

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA
E PARASITOLOGIA APLICADAS

Baixos níveis de lectina ligante de manose podem estar associados a uma maior predisposição à doença pelo vírus respiratório sincicial sem interferir na ativação de linfócitos T

Dissertação apresentada ao
Colegiado do Programa de Pós-
graduação em Imunologia e
Parasitologia Aplicadas como parte
da obtenção do título de Mestre

Lucas Zimon Giacomini Ribeiro

Uberlândia

2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA
E PARASITOLOGIA APLICADAS

Baixos níveis de lectina ligante de manose podem estar associados a uma maior predisposição à doença pelo vírus respiratório sincicial sem interferir na ativação de linfócitos T

Dissertação apresentada ao
Colegiado do Programa de Pós-
graduação em Imunologia e
Parasitologia Aplicadas como parte
da obtenção do título de Mestre

Lucas Zimon Giacomini Ribeiro

Profa. Dra. Divina Aparecida Oliveira Queiróz
(orientadora)

Uberlândia

2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA
E PARASITOLOGIA APLICADAS

Dissertação apresentada ao
Colegiado do Programa de Pós-
graduação em Imunologia e
Parasitologia Aplicadas como parte
da obtenção do título de Mestre

Lucas Zimon Giacomini Ribeiro

Profa. Dra. Divina Aparecida Oliveira Queiróz
(orientadora)

Uberlândia

2007

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

R484b Ribeiro, Lucas Zimon Giacomini, 1983-
Baixos níveis de lectina ligante de manose podem estar associados a uma maior predisposição à doença pelo vírus sincicial sem interferir na ativação de linfócitos T / Lucas Zimon Giacomini Ribeiro. - 2007. 41 f. : il.

Orientadora: Divina Aparecida Oliveira Queiróz
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Inclui bibliografia.

1. Virologia - Teses. 2. Imunologia - Teses. I. Queiróz, Divina Aparecida Oliveira. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. III. Título.

CDU: 578

Dedico ao meu pai.

Se não fosse por ele, nada disso seria possível!

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço aos meus pais, Antonio e Sonia, por priorizarem a educação em minha vida, o que permitiu que eu chegasse até aqui.

À todas as pessoas da minha família que, cada um a seu modo, fez parte da minha formação pessoal. Amo todos vocês!

À minha orientadora Divina, por me mostrar os caminhos da pesquisa e suas possibilidades, mas principalmente por sua amizade e dedicação.

Aos amigos que estiveram comigo nesta etapa e torceram por mim: André, Laura, Rafaella, Luana, Branca, Maíra, Taty.

Aos amigos do laboratório que, depois de tanto tempo juntos, me fazem sentir em família: Thelma, Lourenço, Lívia, Lysa, Bruno, Guilherme, Renata, Gabriela e Ludmila.

Aos amigos e colegas da pós, por tornarem menos estressantes o período intensivo de aulas.

Ao Neto e à Lucileide, que sempre me receberam com um sorriso no rosto e me ajudaram nas minhas freqüentes dúvidas.

Aos médicos que tornaram possível este trabalho, em especial ao Dr. Orlando Mantese e ao Dr. Hélio Silveira.

À Ariadne por contribuir na coleta de controles e pelas divertidas manhãs em que passamos juntos no laboratório de análises clínicas.

Ao Dr. Ralph Tripp, que gentilmente forneceu vários dos reagentes utilizados neste trabalho e por sempre atender aos pedidos de correção de resumos e manuscrito.

Aos professores do PIPPA que me garantiram um excelente aprendizado.

À Patrícia e a Fabiana do laboratório de citometria de fluxo do Centro Regional de Hemoterapia/USP, Ribeirão Preto, pelo auxílio na técnica de citometria, além de tornar muito divertido e instrutivo o período em que estive lá.

À todas as famílias que consentiram que seus filhos participassem deste estudo e às crianças, que inocentemente “mais contribuíram” para a obtenção dos resultados deste trabalho.

Aos laboratórios de Imunologia, Parasitologia, Biologia Molecular e de Genética da UFU de Uberlândia, MG e ao Centro Regional de Hemoterapia/USP de Ribeirão Preto, SP, pela permissão de uso de equipamentos.

SUMÁRIO

RESUMO.....	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUÇÃO.....	3
2. OBJETIVOS.....	9
3. MATERIAL E MÉTODOS	10
3.1. Casos.....	10
3.2. Controles.....	11
3.3. Processamento do material clínico	11
3.4. Pesquisa de lectina ligante de manose (LLM).....	12
3.5. Caracterização fenotípica de células mononucleares do sangue periférico (CMSP) por citometria de fluxo	13
4. RESULTADOS	15
4.1. Características clínicas das crianças	15
4.2. Concentração de lectina ligante de manose	15
4.3. Freqüência de subpopulações de linfócitos	16
5. DISCUSSÃO.....	20
6. CONCLUSÕES.....	24
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25
ANEXO A	34
ANEXO B	35
ANEXO C	36
ANEXO D	37
ANEXO E	38
ANEXO F.....	39
ANEXO G.....	40
ANEXO H.....	41

RESUMO

O vírus respiratório sincicial (VRS) é a principal causa de doença do trato respiratório inferior em crianças no mundo todo, principalmente nas menores de seis meses de idade e, compreender a resposta imune contra ele é essencial para desenvolver estratégias de intervenção. A lectina ligante de manose (LLM) do presente no soro, relacionada à resposta imune inata, reconhece uma gama de patógenos, ativa o sistema complemento e tem um papel essencial na fase inicial da infecção, contribuindo para o desenvolvimento de uma resposta adaptativa. Neste estudo, 82 crianças <5 anos de idade com infecção pelo VRS confirmada e 70 controles tiveram os níveis de LLM no soro medidos por um ensaio imuno enzimático indireto e também fenótipos das células mononucleares do sangue periférico (CMSP) caracterizado por citometria de fluxo. As amostras foram distribuídas em quatro grupos: soro/caso (81), soro/controle (40), CMSP/caso (33), CMSP/controle (58). Trinta e oito casos eram <6 meses de idade sendo que a maioria deles foi internada (33/38). As concentrações de LLM em todas as idades tiveram uma ampla distribuição, porém, uma grande porcentagem dos casos, isto é, 67,9% (55/81) tiveram níveis de LLM <500 ng/mL (baixo/intermediário), comparado com 40% (16/40) dos controles. Os níveis de LLM dos casos e controles <1 mês de idade não foram diferentes, mas para as crianças >24 meses de idade, os níveis dos casos foram menores ($p=0,034$). A porcentagem de células T CD4⁺ dos casos >6 meses de idade foi menor ($p<0,001$) do que a dos controles. Ainda, não houve diferença entre casos e controles para as células T CD8⁺, com exceção da faixa de idade entre 6-12 meses em que os casos apresentaram uma menor frequência ($p=0,003$). A ativação de células T (CD3⁺HLA-II⁺) foi significativamente maior nos casos do que nos controles ($p<0,001$), em contraste com as células *natural killer* que geralmente estiveram diminuídas nos casos ($p<0,001$). Estes resultados sugerem que a infecção aguda por VRS nessas crianças parece estar associada com baixos níveis de LLM, porém não interferindo na ativação de linfócitos.

Palavras chave:

vírus respiratório sincicial

crianças

lectina ligante de manose

subpopulações de linfócitos

ABSTRACT

Respiratory syncytial virus (RSV) is a major cause of serious lower respiratory tract disease among infants and young children worldwide, and understanding the immune response to its infection is essential for intervention strategies. The innate-response serum mannose-binding lectin (MBL), which recognizes a broad range of pathogens and subsequently activates the complement system, has an essential role in the early phase of infection contributing to the development of an acquired immune response. In this study, 82 children <5 years old with confirmed acute RSV infection and 70 controls had MBL levels measured by an indirect ELISA and PBMC phenotypes characterized by flow cytometry. Samples were distributed in four groups: serum/case (81), serum/control (40), PBMC/case (33), PBMC/control (58). Thirty eight cases were <6 months old and most of them had been interned (33/38). The MBL concentrations from all children presented a wide range of values, however, the greater percentage of cases, i.e. 67.9% (55/81) had <500 ng/mL (low/intermediate) MBL levels compared to 40% (16/40) for control subjects. Case and control MBL levels from children <1 month old were not statistically different, but were substantially lower in cases >24 months old ($p=0.034$). The CD4⁺ T cells percentage was lower ($p<0.001$) in children >6 months old compared to controls, while, the CD8⁺ T cells percentage in cases and controls was similar except for lower frequency in the 6–12 months old cases ($p=0,003$). T cell activation (CD3⁺HLA-II⁺) was significantly higher in cases compared to controls ($p<0,001$), in contrast to natural killer cells which were generally decreased ($p<0,001$). These results suggest that acute RSV infection in these children seems to be associated with low MBL levels, but not interfering in T cell activation.

Key words:

respiratory syncytial virus

infants and young children

mannose-binding lectin

lymphocyte phenotypes

1. INTRODUÇÃO

Os vírus são os principais agentes causadores de doenças respiratórias agudas (DRA) em crianças menores de cinco anos de idade em todo o mundo, sendo o vírus respiratório sincicial (VRS) o principal agente responsável pela maioria dos casos graves em neonatos e lactentes, através do comprometimento do trato respiratório inferior, caracterizado por bronquiolite e pneumonia (FISCHER *et al.*, 2002; QUEIRÓZ *et al.*, 2002; CALEGARI *et al.*, 2005).

