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA (HIV) EM PLASMA POBRE EM PLAQUETAS”, que será desenvolvido por mim Suzana Kague Schnoor, Biomédica e especialista em Biologia Molecular, com orientação da profissional Farmacêutica-Bioquímica e Professora Dra Rejane Maria Tommasini Grotto da Unesp, Campus de Botucatu.

Estou estudando o exame de carga viral do HIV, aquele exame que você faz quando o médico solicita para saber quanto de vírus tem no seu sangue. Para que eu possa ter um resultado nesse momento preciso que você autorize que eu utilize o resto de sangue que sobrou quando você colheu sangue para realizar o exame de carga viral solicitado pelo seu médico. Não será preciso nova coleta de sangue em nenhum momento, nem será necessário que você forneça nenhum dado a mais.

A minha pesquisa busca saber quanto de vírus está livre no sangue e quanto fica grudado com pequenas partículas que todas as pessoas têm no sangue, as plaquetas. Os resultados de minha pesquisa não trarão benefício direto para o senhor (a) pois o senhor(a) já está em tratamento e acompanhamento da doença, mas os resultados podem, no futuro, ajudar os pesquisadores a entender melhor a doença e como o vírus se comporta no organismo.

Fique ciente de que sua participação neste estudo é voluntária e que mesmo após ter dado seu consentimento para participar da pesquisa, você poderá retirá-lo a qualquer momento, sem qualquer prejuízo na continuidade do seu tratamento.

Este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido será elaborado em duas vias de igual teor, sendo uma entregue ao Senhor (a) devidamente rubricada, e a outra via será arquivada e mantida pelos pesquisadores por um período de 5 anos após o término da pesquisa.

Qualquer dúvida adicional você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa através dos telefones (14) 3880-1608 ou 3880-1609 que funciona de 2ª a 6ª feira das 8:00 às 12.00 e das 13.30 às 17horas, na Chácara Butignolli s/nº em Rubião Júnior – Botucatu - São Paulo. Os dados de localização dos pesquisadores estão abaixo descritos:

Após terem sido sanadas todas minhas dúvidas a respeito deste estudo, **CONCORDO** em participar de forma voluntária, estando ciente que todos os meus dados estarão resguardados através do sigilo que os pesquisadores se comprometeram. Estou ciente que os resultados desse estudo poderão ser publicados e revistas científicas.

Botucatu, ____/____/____

Pesquisador

Participante da Pesquisa

Nome: Suzana Kague Schnoor

Endereço: Hemocentro de Botucatu, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina de Botucatu. Av. Prof. Mário Rubens Guimarães Montenegro, s/n- UNESP- Campus de Botucatu - Botucatu/SP - CEP 18618687

Telefone: 14-38116041 ramal:228

E-mail: suzana_ks@hotmail.com

Nome: Rejane Maria Tommasini Grotto

Endereço: Hemocentro de Botucatu, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina de Botucatu. Av. Prof. Mário Rubens Guimarães Montenegro, s/n- UNESP- Campus de Botucatu - Botucatu/SP - CEP 18618687

Telefone: 14-38116041 ramal:217

E-mail: rejane.grotto@unesp.br

ANEXO

ANEXO A - PRODUTO TÉCNICO/TÉCNOLÓGICO

NOTA TÉCNICA

Assunto

Dispõe sobre modificação do protocolo de centrifugação para quantificação da carga viral do HIV

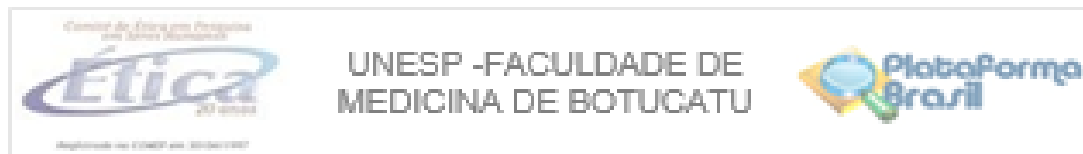
O monitoramento laboratorial da carga viral do HIV é considerado padrão-ouro para avaliação da eficácia do tratamento antirretroviral e detecção precoce de problemas de adesão em pessoas vivendo com HIV.

