



Comitê de Ética
em Pesquisa da
PUCPR

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE
CATÓLICA DO PARANÁ - PUC/
PR



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Uso de células-tronco mesenquimais para tratamento da doença do enxerto contra hospedeiro crônica refratária a corticóide após transplante de células- tronco hematopoéticas.

Pesquisador: Vaneuza Araújo Moreira Funke

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 34600814.4.3001.0020

Instituição Proponente: Pontifícia Universidade Católica do Parana - PUCPR

Patrocinador Principal: Fundação Araucária

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.242.704

Apresentação do Projeto:

De acordo com o descrito no PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1315054_E4.pdf, de 14 de março de 2019:

Sobre o desenho do estudo:

A Unidade de Hematologia, Hemoterapia e Oncologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, é reconhecida nacionalmente e internacionalmente na área de TCTH para o tratamento de doenças hematológicas malignas e não malignas. São realizados em média, 10-12

transplantes mensais de medula óssea proveniente de doadores voluntários aparentados e não aparentados. A doença do enxerto contra o hospedeiro crônica (DECH-C) é a maior causa de morbidade e mortalidade que afeta tardiamente os pacientes que receberam um transplante alogênico de células-tronco hematopoéticas. A incidência da DECH-C pode variar de 6% a 80% dependendo da idade do receptor, presença da DECH aguda (DECH-A) prévia, tipo de doador, fonte de células precursoras, manipulação do enxerto e da utilização da infusão de linfócitos do doador (ILD). Esta complicação imunológica assemelha-se a uma doença auto-imune com manifestações clínicas próprias de doenças vasculares do colágeno, tais como ulcerações orais (liquen plano), ceratoconjuntivite sicca, xerostomia, poliserosites, esofagites e estenose esofágica, ulceração e estenose vaginal, doença obstrutiva intra-hepática, doença obstrutiva pulmonar,

Endereço: Rua Imaculada Conceição 1155

Bairro: Prado Velho

CEP: 80.215-901

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3271-2103

Fax: (41)3271-2103

E-mail: nep@pucpr.br



Comitê de Ética
em Pesquisa da
PUCPR

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE
CATÓLICA DO PARANÁ - PUC/
PR



Continuação do Parecer: 4.242.704

esclerodermia, morféia, fasciite e miosites. Estas manifestações possuem consequências debilitantes como prejuízo da qualidade de vida, comprometimento funcional, necessidade de imunossupressão prolongada, levando a infecções graves recorrentes e diminuição da sobrevida. Em alguns pacientes, após o TCTH pode ocorrer o desenvolvimento da DECH em suas formas aguda ou crônica. Em pacientes com quadros graves e refratários a mortalidade pode alcançar até 90% dos pacientes. A DECH-C afeta tardiamente os pacientes que receberam um TCTH e sua incidência pode variar de 6% a 80% dependendo de diversos fatores. A primeira linha de tratamento inclui glicocorticóides e/ou ciclosporina ou tacrolimus, embora micofenolato mofetil, fototerapia extra-corpórea, metotrexate, azatioprina, talidomida tenham sido usadas também. A utilização das células-tronco adultas como uma alternativa de tratamento tem sido amplamente estudada nos casos da DECH. As CTMs oferecem suporte para o crescimento e diferenciação de células progenitoras hematopoéticas no microambiente da medula óssea. Em modelos animais estas células são capazes de promover a pega das células hematopoéticas. Em experimentos in vitro, as CTMs suprimem a proliferação de linfócitos ativados de maneira dose-dependente e sem restrição aos antígenos HLA. Devido ao seu perfil imunomodulador demonstrado tanto in vivo como in vitro e sua atuação no reparo tecidual, vários investigadores têm utilizado as CTMs para o tratamento da DECH. Os resultados em ensaios clínicos demonstraram melhora dos sintomas, elevados índices de resposta e ausência de toxicidade na infusão. A medula óssea proveniente dos doadores voluntários além de ser utilizada para o TCTH pode ser processada e expandida para obtenção das CTMs. A expansão e criopreservação das CTMs possibilitará a rápida disponibilidade destas células para o tratamento de pacientes em situações intratáveis e letais, como é o caso da DECH-C refratária.

Objetivo Primário:

Isolar, expandir e criopreservar células-tronco mesenquimais (CTMs) obtidas da medula óssea excedente, proveniente de doadores voluntários, para a rápida disponibilização no transplante alogênico de pacientes com doença do enxerto contra hospedeiro crônica refratária a corticóide e ao inibidor de calcineurina.