O VRS, isolado pela primeira vez de uma criança em 1956 (CHANOCK, FINBERG, 1957) é um membro da família *Paramyxoviridae*, gênero *Pneumovirus* e possui genoma do tipo RNA de fita simples linear com polaridade negativa (COLLINS *et al.*, 1996). Estudos das características antigênicas e genéticas do VRS mostram que este pode ser dividido em dois subgrupos – A e B (ANDERSON *et al.*, 1985). O genoma é traduzido em 11 proteínas (F, G, SH, M, M2, N, P, L, NS1, NS2, S), sendo que a F e a G são as mais imunogênicas (PALOMO *et al.*, 2000) apesar dessas proteínas de superfície diferirem entre as cepas (SULLENDER, 2000). Em vista disso, há sugestão de que a gravidade da doença respiratória esteja relacionada com o tipo de VRS causador da infecção (WALSH *et al.*, 1997), sendo maior a gravidade quando o agente é o VRS do subgrupo “A” (HOLBERG *et al.*, 1991; STRALIOTTO *et al.*, 1994). Porém, em termos do trato respiratório superior, estudos sugerem que a gravidade relaciona-se principalmente com a infecção pelo VRS do subgrupo “B”, sendo a otite média aguda a principal manifestação clínica (DENNY, 1995; HEIKKINEN *et al.*, 1995).

A primeira infecção geralmente ocorre em crianças menores de seis meses de idade apesar da presença de anticorpos maternos (QUEIRÓZ *et al.*, 2002;

HACIMUSTAFAOGLU *et al.*, 2004). Virtualmente, todas as crianças são infectadas até os dois anos de idade, com reinfecções ocorrendo ao longo da vida, sendo que essas infecções prévias pela mesma cepa ou por cepa diferente não protege contra reinfecções (GLEZEN *et al.*, 1986).

Uma vacina de VRS inativada por formalina testada em meados da década de 1960 em crianças, não preveniu-as contra a infecção pelo vírus selvagem; sendo, entretanto, associada com o desenvolvimento de doença pulmonar aumentada nas que adquiriram uma infecção natural no ano seguinte (KIM *et al.*, 1969). Estudos retrospectivos indicam que os vacinados produziram anticorpos específicos contra o VRS, mas não protetores, sugerindo que a resposta por anticorpos pode ter contribuído para a gravidade (MURPHY, WALSH, 1988). No entanto, estudos sobre a resposta imune humoral contra as infecções por este vírus demonstraram que o nível de proteção está ligado ao título de anticorpos específicos (PIEDRA *et al.*, 2003). Ainda, anticorpos maternos decrescem em crianças até os seis meses de idade, enquanto que anticorpos específicos parecem ser produzidos por volta do 3º mês de idade (QUEIRÓZ *et al.*, 2002).

Hoje, o desenvolvimento de uma vacina eficaz contra o VRS é dificultado por diversos fatores tais como: modelos animais que não são completamente permissivos, a existência de dois grupos antigênicos, a idade da população alvo e a presença de anticorpos maternos agindo como potenciais inibidores (CROWE, 2001). Apesar dos obstáculos, diferentes candidatas a vacina foram testadas em humanos, como a de proteínas purificadas do VRS, a de vetores expressando subunidades de proteínas do vírus, a de proteína de fusão (F) para imunização durante a gestação e a de vírus “vivo” atenuado (POLACK, KARRON, 2004). Contudo, somente versões engenheirizada desta última foram testadas em

neonatos e lactentes (ENGLUND, 2005). Apesar dos recentes avanços, não existe uma vacina suficientemente segura e eficaz disponível, principalmente devido ao conhecimento limitado sobre os mecanismos de imunidade e patogênese associada à infecção pelo VRS (GIRARD *et al.*, 2005).

A imunização passiva com palivizumab (Synagis®, MedImmune Inc., MD) têm sido indicada em casos de crianças com alto risco de desenvolver bronquiolite causada pelo VRS (MITCHELL *et al.*, 2006). O palivizumab é um anticorpo monoclonal humanizado dirigido contra a proteína F do vírus, que é responsável pela fusão e entrada do vírus na célula alvo. Foi demonstrado que a administração do palivizumab em recém-nascidos pretermos (idade gestacional \leq 30 semanas) sem displasia broncopulmonar, reduziu significativamente a taxa de internação dessas crianças por bronquiolite causada pelo VRS (GRIMALDI *et al.*, 2007). Ainda, o custo da profilaxia em crianças com alto risco de hospitalização (pretermos, displasia broncopulmonar e doença cardíaca congênita) mostrou-se menor quando comparado com o não profilático (NUIJTEN *et al.*, 2007).

A imunidade inata é amplamente aceita como a primeira linha de defesa contra infecções e possui um papel fundamental na indução da resposta adaptativa. Sendo

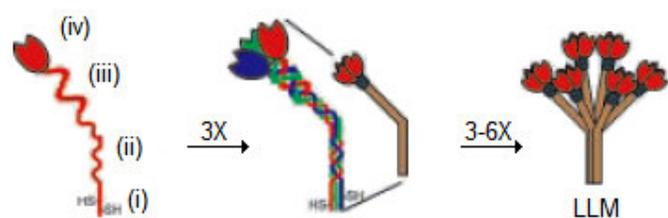


Figura 1. Representação esquemática das subunidades, unidades estruturais e LLM. Fonte: VAN DE WETERING *et al.*, 2004

assim, a família das colectinas despertou grande interesse como moléculas inatas de reconhecimento (EPSTEIN *et al.*, 1996). A unidade funcional básica das colectinas é o trímero formado por subunidades de aproximadamente 31 KDa denominado “unidade estrutural”. Essa subunidade possui quatro domínios

diferentes: domínio N-terminal rico em cisteína (i), domínio de colágeno (ii), pescoço em α -hélice (iii) e domínio de lectina do tipo C (iv), conhecido como “domínio de reconhecimento de carboidrato” (Figura 1).

Um componente da família das colectinas é a lectina ligante de manose (LLM), composta de 3-6 unidades estruturais formando um “ramo de tulipas”, secretada no sangue pelo fígado, que se liga à arranjos de carboidrato na superfície de patógenos e ativa o sistema complemento (via da lectina) (MATSUSHITA *et al.*, 2000; VAN DE WETERING *et al.*, 2004). Essa via é ativada sem o envolvimento do componente C1q do complemento (IKEDA *et al.*, 1987), com necessidade, entretanto, da participação do complexo C1r2s2 e das proteases MASP-I e II (THIEL *et al.*, 1997). A especificidade da LLM é considerada ampla por reconhecer D-manose, N-acetilglucosamina e L-fucose, presentes na superfície de vários microrganismos, como vírus, bactérias, fungos e parasitos, mas esses carboidratos não são encontrados na superfície das células de mamíferos (EZEKOWITZ *et al.*, 1981; LEE *et al.*, 1991), o que faz com que a LLM seja capaz de diferenciar o próprio (“self”) do não-próprio (“non-self”) (FRASER *et al.*, 1998).

A deficiência na produção de LLM ressalta a importância desta colectina, uma vez que está relacionada a várias doenças (BOUWMAN *et al.*, 2006), incluindo infecções respiratórias recorrentes na infância (KOCH *et al.*, 2001; CEDZYNSKI *et al.*, 2004). As principais causas dessa deficiência são polimorfismos no exon 1 e na região promotora, resultando na inibição da união das unidades estruturais (KAWASAKI, 1999) e gerando falha na fixação do complexo C1r2s2 do complemento (SUPER *et al.*, 1992; KURATA *et al.*, 1993). A deficiência é observada em pessoas de vários países em diferentes níveis, com

uma estimativa em torno de 5-10% da população em geral (CASANOVA, ABEL, 2004). Contudo, o impacto dessa deficiência de LLM em termos de imunidade e defesa ainda não foi suficientemente explorado.

Outro fator importante na imunidade inata e ligada à atividade das colectinas é o sistema complemento. Este sistema é ativado em infecções por alguma das vias conhecidas, isto é, clássica, da lectina e/ou alternativa, resultando em várias funções efetoras que contribuem na resolução da infecção (BLUE *et al.*, 2004). Uma de suas funções efetoras é a regulação da resposta adaptativa, seja diretamente por seus fragmentos (MORGAN *et al.*, 2005) ou indiretamente por células *natural killer* (KOS, 1998) e células dendríticas (CASTELLANO *et al.*, 2004).

Enquanto a imunidade inata possui um importante papel para impedir um vírus de causar a doença, a imunidade adaptativa é considerada essencial para eliminar o agente viral do organismo. Por outro lado, alguns estudos em modelos animais demonstraram que as células T específicas contra o vírus respiratório sincicial podem desempenhar um papel na patogênese da doença respiratória aguda por esse vírus (OPENSHAW, TREGONING, 2005).

Apesar de a resposta do tipo Th1 ter sido associada à infecção pelo VRS *in vivo* e a resposta do tipo Th2 à imunização pela vacina desse vírus inativada por formalina (WARIS *et al.*, 1996; WARIS *et al.*, 1997), ambos os padrões já foram observados em crianças resultando em patologia (BECKER, 2006). Sendo assim, o balanço da expressão de citocinas Th1/Th2 é um importante determinante imunológico na doença pelo VRS (OPENSHAW, TREGONING, 2005). Foi referido que o desequilíbrio para células T CD4⁺ Th2 está associado a uma maior

gravidade (ALWAN *et al.*, 1994), enquanto que células T CD8⁺ e a produção de IFN- γ pode prevenir a eosinofilia nos pulmões causada por citocinas Th2 (HUSSELL *et al.*, 1997).

Para melhor compreender aspectos da resposta imune à infecção contra VRS, níveis de LLM e marcadores de superfície de células mononucleares de sangue periférico (CMSP) foram estudados em amostras clínicas de crianças menores de cinco anos de idade com infecção pelo vírus e em controles.

2. OBJETIVOS

Determinar o perfil de resposta de lectina ligante de manose (LLM) no soro e fenótipos em subpopulações de linfócitos do sangue periférico de crianças menores de cinco anos de idade, com infecção pelo vírus respiratório sincicial confirmada e controles.