O protocolo vigente utiliza amostras de sangue total que são centrifugadas a fim de se obter o plasma para extração e quantificação do RNA viral através da técnica de RT-qPCR. Nosso estudo avaliou a carga viral em plasmas obtidos através do protocolo de centrifugação adotado pelo Ministério da Saúde, onde foram classificados como pobre em plaquetas e através de outro protocolo de centrifugação na qual foram classificados como plasma rico em plaquetas.

A avaliação foi realizada em 30 amostras de plasma excedente de pacientes portadores de HIV que foram atendidos pelo Laboratório de Biologia Molecular do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, as quais foram coletadas de acordo com solicitação médica para execução do exame de carga viral do HIV. Foram incluídas amostras de pacientes maiores de 18 anos, exceto gestantes, que foram atendidos no serviço em momento anterior a introdução da terapia antirretroviral e com resultado de carga viral acima de 1000 cópias/mL. A quantificação da carga viral do HIV por RT-qPCR foi realizada no plasma pobre em plaquetas (protocolo vigente do Ministério da Saúde – 10 minutos de centrifugação a 1356 x g) e no plasma rico em plaquetas (5 minutos de centrifugação a 1300 x g). Os resultados demonstraram que não houve diferença estatística significativa entre os dois grupos avaliados. Logo, pode ser sugerido que o protocolo pode ser otimizado para pacientes que entram no serviço para o exame pré introdução da terapêutica (com carga viral acima de 1000 cópias de RNA/mL) a fim de se otimizar o tempo para obtenção do plasma para posterior extração e quantificação da carga viral do HIV, conforme resultados obtidos no trabalho realizado.

Novos estudos devem ser conduzidos a fim de avaliar a reprodutibilidade destes achados em pacientes com cargas viral inferior à aqui avaliada.

ANEXO B– PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DA CARGA VIRAL DO VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA (HIV) EM PLASMA POBRE EM PLAQUETAS

Pesquisador: REJANE MARIA TOMMASINI GROTTO

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 14108519.0.0000.5411

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.402.940

Apresentação do Projeto:

A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), descrita como uma doença caracterizada por sinais e sintomas resultantes da debilitação do sistema imunológico, é consequência da infecção causada pelo vírus da Imunodeficiência humana (HIV). O monitoramento laboratorial da carga viral do HIV é considerado padrão-ouro para avaliação da eficácia da TARV e detecção precoce de problemas de adesão em pessoas vivendo com HIV (PVHIV). No Brasil, a Rede Nacional de Laboratórios para Quantificação da Carga Viral do HIV do Ministério da Saúde é responsável pela realização dos testes de quantificação de carga viral através da técnica de qRT-PCR em amostras de plasma rico em plaquetas (BRASIL, 2018).

As plaquetas têm sido consideradas carreadoras do vírus HIV na circulação sanguínea de pacientes infectados (FLAUJAC, 2010), mesmo não expressando a

molécula CD4 em sua superfície celular. Estudos in vitro demonstraram a presença de carga viral do HIV em plaquetas expostas previamente ao vírus, indicando a existência de interação (GROTTO et al, 2016). Outro estudo realizado em unidades de sangue total de indivíduos HIV positivos, onde se realizou a quantificação de carga viral nos componentes separados, demonstrou níveis significativos de HIV-1 associados às plaquetas durante todos os estágios de infecção (LEE et al, 1998).