Metodologia Proposta:

. Coleta de Medula Óssea A coleta de medula óssea (MO) será realizada na UHHO do HC-UFPR. O paciente será submetido à anestesia geral e

Endereço: Rua Imaculada Conceição 1155

Bairro: Prado Velho

CEP: 80.215-901

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3271-2103

Fax: (41)3271-2103

E-mail: nep@pucpr.br

Continuação do Parecer: 4.242.704

será posicionado em decúbito ventral para realizar a anti-sepsia da pele com povidine tópico. Cerca de 100 mL de medula óssea será retirada por meio de múltiplas punções de ambas as cristas ilíacas posteriores, utilizando agulhas apropriadas. O material coletado deverá ser homogeneizado freqüentemente e delicadamente ao meio com anticoagulante na proporção de 1 meio:1 medula óssea, a fim de evitar a formação de coágulos. Ao término da punção deverá ser feito o curativo no local com gaze e fita adesiva. O material coletado será transportado à temperatura ambiente até o Centro de Tecnologia Celular da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (CTC/PUCPR) onde será processado. Isolamento de células mononucleares (CMN) derivadas da medula óssea A MO será filtrada utilizado inicialmente um filtro de 500 micras e em seguida um filtro de 200 micras. A medula é filtrada para retirar eventuais coágulos, espículas ósseas e gorduras. Após a filtração, a MO será diluída na proporção de 1:3 com meio de Iscove modificado por Dulbecco (IMDM) e colocada sobre um gradiente de densidade de Ficoll-Hypaque (1,077 g/mL) para isolamento das células mononucleares (CMN). Será realizada uma centrifugação de 30 minutos a 400 g e duas lavagens com meio IMDM durante 10 minutos a 400 g. As CMN serão diluídas em meio IMDM suplementado com 10% de soro autólogo e 1% de antibiótico (Estreptomicina/Penicilina). A concentração celular será verificada no contador hematológico. Cultivo e expansão de células-tronco mesenquimais derivadas da MO As células MNC serão plaqueadas em frascos de cultivo numa densidade de 1×10^5 células/cm² e incubadas a 37°C em estufa com 5% de tensão de 5% CO₂ e 95% de umidade. O meio de cultura suplementado será trocado após 48 horas do plaqueamento e substituído aproximadamente duas vezes por semana. A expansão das CTMs será realizada quando houver uma confluência celular de 80%-90%. As células serão dissociadas do frasco de cultura utilizando tripsina/EDTA, replaqueadas (1a passagem) em frascos de cultivo numa densidade de 1×10^4 células/cm² e novamente incubadas a 37°C em estufa com 5% de tensão de CO₂ e 95% de umidade. As CTMs serão cultivadas por um período aproximado de quatro semanas e criopreservadas. Quantificação e Viabilidade Celular: A quantificação das células será feita no

Endereço: Rua Imaculada Conceição 1155

Bairro: Prado Velho

CEP: 80.215-901

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3271-2103

Fax: (41)3271-2103

E-mail: nep@pucpr.br



Comitê de Ética
em Pesquisa da
PUCPR

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE
CATÓLICA DO PARANÁ - PUC/
PR



Continuação do Parecer: 4.242.704

contador hematológico e a porcentagem de células

viáveis por citometria de fluxo, logo após o isolamento celular e ao término da expansão celular. Controles de qualidade das células-tronco

mesenquimais cultivadas: Contagem e Viabilidade Celular, Caracterização Celular por Citometria de fluxo, Análises Morfológicas, Controle da

esterilidade, Normalidade Cariotípica e Ensaio clonogênio. Preparo das células para o transplante As células serão dissociadas com tripsina e

diluídas em soro autólogo. Será feita a contagem das células, a viabilidade celular e coletado material para os testes microbiológicos. As CTMs

serão transferi-das para uma bolsa e encaminhada para infusão, no mínimo duas doses de 2×10^6 CTMs/kg serão infundidas, via intravenosa.

Avaliação prospectiva das manifestações clínicas intra e extra orais da DECH-C: Será realizada uma avaliação prospectiva das manifestações

clínicas intra e extra orais da DECH-C, por meio de exame físico, realizado por somente um cirurgião-dentista, especialista em estomatologia.