Investigar se há relação entre os níveis de LLM e os fenótipos de linfócitos nessas amostras.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Casos

Amostras de secreção de nasofaringe e de sangue de crianças menores de cinco anos de idade, atendidas no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC/UFU), vem sendo coletadas desde o ano de 2000 para a investigação de vírus respiratórios e aspectos da resposta imune contra o vírus respiratório sincicial (VRS). Para a inclusão nesse estudo, o paciente tinha que apresentar quadro de infecção respiratória aguda, com duração máxima de cinco dias, caracterizado por coriza, tosse, sibilos e/ou dificuldade respiratória, com ou sem febre. A coleta da secreção de nasofaringe foi realizada conforme descrito por Queiróz *et al.* (2002), após o consentimento expresso dos pais ou responsáveis (Anexo A) e preenchimento de ficha clínica (Anexo B) pelo pediatra responsável pelo atendimento da criança. Foram coletados volumes de até dois mL de sangue venoso total, de até três mL com anticoagulante e um mL de secreção de nasofaringe de cada criança. Essa coleta recebeu parecer favorável do Comitê de Ética em Pesquisa desta Universidade (CEP/UFU), protocolado sob n°. 018/2000 (Anexos C, D e E). Dentre esses pacientes, selecionou-se para este estudo 82 casos com infecção pelo VRS confirmada no período entre os anos de 2000 e 2004. O quadro clínico de infecção das vias aéreas superiores (IVAS) foi caracterizado por otite média aguda (OMA) e gripe, enquanto que a infecção do trato respiratório baixo foi caracterizado por bronquiolite, bronquite, pneumonia e broncopneumonia. A co-infecção com outros vírus não foi investigada.

3.2. Controles

Mediante autorização dos pais ou responsáveis (Anexo F), os mesmos volumes de sangue venoso previamente descritos foram obtidas de 70 crianças menores de cinco anos de idade no HC/UFU (Laboratório de análises clínicas, Pronto Socorro Pediátrico, Enfermaria Pediátrica, UTI Pediátrica e Berçário) por punções venosas mediante recomendações médicas para outros exames, sendo que em sua maioria, foram de pacientes acidentados, cardiopatas ou para avaliação rotineira. Mais de 70% dessas amostras foram obtidas fora do período de circulação do VRS. Para os controles menores de um mês de idade, os espécimes clínicos foram coletados de recém-nascidos de até dois dias de idade no berçário. Não foi investigado se houve infecção inaparente nessas crianças. A coleta desses controles recebeu parecer favorável do CEP/UFU nº 260/04 registro 151/04 (Anexos G e H).

3.3. Processamento do material clínico

Os espécimes foram imediatamente transportados em gelo para o Laboratório de Virologia, onde o aspirado de nasofaringe e o sangue venoso foram processados no período máximo de 4 horas. Alíquotas da secreção foram preparadas e estocadas conforme previamente descrito (QUEIRÓZ *et al.*, 2002) e armazenadas em freezer -20°C e -70°C ou em contêiner de nitrogênio líquido. Uma das alíquotas foi utilizada para reações de imunofluorescência indireta (Respiratory Panel 1 Viral Screening and Identification IFA, Chemicon Internacional, CA, USA) com o objetivo de investigar sete vírus respiratórios: VRS, influenza A e B, parainfluenza 1, 2 e 3 e adenovírus, e a outra alíquota foi subdividida para isolamento viral em cultura de células e para investigação de ácido nucléico por técnicas moleculares. Nessas amostras não foram realizados

testes que verificaram possíveis co-infecções. Em seguida, o sangue com anticoagulante foi processado, para a separação de células mononucleares do sangue periférico (CMSP) pela sedimentação, utilizando meio separador de linfócitos (Ficoll-Paque™ PLUS – Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Suécia), conforme instruções do fabricante. As CMSP coletadas foram lavadas com PBS 0,01M (pH 7,2), adicionadas a uma mistura de soro fetal bovino (SFB – 90%) (GIBCO Laboratories, Grand Island, NY) e DMSO (10%) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) e divididas em três alíquotas de um mL. O sangue venoso total foi centrifugado à 2.500 rpm por cinco minutos para separar as células do soro, que foi dividido em cinco alíquotas. O armazenamento desses espécimes foi feito em freezer –70°C ou em nitrogênio líquido (QUEIRÓZ *et al.*, 2002).

3.4. Pesquisa de lectina ligante de manose (LLM)

Oitenta e uma amostras de soro de crianças menores de cinco anos de idade com infecção pelo VRS e 40 de controles (Tabela I) foram testadas conforme instruções do fabricante do kit

Tabela I: Distribuição por grupo das 212 amostras coletadas de 152 crianças menores de cinco anos de idade.

Grupos	Amostra clínica		N
1	Soro	Caso	81
2	Soro	Controle	40
3	CMSP	Caso	33
4	CMSP	Controle	58

“Human LLM (Lectin Assay) ELISA test kit”, produzido por “Hbt - HyCult biotechnology b. v.” e gentilmente cedido pelo Dr. Ralph A. Tripp do “Center for Disease Intervention, Department of Infectious Diseases, University of Georgia, College of Veterinary Medicine, Athens, GA, USA”. Para análise estatística utilizou-se os programas Microplate Manager® 4.0, GraphPad Prism® 3.00 e Microsoft® Excel 2003. Diferenças entre proporções foram avaliadas pelo teste Mann-Whitney. Intervalos de 95% de confiança (IC 95%) foram calculados.

Valores de “p” menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significantes.

3.5. Caracterização fenotípica de células mononucleares do sangue periférico (CMSP) por citometria de fluxo

CMSP de 33 casos e 58 controles (Tabela I) foram descongeladas e lavadas duas vezes com tampão específico para o teste (PBS 0,01 M – pH 7,4 livre de íons Ca^{++} e Mg^{++}). Um mL de CMSP viáveis, em concentração de $0,5-1 \times 10^6$ células/mL (determinada pela exclusão do corante azul de Trypan) foi transferido para tubos próprios para aquisição em citômetro de fluxo do tipo FACScan (Becton Dickinson Pharmingen Company San Jose, CA, USA). Aos tubos foram adicionados soro normal de camundongo, para evitar ligações inespecíficas, e anticorpos monoclonais (MAbs) anti-humano de camundongo dirigidos contra os marcadores protéicos expressos na superfície das CMSP: CD3, CD4, CD8, CD20, CD56 e HLA classe II (Becton Dickinson Pharmingen Company, San Jose, CA) (Tabela II), juntamente com um controle de isotipo negativo (*isotype control* - Becton Dickinson / Pharmingen) marcados com fluorocromos do tipo isoticianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE), ou “peridinin chlorophyll protein” (PE-Cy5), seguidos de incubação por 30 minutos, em temperatura ambiente. Após a incubação, as CMSP foram fixadas com paraformaldeído 4% e coletadas em citômetro e a análise foi feita em um programa de computador denominado CellQUEST, da mesma companhia. Os experimentos em citometria de fluxo foram realizados no Centro Regional de Hemoterapia – USP, Ribeirão Preto, SP. Os resultados foram agrupados de acordo com a idade dos pacientes e a análise estatística foi feita conforme o item anterior, com exceção do uso do programa Microplate Manager® 4.0.

Tabela II: Anticorpos monoclonais utilizados para definição das sub-populações linfocitárias.

<i>MAbs</i>	Clone	Fluorocromo(s)
CD3	UCHT1	FITC/PE
CD4	RPA-T4	PE
CD8	HIT8a	PE-Cy5
CD20	2H7	PE
CD56	B159	PE-Cy5
HLA-II	Tü39	FITC

MAbs:anticorpos monoclonais.

4. RESULTADOS

4.1. Características clínicas das crianças

Das 82 crianças com infecção pelo VRS que foram examinadas, os diagnósticos mais freqüentemente relatados foram bronquiolite (28); bronquite (11); pneumonia (9) e doença do trato respiratório superior (25). Mais de 45% (38/82) dos casos eram menores de seis meses de idade, sendo que a maioria deles foi internada (33/38) (Tabela III). Ainda, na faixa etária de 3-9 meses o sexo masculino representou 72,7%.

Tabela III: Distribuição dos casos e controles atendidos no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia entre 2000 e 2005.

Idade (meses)	VRS						Controles	
	N (Ml)	int.	não int.	DTRI	DTRS	gênero (♂/♀)	N (Ml)	gênero (♂/♀)
<1	8 (21*)	8	-	7	1	4/4	21 (1*)	12/9
1-3	17 (2)	15	2	14	2	8/9	5 (2)	3/2
3-6	13 (4)	10	3	10	2	9/4	7 (5)	2/5
6-9	9 (8)	3	6	6	3	7/2	4 (7)	3/1
9-12	5 (9)	3	2	3	2	1/4	5 (11)	2/3
12-24	19 (14)	5	14	9	9	9/10	15 (16)	8/7
≥24	11 (36)	1	10	5	6	5/6	13 (33)	4/9
Total	82	45	37	54	25	43/39	70	34/36

N: número de amostras; Ml: mediana da idade; *idade em dias; int.: internado; DTRI: doença do trato respiratório inferior; DTRS: doença do trato respiratório superior; (♂/♀): masculino/feminino.

4.2. Concentração de lectina ligante de manose

As concentrações de LLM dos casos (grupo 1) e controles (grupo 2) apresentaram valores amplamente distribuídos (Figura 2); contudo, como pode ser observado na Tabela IV, a maioria dos casos (67,9% - 55/81) apresentou uma concentração menor que 500 ng/mL (baixa/intermediária), enquanto que nos controles foi detectada em 40%. Além disso, ainda na Tabela IV, comparando as medianas das concentrações de LLM entre os grupos 1 e 2, observa-se que os casos apresentaram um valor inferior ao dos controles ($p=0,018$).