No contexto descrito acima o presente estudo se justifica para avaliar se existe diferença entre a carga viral no plasma rico em plaquetas e, no plasma pobre em plaquetas visto que atualmente o

Endereço: Orla de Botucatu, s/n

Bairro: Rubião Junior

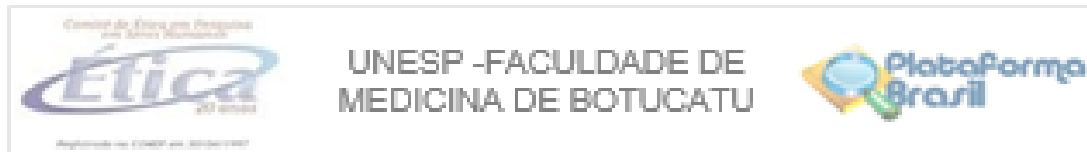
CEP: 13.018-970

UF: SP

Município: BOTUCATU

Telefone: (13)3886-1000

E-mail: cep@fmb.unesp.br



Continuação do Parecer: 3.402.640

protocolo instituído pelo Ministério da Saúde na Rede Nacional de Carga Viral do HIV-1 quantifica o RNA extraído do plasma rico em plaquetas (vírus livre + vírus camuado nas plaquetas).

Objetivo da Pesquisa:

OBJETIVO Avaliar a carga viral do HIV em plasma pobre em plaquetas comparativamente ao plasma rico em plaquetas e inferir sobre os resultados.

Pacientes e amostras

Serão incluídas 100 amostras de pacientes portadores de HIV armazenadas no repositório de amostras do Laboratório de Biologia Molecular (Laboratório de Rotinas Diagnósticas em Infecções Virais) as quais foram coletadas de acordo com solicitação médica para execução do exame de carga viral do HIV. Serão incluídas apenas amostras de pacientes que foram atendidos no serviço entre 2000 e 2016 e, em momento anterior a introdução da terapia antiretroviral.

A carga viral a partir do plasma pobre em plaquetas será realizada utilizando o excedente da coleta de sangue que o paciente realizou por ocasião de seu atendimento de rotina. A determinação da carga viral no plasma pobre em plaquetas será realizada por qRT-PCR.

Resultados do exame de carga viral do HIV para cada amostra incluída no estudo serão obtidos mediante consulta no sistema de registro de resultados de exames do Laboratório de Biologia Molecular (Laboratório de Rotinas Diagnósticas em Infecções Virais) do Hemocentro de Botucatu, Faculdade de Medicina, Unesp. Os resultados serão avaliados comparativamente: serão comparados os resultados da determinação da carga viral do HIV no plasma rico em plaquetas (exame realizado de rotina) e, no plasma pobre em plaquetas.

Tamanho amostral: 100

Critério de Inclusão:

Maiores de 18 anos. Serão incluídas apenas amostras de pacientes que foram atendidos no serviço entre 2000 e 2016 e, em momento anterior a introdução da terapia antiretroviral.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Não há riscos diretos ao participante uma vez que nenhuma intervenção será realizada. No entanto, para minimizar o único risco indireto que se refere ao sigilo da identidade dos pacientes a aluna de pós-graduação que executará o estudo receberá as amostras codificadas por código numérico e, somente o responsável pelo serviço (Laboratório de Rotinas Diagnósticas de Infecções

Endereço: Orla de Botucatu, s/n

Bairro: Rubião Junior

UF: SP

Telefone: (14)3888-1000

Município: BOTUCATU

CEP: 13.018-970

E-mail: cep@fmb.unesp.br



Continuação do Parecer: 2.462.646

Virais do Hemocentro de Botucatu) terá conhecimento da associação entre o código numérico e o nome do paciente.