Avaliação clínica dos pacientes após o transplante de CTMs em pacientes com DECH-C: O acompanhamento dos pacientes após o transplante de

CTMs, será quinzenalmente, durante o período de um ano, no ambulatório de doença do enxerto contra hospedeiro no Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná. Serão realizados exames clínicos e complementares conforme protocolo do serviço. Durante o acompanhamento do paciente que será de no mínimo um ano após o transplante.

Critério de Inclusão:

- Idade de 0 a 65 anos;
- Pacientes pós transplante de células-tronco hematopoéticas alogênicas;
- Apresentar DECH crônica clássica ou síndrome de sobreposição conforme definido pelos critérios do National Institute of Health, refratária ao tratamento com corticóide e ciclosporina. A refratariedade será definida como a ausência de resposta após três meses de tratamento;
- Pacientes (ou seus responsáveis) que concordarem em participar deste estudo e que assinarem o termo de consentimento livre e esclarecido.

Critério de Exclusão:

- Paciente possua qualquer condição clínica concomitante que na opinião do médico contra indique a infusão de células-tronco mesenquimais;
- Pacientes (ou seus responsáveis) que não concordarem em participar deste estudo ou que não assinarem o termo de consentimento livre e esclarecido;
- Pacientes com insuficiência respiratória

Endereço: Rua Imaculada Conceição 1155

Bairro: Prado Velho

CEP: 80.215-901

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3271-2103

Fax: (41)3271-2103

E-mail: nep@pucpr.br



Comitê de Ética
em Pesquisa da
PUCPR

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE
CATÓLICA DO PARANÁ - PUC/
PR



Continuação do Parecer: 4.242.704

necessitando ventilação mecânica. Pacientes com doença maligna em recidiva

Riscos: Para os doadores: estes podem apresentar complicações relacionadas a aspiração de medula óssea como dor local e infecção do sítio de punção. Para os pacientes: reações infusionais como febre, calafrios podem ser observadas. O uso destas células podem transmitir infecções virais. O risco é hoje praticamente nulo após a implantação do teste NAT para doadores.

Benefícios: O isolamento, expansão e criopreservação das CTMs obtidas da medula óssea de doadores voluntários irá possibilitar a rápida resultados iniciais surpreendentes³⁵⁻³⁷. Weng et al. (2010)³⁸ reportaram recentemente os resultados do tratamento de 19 pacientes com DECH-C

refratária tratados com infusões de CTMs no período de abril de 2005 a outubro de 2008. Houve resposta em 73,7% dos pacientes e 10 dos 19 pacientes puderam reduzir em mais de 50% ou descontinuar totalmente os imunossuppressores. Os autores concluem que o tratamento foi eficaz

como resgate destes pacientes. Zhang LS et al. (2009)³⁷ também reportaram seus resultados de infusão de CTMs de doadores HLA idênticos, doadores haploidênticos ou voluntários em 12 pacientes com DECH-C refratários. Não houve efeito colateral relacionado às infusões, a resposta global foi de 75% (9/12) e foram observadas resoluções completas em pacientes com envolvimento cutâneo (3/12), pulmonar (1/3), articular (1/5), hepático (3/10), cavidade oral (4/12) e ocular (2/7), independente do tipo de doador utilizado. O seguimento mediano deste estudo foi de 1152 (795-1914) dias, a sobrevida livre de leucemia foi de 91,7% (11/12) e a sobrevida global de 75% (9/12). A razão CD4/CD8 e a proporção de células T reguladoras foram significativamente maiores do que antes do tratamento. A verificação de resposta completa em pacientes com bronquiolite obliterante (DECH-C pulmonar) é consistente com estudos que demonstram a utilidade destas células em várias doenças inflamatórias dos pulmões

e mesmo em fibrose pulmonar idiopática³⁹. Weng J et al. (2012)⁴⁰, reportaram seus resultados de infusão destas células em 22 pacientes com síndrome sicca ocular grave secundária a doença do enxerto crônica, com melhora dos sintomas em 55,54% dos pacientes tratados.

Emenda da pesquisa encaminha Declaração de compromisso da nova pesquisadora, Clara Voltarelli.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo da emenda apresentada diz respeito ao fato de se encaminhar Declaração de compromisso da nova pesquisadora, Clara Voltarelli.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não se aplica.