Tabela IV: Distribuição dos casos e controles de acordo com a concentração de lectina ligante de manose.

LLM (ng/mL)	VRS - grupo 1		Controle - grupo 2		valor de p
	N (%)	mediana	N (%)	mediana	
<50	8 (9,9%)	9,6	2 (5,0%)	24,1	
50-499	47 (58,0%)	176,9	14 (35,0%)	232,0	
≥500	26 (32,1%)	>1.500*	24 (60,0%)	1.312,9	
Total	81 (100,0%)	300,2	40 (100,0%)	817,5	0,018

*Valor da mediana acima de 1.500 ng/mL.

Extratificando por idade (Figura 2), observa-se que para os recém-nascidos, a mediana de LLM dos casos foi semelhante a dos controles, enquanto que a partir dos 24 meses, a mediana dos casos foi menor ($p=0,034$).

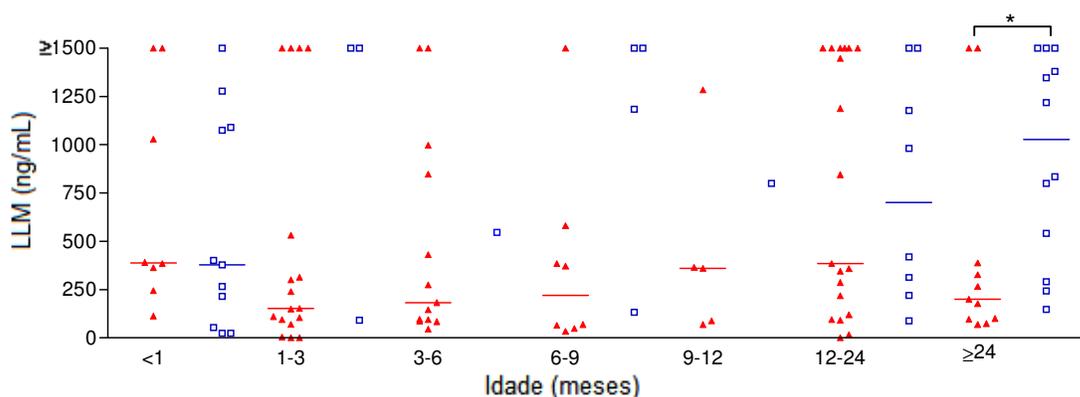


Figura 2: Medianas dos níveis de LLM no soro de casos e controles distribuídas por idade. ▲: casos; □: controles; *: $p=0,034$.

Não foi observada diferença estatística entre os níveis de LLM dos casos internados e dos não internados.

4.3. Frequência de subpopulações de linfócitos

Na tentativa de investigar uma possível relação entre os níveis de LLM e de células da resposta imune durante a infecção, subpopulações de linfócitos do sangue periférico de pacientes com infecção pelo VRS (grupo 3) e controles (grupo 4) foram caracterizadas. Observou-se que as células T CD4⁺ eram mais freqüentes nos casos e nos controles menores de um mês de idade, comparado

com as crianças mais velhas ($p < 0,001$) (Figura 3A), havendo um declínio gradual até os seis meses de idade. Além disso, uma diferença significativa na porcentagem dessas células foi detectada entre os casos e controles a partir de 6 meses de idade ($p = 0,01$). De forma semelhante, a porcentagem de células T CD8⁺ foi menor nos casos de 6-12 meses de idade do que nos controles ($p = 0,003$), porém um aumento nesta frequência foi observado nos casos acima de um ano ($p = 0,018$) (Figura 3B). É importante notar que as maiores diferenças entre as porcentagens de linfócitos T dos casos e controles ocorreram na idade de 6-12 meses.

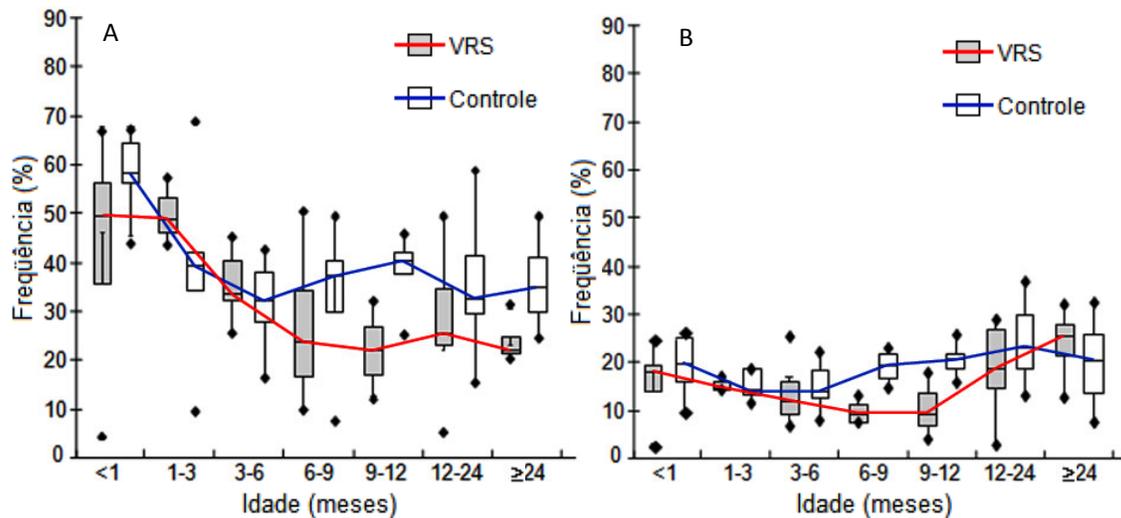


Figura 3: Medianas das porcentagens de células T CD4⁺ (3A) e T CD8⁺ (3B) no sangue periférico dos casos e controles distribuídas por idade.

Também, na tentativa de entender a diferença observada entre os casos e controles, a razão CD4⁺:CD8⁺ foi calculada (Figura 4). Observou-se razões semelhantes nos casos e nos controles menores de um mês de idade e entre 12-24 meses, sendo que nessa última faixa, a razão foi a metade do valor da primeira. No entanto, foi observado uma razão levemente maior nos casos de 3-9 meses de idade quando comparado com os controles (Figura 4). De forma

interessante, ocorreu uma inversão nessa razão para as crianças mais velhas (≥ 24 meses de idade).

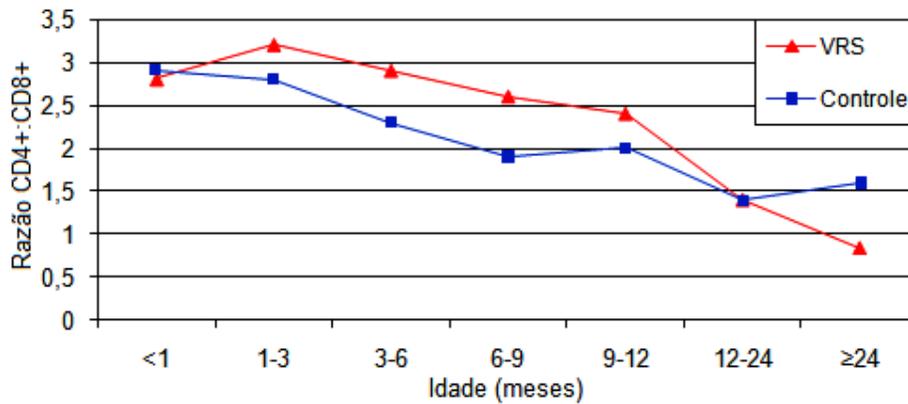


Figura 4: Comparação da razão $CD4^+ : CD8^+$ entre casos e controles distribuída por idade.

Devido às diferenças nas porcentagens de células T $CD4^+$ e T $CD8^+$ entre os casos e controles, a frequência de células $CD3^+HLA-II^+$ foi determinada nas CMSP com o intuito de verificar a porcentagem de linfócitos T ativados (Figura 5). Os resultados mostram que em todas as idades examinadas, a porcentagem de células ativadas foi estatisticamente maior nos casos do que nos controles ($p < 0,001$).

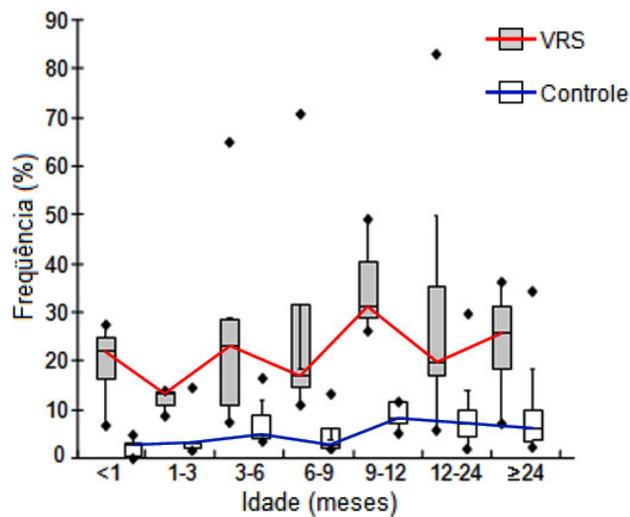


Figura 5: Medianas das porcentagens de linfócitos T ativados ($CD3^+HLA-II^+$) no sangue periférico dos casos e controles distribuídas por idade

Sendo as células *natural killer* (NK) importantes efetoras inatas anti-virais, a porcentagem de células CD56⁺ foi determinada nos dois grupos (Figura 6). Os resultados mostram que a infecção pelo VRS foi associada com porcentagens reduzidas de CD56⁺ no sangue periférico dos casos em todas as idades, comparados com os controles ($p < 0,001$). As maiores diferenças nas porcentagens de NK entre os dois grupos foram observadas nas idades de 1-3 e 6-9 meses, quando nos controles houve uma elevação na frequência dessas células.