Benefícios:

Os benefícios serão indiretos. Os resultados obtidos por este estudo podem elucidar quanto da carga viral é oriunda do plasma (vírus livre) e, quanto é da plaqueta (vírus ligado nas plaquetas). Atualmente, não existem estudos que realizaram esta análise e, portanto o presente estudo seria o primeiro (caráter inédito) a investigar esta questão.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de pesquisa relevante e adequadamente bem elaborada. Tem orçamento de R\$ 7.562,00 e o pesquisador informa que haverá financiamento próprio.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Documentos apresentados: folha de rosto, anuência da instituição onde será executado o estudo e do hemocentro, projeto na íntegra. Apresentação da dispensa do TCLE justificando que as amostras dos pacientes portadores de HIV estão armazenadas no repositório de amostras do Laboratório de Biologia Molecular (Laboratório de Rotinas Diagnósticas em Infecções Virais) as quais foram coletadas de acordo com solicitação médica para execução do exame de carga viral do HIV. Como se trata de realização de exame com solicitação médica para realização, nenhum procedimento adicional será realizado na referida amostra além do solicitado pelo médico e, além disso devido à necessidade de incluir apenas amostras de participantes retroativamente, antes da introdução da terapêutica, as amostras incluídas são amostras armazenadas por muito tempo, para as quais será inviável a obtenção do TCLE. Para os participantes que ainda se encontram em acompanhamento médico, será apresentado TCLE que está de acordo com a Resolução n. 466/2012.

CRONOGRAMA: está coerente

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Após análise em REUNIÃO EXTRAORDINÁRIA, o Colegiado deliberou APROVADO o projeto de pesquisa apresentado.

Endereço: Chácara Buganville, s/n	CEP: 18.018-070
Bairro: Rubião Junior	
UF: SP	Município: BOTUCATU
Telefone: (14)3888-1000	E-mail: cep@fmb.unesp.br



Continuação do Parecer: 3.402.948

Considerações Finais a critério do CEP:

Conforme deliberação do Colegiado em reunião EXTRAORDINÁRIA do Comitê de Ética em Pesquisa da FMB/UNESP, realizada em 18 de JUNHO de 2019, o projeto de pesquisa encontra-se APROVADO, sem necessidade de envio à CONEP.

No entanto, ao final da execução do projeto de pesquisa, é necessário enviar o "Relatório Final de Atividades", na forma de "NOTIFICAÇÃO", via sistema Plataforma Brasil.

Atenciosamente,

Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	FB - INFORMAÇÕES BÁSICAS DO PROJETO - 1344419.pdf	10/06/2019 07:55:15		Aceito
Outros	TCLE.docx	10/06/2019 07:44:11	SUZANA KAGUE SCHNOOR	Aceito
Outros	Coficio_Justificativa1.pdf	10/06/2019 07:43:42	SUZANA KAGUE SCHNOOR	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoDePesquisa - EAP.pdf	15/05/2019 10:14:51	SUZANA KAGUE SCHNOOR	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	AnuenciaHcmhbSipe130 - 2019.pdf	15/05/2019 10:07:47	SUZANA KAGUE SCHNOOR	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	TermoDeAnuenciaHemoentro.pdf	15/05/2019 10:05:59	SUZANA KAGUE SCHNOOR	Aceito
Folha de Rosto	FolhaDeRostoAssinada.pdf	15/05/2019 08:59:44	SUZANA KAGUE SCHNOOR	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	TermoDeAnuenciaInstitucional.pdf	14/05/2019 21:01:36	REJANE MARIA TOMMASINI GROTTO	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: Dárcos Botucatu, s/n	CEP: 18.218-970
Dalmo Rubillo Junior	
UF: SP	Município: BOTUCATU
Telefone: (14)3886-1600	E-mail: cep@fmb.unesp.br



Continuação do Parecer: 3.462/98

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BOTUCATU, 19 de Junho de 2019

Assinado por:
Trajano Sardenberg
(Coordenador(a))

Endereço: Chácara Sulgêdill, s/n

Dalmeo Rubillo Junior

CEP: 18.018-970

UF: SP

Município: BOTUCATU

Telefone: (14)3888-1000

E-mail: cep@fmb.unesp.br