Endereço: Rua Imaculada Conceição 1155

Bairro: Prado Velho

CEP: 80.215-901

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3271-2103

Fax: (41)3271-2103

E-mail: nep@pucpr.br



Comitê de Ética
em Pesquisa da
PUCPR

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE
CATÓLICA DO PARANÁ - PUC/
PR



Continuação do Parecer: 4.242.704

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Solicitação de CTM de indivíduos (sem patologia identificada) para análise comparativa da expressão gênica de fatores neurotróficos e moléculas correlatas em CTM de pacientes com Esclerose Lateral Amiotrófica do projeto CNPq401922/2014-6 sob responsabilidade do Prof. Dr. Gerson Chadi e CNPq 401923/2014-2 sob responsabilidade do Prof. Dr Paulo Roberto Slud Brofman.

Metodologia: As CTM serão submetidas a extração do RNA total utilizando-se Kit mirVana (Ambion, USA) de acordo com as instruções do fabricante. As extrações serão realizadas em ambiente de trabalho limpo utilizando-se solução descontaminante de RNase (Ambion). Os RNAs serão quantificados em NanoDrop1000 (Thermo) e terão a sua qualidade acessada. A expressão gênica dos fatores neurotróficos e moléculas correlatas será realizada através da técnica do qPCR. Para tanto, 1µg de RNA será submetido à reação de transcrição reversa utilizando-se o kit cDNAMaxima (ThermoScientific, EUA), seguindo as instruções do fabricante. As sequencias dos iniciadores serão selecionadas utilizando-se a ferramenta disponível na internet (<http://www.idtdna.com/scitools/Applications/REalTimePCR/>). As reações da qPCR serão realizadas em duplicatas. A expressão diferencial dos transcritos-alvo será determinada pela quantificação relativa em relação à média dos genes endógenos definidos para as amostras. As reações serão realizadas no aparelho QuantStudio 3 Real Time PCR (ThermoScientific, EUA) em volume final de 20µl, contendo 1X Dynamo Color Flash SYBR Green qPCR kit (ThermoScientific, EUA), nas condições de ciclagem recomendadas pelo fabricante(ThermoScientific, EUA).

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Vide documentos postados.

Recomendações:

Sugere-se revisão de cronograma da pesquisa no projeto da PB.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

A emenda que se apresenta, em que se incluem Declaração de compromisso da nova pesquisadora, Clara Voltarelli, está em consonância com a Res. CNS 466/12.

Considerações Finais a critério do CEP:

Lembramos aos senhores pesquisadores que, no cumprimento da Resolução 466/12, o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) deverá receber relatórios anuais sobre o andamento do estudo, bem como

Endereço: Rua Imaculada Conceição 1155

Bairro: Prado Velho

CEP: 80.215-901

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3271-2103

Fax: (41)3271-2103

E-mail: nep@pucpr.br



Comitê de Ética
em Pesquisa da
PUCPR

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE
CATÓLICA DO PARANÁ - PUC/
PR



Continuação do Parecer: 4.242.704

a qualquer tempo e a critério do pesquisador nos casos de relevância, além do envio dos relatos de eventos adversos, para conhecimento deste Comitê. Salientamos ainda, a necessidade de relatório completo ao final do estudo.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEPPUCPR de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas.

Se a pesquisa, ou parte dela for realizada em outras instituições, cabe ao pesquisador não iniciá-la antes de receber a autorização formal para a sua realização. O documento que autoriza o início da pesquisa deve ser carimbado e assinado pelo responsável da instituição e deve ser mantido em poder do pesquisador responsável, podendo ser requerido por este CEP em qualquer tempo.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Outros	Declaracao_de_compromisso_14_03_2019.pdf	14/03/2019 18:26:54	Vaneuza Araújo Moreira Funke	Aceito
Outros	Declaracao_do_orientador_do_aluno_14_03_2019.pdf	14/03/2019 18:26:37	Vaneuza Araújo Moreira Funke	Aceito
Outros	Termo_de_responsabilidade_14_03_2019.pdf	14/03/2019 18:26:12	Vaneuza Araújo Moreira Funke	Aceito
Outros	Termo_Confidencialidade_14_03_2019.pdf	14/03/2019 18:25:45	Vaneuza Araújo Moreira Funke	Aceito
Outros	Carta_CEP.pdf	23/11/2018 17:24:29	Vaneuza Araújo Moreira Funke	Aceito
Outros	METODOLOGIA_EMENDA.pdf	08/11/2018 09:00:16	Vaneuza Araújo Moreira Funke	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_DOADOR_MO_EMENDA.pdf	08/11/2018 08:58:55	Vaneuza Araújo Moreira Funke	Aceito
Outros	CARTA_DE_ENCAMINHAMENTO_CEP.pdf	29/05/2018 08:23:19	Alexandra Cristina Senegaglia	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_2018.pdf	29/05/2018 08:22:33	Alexandra Cristina Senegaglia	Aceito
Outros	Submissao_emenda_31082016.pdf	31/08/2016 11:56:31	Alexandra Cristina Senegaglia	Aceito
TCLE / Termos de	TCLE_Receptor_CTM_2016.pdf	31/08/2016	Alexandra Cristina	Aceito