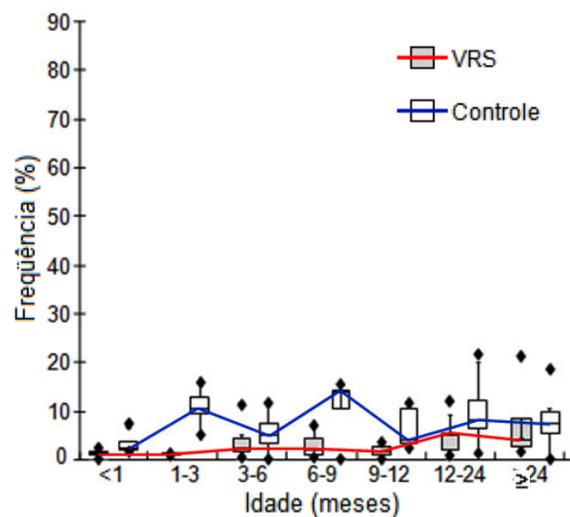


Figura 6: Medianas das porcentagens de células *natural killer* no sangue periférico dos casos e controles distribuídas por idade.

O exame de células B CD20⁺HLA-II⁺ das CMSP não mostrou diferença significativa entre os casos e os controles.

5. DISCUSSÃO

Para melhor compreender a resposta imune contra o VRS durante a infecção aguda em crianças menores de cinco anos de idade, foram examinados aspectos da resposta imune inata e adaptativa em amostras de soro e em células mononucleares do sangue periférico (CMSP) desses pacientes e de controles. Também houve um esforço para tentar relacionar os resultados de lectina ligante de manose (LLM) com porcentagens de subpopulações de linfócitos. É importante notar algumas limitações do estudo: (i) o baixo número de controles em idades específicas; (ii) as amostras de CMSP das crianças com infecção e controles não puderam ser testadas na mesma época e; (iii) as amostras das crianças com infecção foram coletadas no período de 1-5 dias dos sintomas. Apesar destas limitações, várias observações importantes foram obtidas.

O fato de que mais da metade dos pacientes com infecção tinha menos que seis meses de idade está de acordo com relatos prévios (QUEIRÓZ *et al.*, 2002; MOURA *et al.*, 2003), sugerindo que os neonatos são mais susceptíveis à doença grave pelo VRS. Há sugestão de que as crianças deficientes em LLM seriam as mais afetadas pela infecção, uma vez que aventou-se a possibilidade de essa proteína desempenhar proteção no período em que os anticorpos maternos decrescem e frente a uma imunidade adaptativa ainda imatura (KOCH *et al.*, 2001).

Quanto aos níveis de LLM no soro, a observação de que quase 70% dos casos apresentaram baixos níveis (<500 ng/mL), comparado com os 40% nos controles difere de um estudo da África, que relatou níveis semelhantes de LLM entre as crianças com infecção pelo VRS e os controles (KRISTENSEN *et al.*,

2004). Essa divergência pode ser explicada por diferentes fatores, incluindo gravidade da doença, possibilidade de co-infecção, infecção por diferentes cepas do VRS, assim como a frequência dos haplótipos de LLM, que varia entre as populações do mundo (CASANOVA, ABEL, 2004). No estudo africano, 89% dos casos e 91% dos controles apresentaram genótipos ligados à maior expressão de LLM, enquanto que em um estudo em crianças saudáveis desenvolvido no Brasil, 60% delas apresentaram os mesmos tipos de genótipos (CHAGAS *et al.*, 2004). Além disso, os sete haplótipos conhecidos do gene responsável pela lectina (*MBL2*) também foram encontrados nas crianças desse estudo no Brasil, um fato que pode estar ligado a grande variação dos níveis de LLM nos casos e nos controles, encontrados neste estudo de Uberlândia, MG. Apesar dessa variação, os fatos de (i) aproximadamente 70% das crianças com infecção pelo VRS apresentarem LLM <500 ng/mL (baixa/intermediária), (ii) a mediana de LLM dos casos em todas as faixas etárias também ser <500 ng/mL e, (iii) nos casos e controles maiores que 24 meses ter-se observado diferença entre as medianas de LLM, podem indicar a importância desta proteína na doença pelo VRS.

Já foi relatado que os níveis de LLM são relativamente estáveis durante a vida e que apresentam um modesto e lento aumento durante uma infecção (THIEL *et al.*, 2006), no entanto, uma grande variação nos níveis de LLM foi observada durante a resposta aguda por sepse e choque séptico (DEAN *et al.*, 2005). Apesar dessa contradição e das limitações inerentes a este estudo, os resultados apontam para a sugestão de que um baixo nível de LLM pode ser um dos fatores predisponentes para um indivíduo desenvolver doença durante a infecção pelo VRS. Contudo, não se sabe se baixos níveis dessa proteína têm uma explicação genética ou se seria uma estratégia viral de evasão do sistema

imune. Porém, é sabido que a infecção pelo VRS em humanos modifica a resposta imune celular (TRIPP *et al.*, 2002; BECKER, 2006). O decréscimo gradual de linfócitos T CD4⁺ no sangue periférico até os seis meses de idade também foi observado por Queiróz *et al.* (2002). Essa alteração pode estar ligada aos altos níveis de IFN- α na corrente sanguínea dos lactentes (CHIBA *et al.*, 1987) e/ou por causa de uma produção reduzida de IL-12 por células T nos neonatos e baixa ativação do fator nuclear-kappa B (NF- κ B) (KILPINEN, HURME, 1998). Uma possível explicação para a menor porcentagem de células T CD4⁺ nos casos a partir de seis meses de idade comparados com os controles é que a produção de IFN- α por células mononucleares infectadas pelo VRS (PRESTON *et al.*, 1995) pode inibir a expansão dessas células. O aumento das células T CD8⁺ observado para os casos a partir dos 12 meses de idade pode ter sido causado por infecção repetida associada ao desenvolvimento de memória imunológica (CHIBA *et al.*, 1989). Isto contribuiria para uma resposta mais rápida contra a infecção.

Apesar dessas alterações nas células T CD4⁺ e CD8⁺, observou-se uma frequência significativamente maior de linfócitos T ativados [fenótipo CD3⁺HLA-II⁺ (REA *et al.*, 1999; IKINCIÖGULLARI *et al.*, 2004)] nas crianças com infecção pelo VRS comparado com os controles. Este achado indica que baixos níveis de LLM não interferiram de forma significativa na ativação da resposta celular.

Um outro aspecto importante foi a baixa porcentagem de células *natural killer* CD56⁺ (NK) dos casos quando comparado com os controles, que também foi observado por Tripp *et al.* (2002) para o subtipo CD16⁺CD56⁺. Sendo as células NK importantes efetoras da resposta imune inata, hipotetiza-se que parte delas tenha sido recrutada para o pulmão para assistir à infecção.

Apesar de não ter sido observado alterações significativas na frequência de linfócitos B no sangue periférico comparando casos e controles, sabe-se que estas células proliferam-se nos linfonodos durante as infecções, onde os antígenos são apresentados à elas (ABBAS *et al.*, 2003).

Finalizando, entende-se que para melhor compreender a associação entre níveis de LLM e a resposta imune adaptativa, é necessário um maior número de amostras de casos e controles, assim como estudos que caracterizem o gene *MBL2* e o relacione com os níveis dessa proteína tanto em casos como em controles. Apesar das limitações, este estudo apresenta evidências do papel da LLM na imunidade contra o VRS e na patogênese da infecção.

Este é o primeiro estudo que relaciona níveis de LLM com aspectos da resposta imune celular contra o VRS e também é o primeiro do estado de Minas Gerais neste assunto.

6. CONCLUSÕES

- Durante a infecção primária pelo vírus respiratório sincicial (VRS), crianças menores de seis meses de idade desenvolvem quadros clínicos mais graves do que as crianças mais velhas.
- Os baixos níveis de lectina ligante de manose (LLM) parecem estar associados a uma maior predisposição à doença pelo VRS em crianças menores de cinco anos de idade.
- Os baixos níveis de LLM não impedem que linfócitos T sejam ativados durante a infecção pelo VRS nas crianças menores de cinco anos de idade.
- A frequência de linfócitos T CD4⁺ decresce gradualmente até os seis meses de idade.
- A frequência de linfócitos T CD8⁺ aumenta nas crianças com infecção pelo VRS a partir dos 12 meses de idade.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K., A. H. LICHTMAN e J. S. POBER. **Cellular and molecular immunology**. Philadelphia: Saunders. 2003. 562 p. p.

ALWAN, W. H., W. J. KOZLOWSKA e P. J. OPENSHAW. Distinct types of lung disease caused by functional subsets of antiviral T cells. **J Exp Med**, v.179, n.1, Jan 1, p.81-9. 1994.

ANDERSON, L. J., J. C. HIERHOLZER, C. TSOU, R. M. HENDRY, B. F. FERNIE, Y. STONE e K. MCINTOSH. Antigenic characterization of respiratory syncytial virus strains with monoclonal antibodies. **J Infect Dis**, v.151, n.4, Apr, p.626-33. 1985.

BECKER, Y. Respiratory syncytial virus (RSV) evades the human adaptive immune system by skewing the Th1/Th2 cytokine balance toward increased levels of Th2 cytokines and IgE, markers of allergy-a review. **Virus Genes**, v.33, n.2, Oct, p.235-52. 2006.

BLUE, C. E., O. B. SPILLER e D. J. BLACKBOURN. The relevance of complement to virus biology. **Virology**, v.319, n.2, Feb 20, p.176-84. 2004.

BOUWMAN, L. H., B. O. ROEP e A. ROOS. Mannose-binding lectin: clinical implications for infection, transplantation, and autoimmunity. **Hum Immunol**, v.67, n.4-5, Apr-May, p.247-56. 2006.

CALEGARI, T., D. A. O. QUEIRÓZ, J. YOKOSAWA, H. L. SILVEIRA, L. F. COSTA, T. F. M. OLIVEIRA, L. N. LUIZ, R. C. OLIVEIRA, F. C. DINIZ, L. M. G. ROSSI, C. J. CARVALHO, A. C. LIMA e O. C. MANTESE. Clinical-epidemiological evaluation of respiratory syncytial virus infection in children attended in a public hospital in midwestern Brazil. **Braz J Infect Dis**, v.9, n.2, Apr, p.156-61. 2005.

CASANOVA, J. L. e L. ABEL. Human Mannose-binding Lectin in Immunity: Friend, Foe, or Both? **J Exp Med**, v.199, n.10, May 17, p.1295-9. 2004.

CASTELLANO, G., A. M. WOLTMAN, F. P. SCHENA, A. ROOS, M. R. DAHA e C. VAN KOOTEN. Dendritic cells and complement: at the cross road of innate and adaptive immunity. **Mol Immunol**, v.41, n.2-3, Jun, p.133-40. 2004.

CEDZYNSKI, M., J. SZEMRAJ, A. S. SWIERZKO, L. BAK-ROMANISZYN, M. BANASIK, K. ZEMAN e D. C. KILPATRICK. Mannan-binding lectin insufficiency in children with recurrent infections of the respiratory system. **Clin Exp Immunol**, v.136, n.2, May, p.304-11. 2004.

CHAGAS, K. N., R. STEFFENSEN, M. S. C. FERRAO, M. DELLANEGRA, A. J. S. DUARTE, R. RUTZ, M. KIRSCHFINK, J. C. JENSENIUS e A. S. GRUMACH. MBL2 gene and serum MBL levels in Brazilian children. **Molecular Immunology**, v.41, p.101-2. 2004.

CHANOCK, R. e L. FINBERG. Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent (CCA). II. Epidemiologic aspects of infection in infants and young children. **Am J Hyg**, v.66, n.3, Nov, p.291-300. 1957.

CHIBA, Y., Y. HIGASHIDATE, K. SUGA, K. HONJO, H. TSUTSUMI e P. L. OGRA. Development of cell-mediated cytotoxic immunity to respiratory syncytial virus in human infants following naturally acquired infection. **J Med Virol**, v.28, n.3, Jul, p.133-9. 1989.

CHIBA, Y., T. MINAGAWA, K. MITO, A. NAKANE, K. SUGA, T. HONJO e T. NAKAO. Effect of breast feeding on responses of systemic interferon and virus-specific lymphocyte transformation in infants with respiratory syncytial virus infection. **J Med Virol**, v.21, n.1, Jan, p.7-14. 1987.

COLLINS, P. L., M. K. e H. GROSFELD. Respiratory syncytial virus. v.93, n.1, Jan 9, p.81-5. 1996.

CROWE, J. E., JR. Respiratory syncytial virus vaccine development. **Vaccine**, v.20 Suppl 1, Oct 15, p.S32-7. 2001.

DEAN, M. M., R. M. MINCHINTON, S. HEATLEY e D. P. EISEN. Mannose binding lectin acute phase activity in patients with severe infection. **J Clin Immunol**, v.25, n.4, Jul, p.346-52. 2005.

DENNY, F. W., JR. The clinical impact of human respiratory virus infections. **Am J Respir Crit Care Med**, v.152, n.4 Pt 2, Oct, p.S4-12. 1995.

ENGLUND, J. In search of a vaccine for respiratory syncytial virus: the saga continues. **J Infect Dis**, v.191, n.7, Apr 1, p.1036-9. 2005.

EPSTEIN, J., Q. EICHBAUM, S. SHERIFF e R. A. EZEKOWITZ. The collectins in innate immunity. **Curr Opin Immunol**, v.8, n.1, Feb, p.29-35. 1996.

EZEKOWITZ, R. A., J. AUSTYN, P. D. STAHL e S. GORDON. Surface properties of bacillus Calmette-Guerin-activated mouse macrophages. Reduced expression of mannose-specific endocytosis, Fc receptors, and antigen F4/80 accompanies induction of Ia. **J Exp Med**, v.154, n.1, Jul 1, p.60-76. 1981.

FISCHER, G. B., A. TEPER e A. J. COLOM. Acute viral bronchiolitis and its sequelae in developing countries. **Paediatr Respir Rev**, v.3, n.4, Dec, p.298-302. 2002.

FRASER, I. P., H. KOZIEL e R. A. EZEKOWITZ. The serum mannose-binding protein and the macrophage mannose receptor are pattern recognition molecules that link innate and adaptive immunity. **Semin Immunol**, v.10, n.5, Oct, p.363-72. 1998.

GIRARD, M. P., T. CHERIAN, Y. PERVIKOV e M. P. KIENY. A review of vaccine research and development: human acute respiratory infections. **Vaccine**, v.23, n.50, Dec 30, p.5708-24. 2005.

GLEZEN, W. P., L. H. TABER, A. L. FRANK e J. A. KASEL. Risk of primary infection and reinfection with respiratory syncytial virus. **Am J Dis Child**, v.140, n.6, Jun, p.543-6. 1986.

GRIMALDI, M., B. GOUYON, P. SAGOT, C. QUANTIN, F. HUET e J. B. GOUYON. Palivizumab efficacy in preterm infants with gestational age ≤ 30 weeks without bronchopulmonary dysplasia. **Pediatr Pulmonol**, v.42, n.3, Mar, p.189-92. 2007.

HACIMUSTAFAOGLU, M., S. CELEBI, E. AYNACI, M. SINIRTAS, N. KOKSAL, A. KUCUKERDOGAN, I. ERCAN, G. GORAL e I. ILDIRIM. The progression of maternal RSV antibodies in the offspring. **Arch Dis Child**, v.89, n.1, Jan, p.52-3. 2004.

HEIKKINEN, T., M. WARIS, O. RUUSKANEN, A. PUTTO-LAURILA e J. MERTSOLA. Incidence of acute otitis media associated with group A and B respiratory syncytial virus infections. **Acta Paediatr**, v.84, n.4, Apr, p.419-23. 1995.

HOLBERG, C. J., A. L. WRIGHT, F. D. MARTINEZ, C. G. RAY, L. M. TAUSSIG e M. D. LEBOWITZ. Risk factors for respiratory syncytial virus-associated lower respiratory illnesses in the first year of life. **Am J Epidemiol**, v.133, n.11, Jun 1, p.1135-51. 1991.

HUSSELL, T., C. J. BALDWIN, A. O'GARRA e P. J. OPENSHAW. CD8⁺ T cells control Th2-driven pathology during pulmonary respiratory syncytial virus infection. **Eur J Immunol**, v.27, n.12, Dec, p.3341-9. 1997.

IKEDA, K., T. SANNOH, N. KAWASAKI, T. KAWASAKI e I. YAMASHINA. Serum lectin with known structure activates complement through the classical pathway. **J Biol Chem**, v.262, n.16, Jun 5, p.7451-4. 1987.

IKINCIÖGULLARI, A., T. KENDIRLI, F. DOGU, Y. EGIN, I. REISLI, S. CIN e E. BABACAN. Peripheral blood lymphocyte subsets in healthy Turkish children. **Turk J Pediatr**, v.46, n.2, Apr-Jun, p.125-30. 2004.

KAWASAKI, T. Structure and biology of mannan-binding protein, MBP, an important component of innate immunity. **Biochim Biophys Acta**, v.1473, n.1, Dec 6, p.186-95. 1999.

KILPINEN, S. e M. HURME. Low CD3+CD28-induced interleukin-2 production correlates with decreased reactive oxygen intermediate formation in neonatal T cells. **Immunology**, v.94, n.2, Jun, p.167-72. 1998.

KIM, H. W., J. G. CANCHOLA, C. D. BRANDT, G. PYLES, R. M. CHANOCK, K. JENSEN e R. H. PARROTT. Respiratory syncytial virus disease in infants despite prior administration of antigenic inactivated vaccine. **Am J Epidemiol**, v.89, n.4, Apr, p.422-34. 1969.

KOCH, A., M. MELBYE, P. SORENSEN, P. HOMOE, H. O. MADSEN, K. MOLBAK, C. H. HANSEN, L. H. ANDERSEN, G. W. HAHN e P. GARRED. Acute respiratory tract infections and mannose-binding lectin insufficiency during early childhood. **Jama**, v.285, n.10, Mar 14, p.1316-21. 2001.

KOS, F. J. Regulation of adaptive immunity by natural killer cells. **Immunol Res**, v.17, n.3, p.303-12. 1998.

KRISTENSEN, I. A., S. THIEL, R. STEFFENSEN, S. MADHI, G. SOROUR e J. OLSEN. Mannan-binding lectin and RSV lower respiratory tract infection leading to hospitalization in children: a case-control study from Soweto, South Africa. **Scand J Immunol**, v.60, n.1-2, Jul-Aug, p.184-8. 2004.

KURATA, H., H. M. CHENG, Y. KOZUTSUMI, Y. YOKOTA e T. KAWASAKI. Role of the collagen-like domain of the human serum mannan-binding protein in the activation of complement and the secretion of this lectin. **Biochem Biophys Res Commun**, v.191, n.3, Mar 31, p.1204-10. 1993.

LEE, R. T., Y. ICHIKAWA, M. FAY, K. DRICKAMER, M. C. SHAO e Y. C. LEE. Ligand-binding characteristics of rat serum-type mannose-binding protein (MBP-A). Homology of binding site architecture with mammalian and chicken hepatic lectins. **J Biol Chem**, v.266, n.8, Mar 15, p.4810-5. 1991.