Endereço: Rua Imaculada Conceição 1155

Bairro: Prado Velho

CEP: 80.215-901

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3271-2103

Fax: (41)3271-2103

E-mail: nep@pucpr.br



Comitê de Ética
em Pesquisa da
PUCPR

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE
CATÓLICA DO PARANÁ - PUC/
PR



Continuação do Parecer: 4.242.704

Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Receptor_CTM_2016.pdf	11:55:10	Senegaglia	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Vaneuza_Funke_Julho_2016.pdf	31/08/2016 11:54:28	Alexandra Cristina Senegaglia	Aceito
Outros	Carta_Retificacao.pdf	01/10/2014 17:19:33		Aceito
Outros	Roberta_T_S_Zanicotti.pdf	04/08/2014 17:05:31		Aceito
Outros	Roberta_T_S_Zanicotti.pdf	04/08/2014 17:05:12		Aceito
Outros	Vaneuza_Funke.pdf	04/08/2014 17:04:16		Aceito
Outros	Tamara_Borgonovo.pdf	04/08/2014 17:04:06		Aceito
Outros	Ricardo_Pasquini.pdf	04/08/2014 17:03:55		Aceito
Outros	Noemi_Farah_Pereira.pdf	04/08/2014 17:03:45		Aceito
Outros	Mariester_Malvezzi.pdf	04/08/2014 17:03:36		Aceito
Outros	João Samuel de Holanda Farias.pdf	04/08/2014 17:03:21		Aceito
Outros	Elenaide_Coutinho_Nunes.pdf	04/08/2014 17:03:11		Aceito
Outros	CArmen_Lucia_Kuniyoshi_Rebelatto.pdf	04/08/2014 17:01:58		Aceito
Outros	Alexandra_Cristina_Senegaglia.pdf	04/08/2014 17:01:32		Aceito
Outros	Termo_Guarda_Material_Biológico.pdf	04/08/2014 16:50:42		Aceito
Outros	QUALIFICAÇÃO PESQUISADORES.doc	04/08/2014 16:50:24		Aceito
Outros	Termo_Responsabilidade_Pesquisa.pdf	04/08/2014 16:49:28		Aceito
Outros	Declaração_Compromisso_Pesquisadores.pdf	04/08/2014 16:49:16		Aceito
Outros	Declaração_Uso_Especifico.pdf	04/08/2014 16:49:03		Aceito
Outros	Declaração_Tornar_Publico_Resultados.pdf	04/08/2014 16:48:53		Aceito
Outros	Termo_Confidencialidade.pdf	04/08/2014 16:48:41		Aceito
Outros	Concordancia_PUCPR.pdf	04/08/2014 16:48:23		Aceito
Outros	Concordancia_UHHO_HCUFPR.pdf	04/08/2014		Aceito

Endereço: Rua Imaculada Conceição 1155

Bairro: Prado Velho

CEP: 80.215-901

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3271-2103

Fax: (41)3271-2103

E-mail: nep@pucpr.br



Comitê de Ética
em Pesquisa da
PUCPR

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE
CATÓLICA DO PARANÁ - PUC/
PR



Continuação do Parecer: 4.242.704

Outros	Concordancia_UHHO_HCUFPR.pdf	16:48:16		Aceito
Outros	Carta_Encaminhamento_Pesquisador.pdf	04/08/2014 16:47:31		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Vaneuza_Funke_Julho_2014.pdf	22/07/2014 11:52:21		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Receptor_CTM.doc	06/06/2014 16:54:49		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE doador MO.doc	06/06/2014 16:54:36		Aceito
Outros	Convênio 180.2014.pdf	06/06/2014 16:54:09		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CURITIBA, 27 de Agosto de 2020

Assinado por:
Ana Carla Efig
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Imaculada Conceição 1155

Bairro: Prado Velho

CEP: 80.215-901

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3271-2103

Fax: (41)3271-2103

E-mail: nep@pucpr.br