MATSUSHITA, M., Y. ENDO e T. FUJITA. Cutting edge: complement-activating complex of ficolin and mannose-binding lectin-associated serine protease. **J Immunol**, v.164, n.5, Mar 1, p.2281-4. 2000.

MITCHELL, I., S. TOUGH, L. GILLIS e C. MAJAESIC. Beyond randomized controlled trials: a "real life" experience of respiratory syncytial virus infection prevention in infancy with and without palivizumab. **Pediatr Pulmonol**, v.41, n.12, Dec, p.1167-74. 2006.

MORGAN, B. P., K. J. MARCHBANK, M. P. LONGHI, C. L. HARRIS e A. M. GALLIMORE. Complement: central to innate immunity and bridging to adaptive responses. **Immunol Lett**, v.97, n.2, Mar 15, p.171-9. 2005.

MOURA, F. E., L. C. BORGES, S. A. PORTES, E. A. RAMOS e M. M. SIQUEIRA. Respiratory syncytial virus infections during an epidemic period in Salvador, Brazil. Viral antigenic group analysis and description of clinical and epidemiological aspects. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.98, n.6, Sep, p.739-43. 2003.

MURPHY, B. R. e E. E. WALSH. Formalin-inactivated respiratory syncytial virus vaccine induces antibodies to the fusion glycoprotein that are deficient in fusion-inhibiting activity. **J Clin Microbiol**, v.26, n.8, Aug, p.1595-7. 1988.

NUIJTEN, M. J., W. WITTENBERG e M. LEBMEIER. Cost effectiveness of palivizumab for respiratory syncytial virus prophylaxis in high-risk children: a UK analysis. **Pharmacoeconomics**, v.25, n.1, p.55-71. 2007.

OPENSHAW, P. J. e J. S. TREGONING. Immune responses and disease enhancement during respiratory syncytial virus infection. **Clin Microbiol Rev**, v.18, n.3, Jul, p.541-55. 2005.

PALOMO, C., P. A. CANE e J. A. MELERO. Evaluation of the antibody specificities of human convalescent-phase sera against the attachment (G) protein of human respiratory syncytial virus: influence of strain variation and carbohydrate side chains. **J Med Virol**, v.60, n.4, Apr, p.468-74. 2000.

PIEDRA, P. A., A. M. JEWELL, S. G. CRON, R. L. ATMAR e W. P. GLEZEN. Correlates of immunity to respiratory syncytial virus (RSV) associated-hospitalization: establishment of minimum protective threshold levels of serum neutralizing antibodies. **Vaccine**, v.21, n.24, Jul 28, p.3479-82. 2003.

POLACK, F. P. e R. A. KARRON. The future of respiratory syncytial virus vaccine development. **Pediatr Infect Dis J**, v.23, n.1 Suppl, Jan, p.S65-73. 2004.

PRESTON, F. M., P. L. BEIER e J. H. POPE. Identification of the respiratory syncytial virus-induced immunosuppressive factor produced by human peripheral blood mononuclear cells in vitro as interferon-alpha. **J Infect Dis**, v.172, n.4, Oct, p.919-26. 1995.

QUEIRÓZ, D. A. O., E. L. DURIGON, V. F. BOTOSSO, B. EJZEMBERG, S. E. VIEIRA, J. R. MINEO, C. YAMASHITA, N. HEIN, C. L. LOPES, A. L. CACHARO e K. E. STEWIEN. Immune response to respiratory syncytial virus in young Brazilian children. **Braz J Med Biol Res**, v.35, n.10, Oct, p.1183-93. 2002.

REA, I. M., S. E. MCNERLAN e H. D. ALEXANDER. CD69, CD25, and HLA-DR activation antigen expression on CD3+ lymphocytes and relationship to serum TNF-alpha, IFN-gamma, and sIL-2R levels in aging. **Exp Gerontol**, v.34, n.1, Jan, p.79-93. 1999.

STRALIOTTO, S. M., B. ROITMAN, J. B. LIMA, G. B. FISCHER e M. M. SIQUEIRA. Respiratory syncytial virus (RSV) bronchiolitis: comparative study of

RSV groups A and B infected children. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.27, n.1, Jan-Mar, p.1-4. 1994.

SULLENDER, W. M. Respiratory syncytial virus genetic and antigenic diversity. **Clin Microbiol Rev**, v.13, n.1, Jan, p.1-15, table of contents. 2000.

SUPER, M., S. D. GILLIES, S. FOLEY, K. SASTRY, J. E. SCHWEINLE, V. J. SILVERMAN e R. A. EZEKOWITZ. Distinct and overlapping functions of allelic forms of human mannose binding protein. **Nat Genet**, v.2, n.1, Sep, p.50-5. 1992.

THIEL, S., P. D. FREDERIKSEN e J. C. JENSENIUS. Clinical manifestations of mannan-binding lectin deficiency. **Mol Immunol**, v.43, n.1-2, Jan, p.86-96. 2006.

THIEL, S., T. VORUP-JENSEN, C. M. STOVER, W. SCHWAEBLE, S. B. LAURSEN, K. POULSEN, A. C. WILLIS, P. EGGLETON, S. HANSEN, U. HOLMSKOV, K. B. REID e J. C. JENSENIUS. A second serine protease associated with mannan-binding lectin that activates complement. **Nature**, v.386, n.6624, Apr 3, p.506-10. 1997.

TRIPP, R. A., D. MOORE, A. T. BARSKEY, L. JONES, C. MOSCATIELLO, H. KEYSERLING e L. J. ANDERSON. Peripheral blood mononuclear cells from infants hospitalized because of respiratory syncytial virus infection express T helper-1 and T helper-2 cytokines and CC chemokine messenger RNA. **J Infect Dis**, v.185, n.10, May 15, p.1388-94. 2002.

VAN DE WETERING, J. K., L. M. VAN GOLDE e J. J. BATENBURG. Collectins: players of the innate immune system. **Eur J Biochem**, v.271, n.7, Apr, p.1229-49. 2004.

WALSH, E. E., K. M. MCCONNOCHIE, C. E. LONG e C. B. HALL. Severity of respiratory syncytial virus infection is related to virus strain. **J Infect Dis**, v.175, n.4, Apr, p.814-20. 1997.

WARIS, M. E., C. TSOU, D. D. ERDMAN, D. B. DAY e L. J. ANDERSON. Priming with live respiratory syncytial virus (RSV) prevents the enhanced pulmonary inflammatory response seen after RSV challenge in BALB/c mice immunized with formalin-inactivated RSV. **J Virol**, v.71, n.9, Sep, p.6935-9. 1997.

WARIS, M. E., C. TSOU, D. D. ERDMAN, S. R. ZAKI e L. J. ANDERSON. Respiratory syncytial virus infection in BALB/c mice previously immunized with formalin-inactivated virus induces enhanced pulmonary inflammatory response with a predominant Th2-like cytokine pattern. **J Virol**, v.70, n.5, May, p.2852-60. 1996.

ANEXO A

Termo de consentimento livre e esclarecido

Pesquisa de vírus respiratórios e caracterização molecular de amostras do Vírus Respiratório Sincicial (VRS) em secreções respiratórias de crianças de 0-5 anos de idade de regiões do Triângulo Mineiro, MG

Local: Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia

Sr. Pais/Responsáveis,

Solicitamos sua autorização para coleta de material – secreção das narinas e/ou traqueobrônquica e sangue de seu filho para pesquisar o agente viral responsável pela doença respiratória aguda que acomete crianças, principalmente na idade até os cinco anos.

A detecção do agente viral que está causando a infecção em seu filho poderá auxiliar o médico a tratá-lo e também fornecer informações científicas a respeito da circulação dos principais vírus respiratórios em nossa região.

Se a coleta deste material for do seu consentimento, favor assinar este documento.

Uberlândia: ___/___/___

Nome do pai (mãe) ou responsável: _____

Assinatura: _____

Médicos colaboradores/responsáveis: _____

Profs. Drs. Orlando César Mantese e Hélio Lopes da Silveira

Coordenadora do Projeto:

Profª. Dra. Divina Aparecida O. Queiróz

ANEXO B

Ficha clínica - projeto vírus respiratórios

Atendimento: ___/___/___

Prontuário: _____

Nome: _____

Sexo: M () F ()

Data do nascimento: ___/___/___

Duração da gestação: _____ semanas (definir se é pré-termo ou não)

Pais fumantes: sim não Pais atópicos: sim não

Presença de doença de base (descrever qual patologia presente)

Cardiopatia sim não

Displasia broncopulmonar sim não

Imunodeficiência sim não

Outras (definir qual) sim não

Descrição sumária do quadro clínico:

Febre (duração): _____ Dor de garganta: sim não

Coriza (duração): _____ Dor no corpo sim não

Tosse (duração): _____ Mal estar sim não

Secreção e hiperemia ocular: _____ Espirros sim não

Outros: _____

Frequência respiratória: _____ irpm

Apnéia no P.S. ou durante internação (>20 seg c/ cianose ou bradicardia): sim não

Chiado (sibilos): sim não

Murmúrio vesicular:

Retrações torácicas (tiragens): sim não

Gasometria arterial sat. O₂ em ar ambiente e com O₂

PCO₂ / pH

RX de tórax hiperinsuflação sim não

Consolidação sim não

Atelectasia sim não

Admissão: ___/___/___ enfermaria UTI

Ventilação artificial: sim (número de dias: _____) não

HD: _____

ANEXO C



Universidade Federal de Uberlândia

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Av. João Naves de Ávila, n.º 2160 - Bloco J - Campus Santa Mônica - Uberlândia-MG -
CEP -38400-089 ☎(034) 239 4131 - 235-2078

PARECER COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA N.º 0018/2000

PROJETO DE PESQUISA: “Caracterização molecular de amostras do Vírus Respiratório Sincicial Humano (VRS) a avaliação da resposta imune em crianças de 0-2 anos de idade de regiões do Triângulo Mineiro”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Divina ^a O. Queiroz

INSTITUIÇÃO: -UFU

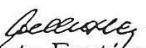
MÉRITO:

De março de 2000 a agosto de 2001 espécimes clínicos serão coletados, de 2ª a 5ª feira, de cerca de 500 crianças de 0-2 anos de idade, atendidas no Hospital de Clínicas em Uberlândia-MG, provenientes da cidade e outras regiões urbanas e rurais da região, após o consentimento expresso dos pais e responsáveis.

PARECER:

O projeto não trará nenhum prejuízo para as pessoas envolvidas. Somos de parecer favorável à sua execução.

Uberlândia 14 de abril de 2000.


Prof. Humberto Eustáquio Coelho
Coordenador do CEP – UFU

ANEXO D

Universidade Federal de Uberlândia

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Av. João Naves de Ávila, n.º 2160 - Bloco J - Campus Santa Mônica - Uberlândia-MG -
CEP -38400-089 ☎ (034) 239 4131 - 235-2078

Uberlândia, 24 de setembro de 2001.

Processo nº 018/2000- 2ª fase

PROJETO DE PESQUISA: “Caracterização Molecular de amostras do Vírus Respiratório Sincicial humano (VRSH) e avaliação da resposta imune em crianças de 0-2 anos de idade de regiões do Triângulo Mineiro”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Divina aparecida Oliveira Queiroz

O projeto acima identificado, foi **aprovado** para ser realizado conforme os autores se comprometem.


Prof. Miguel Tanis Jorge
CEP/UFU

ANEXO E

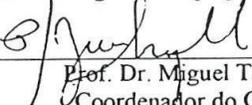
Universidade Federal de Uberlândia
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
Av. João Naves de Ávila, n.º 2160 - Bloco J - Campus Santa Mônica - Uberlândia-MG -
CEP -38400-089 ☎ (034) 239 4131 - 235-2078
PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA DE Nº
007/2003

Ilma. Sra. Uberlândia, 07 de fevereiro de 2003.
Profª. Dra. Divina Aparecida Oliveira Queiroz

Prezada Professora,

Informamos-lhe, que o Comitê de Ética da Universidade Federal de Uberlândia, examinou e **APROVOU** sem restrição de ordem ética, o projeto de pesquisa "Detecção de vírus respiratórios por reação de polimerização em cadeia (PCR) em secreções de nasofaringe de crianças de 0-5 anos de idade, residentes no Triângulo Mineiro", cuja vigência será de julho de 2003 a junho de 2005, protocolado sob o número 018/2000 do qual V.Sa. figura como pesquisador responsável.

Em adendo, informamos que o prazo para entrega de relatório final é de 120 dias após o término da execução prevista no cronograma do projeto, conforme norma da Res. 196/96/CNS.



Prof. Dr. Miguel Tanús Jorge
Coordenador do CEP/UFU

IX.2 - Ao pesquisador cabe:

a) apresentar o protocolo, devidamente instruído ao CEP, aguardando o pronunciamento deste, antes de iniciar a pesquisa;

b) desenvolver o projeto conforme delineado;

c) elaborar e apresentar os relatórios parciais e final;

d) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento;

e) manter em arquivo, sob sua guarda, por 5 anos, os dados da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP;

f) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto;

g) justificar, perante o CEP, interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Responsabilidades do Pesquisador:

a) Reafirma-se a responsabilidade indelegável e intransferível do pesquisador nos termos da Resolução 196/96. Da mesma forma, reafirmam-se todas as responsabilidades previstas na referida Resolução, em particular a garantia de condições para o atendimento dos sujeitos da pesquisa.

III - RESPONSABILIDADE DO PESQUISADOR

III.1 - Reafirma-se a responsabilidade indelegável e intransferível do pesquisador nos termos da Resolução 196/96. Da mesma forma reafirmam-se todas as responsabilidades previstas na referida Resolução, em particular a garantia de condições para o atendimento dos sujeitos da pesquisa.

III.2 - O pesquisador responsável deverá:

a - Apresentar ao Comitê de Ética em Pesquisa - CEP - o projeto de pesquisa completo, nos termos da Resolução, 196/96 e desta Resolução.

b - Manter em arquivo, respeitando a confidencialidade e o sigilo as fichas correspondentes a cada sujeito incluído na pesquisa, por 5 anos, após o término da pesquisa.

c - Apresentar relatório detalhado sempre que solicitado ou estabelecido pelo CEP, pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP ou pela Secretaria de Vigilância Sanitária - SVS/MS.

d - Comunicar ao CEP a ocorrência de efeitos colaterais e ou de reações adversas não esperadas.

e - Comunicar também propostas de eventuais modificações no projeto e ou justificativa de interrupção, aguardando a apreciação do CEP, exceto em caso urgente para salvaguardar a proteção dos sujeitos da pesquisa, devendo então ser comunicado o CEP a posteriori, na primeira oportunidade.

f - Colocar à disposição, do CEP, da CONEP e da SVS/MS toda informação devidamente requerida.

g - Proceder à análise contínua dos resultados, à medida que prossegue a pesquisa, com o objetivo de detectar o mais cedo possível benefícios de um tratamento sobre outro ou para evitar efeitos adversos em sujeitos de pesquisa.

h - Apresentar relatórios periódicos dentro de prazos estipulados pelo CEP havendo no mínimo, relatório semestral e relatório final.

i - Dar acesso aos resultados de exames e de tratamento ao médico do paciente e ou ao próprio paciente sempre que solicitado e ou indicado

J - Recomendar que a mesma pessoa não seja sujeito de pesquisa em novo projeto antes de decorrido um ano de sua participação em pesquisa anterior, a menos que possa haver benefício direto ao sujeito da pesquisa.

ANEXO F

Termo de consentimento livre e esclarecido

Pesquisa de marcadores imunológicos em amostras de sangue de crianças de 0-5 anos de idade de regiões do Triângulo Mineiro, MG

Local: Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia

Sr. Pais/Responsáveis,

O vírus respiratório sincicial é considerado o mais importante agente causador de doença respiratória grave em crianças, principalmente nas menores de um ano de idade. Por essa razão, o Laboratório de Virologia da UFU vem desenvolvendo pesquisa nesse assunto, tentando contribuir para o desenvolvimento de uma vacina eficaz contra esse vírus.

Diante do exposto, a continuidade do estudo depende de amostras de sangue de aproximadamente 60 crianças, isentas de processos inflamatórios e infecciosos, que possam ser utilizadas como controle dos casos clínicos, admitidas ou atendidas no Hospital de Clínicas (Pronto Socorro, Enfermaria, UTI e Berçário). Cada amostra será constituída de uma alíquota de 5 mL da amostra de sangue a ser obtida por recomendação médica para exames de rotina.

Se a obtenção desta alíquota for do seu consentimento, por gentileza queira assinar este documento.

Uberlândia: ___/___/___

Nome do pai (mãe) ou responsável: _____

Assinatura: _____

Médicos colaboradores/responsáveis: _____

Profs. Drs. Orlando César Mantese e Hélio Lopes da Silveira

Coordenadora do Projeto:

Profa. Dra. Divina Aparecida O. Queiróz

ANEXO G



Universidade Federal de Uberlândia
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP
Av. João Naves de Ávila, nº 2160 - Bloco J - Campus Santa Mônica - Uberlândia-MG -
CEP 38400-089 - FONE/FAX (034) 239-4131

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA Nº 260/04

Registro CEP: 151/04

Projeto Pesquisa: *“Quantificação de lecitina ligante de monose em amostras de soro obtidas de crianças menores de 5 anos de idade com e sem infecção pelo vírus respiratório sincicial”.*

Pesquisador Responsável: Orlando César Mantese

De acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, o CEP manifesta-se pela aprovação, do projeto de pesquisa proposto.

Situação: Projeto aprovado.

Uberlândia, 05 de novembro de 2004.


Prof. Dr. Alcino Eduardo Bonella
Coordenador do CEP/UFU

Orientações ao pesquisador:

(Para parecer Aprovado ou Aprovado com Recomendações)

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 - Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.3.z), aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa (Item V.3) que requeiram ação imediata.
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, item III.2.e). O prazo para entrega de relatório é de 120 dias após o término da execução prevista no cronograma do projeto, conforme norma da Res. 196/96 CNS.

ANEXO H



Universidade Federal de Uberlândia
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP
Av. João Naves de Ávila, nº 2160 - Bloco J - Campus Santa Mônica - Uberlândia-MG -
CEP 38400-089 - FONE/FAX (034) 239-4131

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA Nº 262/04

Registro CEP: 150/04

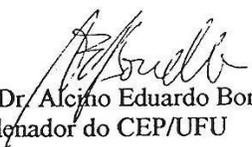
Projeto Pesquisa: *“Caracterização fenotípica de células mononucleadas de sangue periférico obtidas de crianças menores de 5 anos de idade com e sem infecção pelo vírus respiratório sincicial”*.

Pesquisador Responsável: Orlando César Mantese

De acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, o CEP manifesta-se pela aprovação, do projeto de pesquisa proposto.

Situação: Projeto aprovado.

Uberlândia, 05 de novembro de 2004.


Prof. Dr. Alcino Eduardo Bonella
Coordenador do CEP/UFU

Orientações ao pesquisador:

(Para parecer Aprovado ou Aprovado com Recomendações)

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 - Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.3.z), aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa (Item V.3) que requeiram ação imediata.
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, item III.2.e). O prazo para entrega de relatório é de 120 dias após o término da execução prevista no cronograma do projeto, conforme norma da Res. 196/96 CNS.