

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 21/08/2025.



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

Vinicius Tadeu Ramos da Silva Grillo

**Heparina de alto peso molecular por via inalatória para o
tratamento de SARS-CoV-2**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia Médica.

Orientador: Prof. Dr. Matheus Bertanha

Botucatu
2023

Vinicius Tadeu Ramos da Silva Grillo

Heparina de alto peso molecular por via inalatória para
o tratamento de SARS-CoV-2

Tese apresentada à Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”, Campus de Botucatu,
para obtenção do título de Doutor em
Biotecnologia Médica.

Orientador: Prof. Dr. Matheus Bertanha

Botucatu
2023

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: MARIA CAROLINA ANDRADE CRUZ E SANTOS-CRB

Grillo, Vinicius Tadeu Ramos da Silva.

Heparina de alto peso molecular por via inalatória para o tratamento de SARS-CoV-2 / Vinicius Tadeu Ramos da Silva Grillo. - Botucatu, 2023

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Matheus Bertanha

Capes: 40102041

1. COVID-19 (Doença). 2. Heparina. 3. Agentes antivirais. 4. Ensaios clínicos.

Palavras-chave: Antiviral; COVID-19; Ensaio clínico; Heparina.

Vinicius Tadeu Ramos da Silva Grillo

Heparina de alto peso molecular por via inalatória para o tratamento de SARS-CoV-2

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para qualificação da tese para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia Médica.

Orientador: Prof. Dr. Matheus Bertanha

Comissão Examinadora da Defesa da Tese de Doutorado

Prof. Dr. Matheus Bertanha
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
UNESP

Prof. Dr. Edwaldo Edner Joviliano
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
FMRP-USP

Prof^ª. Dr^ª. Raquel Silveira Bello Stucchi
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas
UNICAMP

Suplentes:

Prof. Dr. Sebastião Pires Ferreira Filho
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
UNESP

Prof. Dr. Ronald Luiz Gomes Flumignan
Universidade Federal de São Paulo
UNIFESP

Prof. Dr. Marcus Vinícius Martins Cury
Hospital do Servidor Público Estadual de São Paulo
IAMSPE

Botucatu, 21 de Agosto de 2023

Dedicatória

Dedico este trabalho a história de todas as vítimas do COVID-19, em especial os profissionais de saúde que perderam a vida durante o combate à pandemia.

Agradecimentos

À Deus,

À minha família,

Ao meu amigo e orientador Prof. Matheus,

Aos amigos que me apoiaram nessa jornada,

Aos profissionais de saúde que trabalharam arduamente durante a pandemia,

Aos pacientes, “centro do universo médico em torno do qual todos os nossos trabalhos giram e para o qual todos os nossos esforços se direcionam” (John Benjamin Murphy).

À FAPESP por financiar (2020/12165-8) a pesquisa e contribuir com o avanço da ciência nacional.

Epígrafe

*"O que fazemos na vida ecoa na eternidade."
(General Maximus, filme Gladiador, 2000)*

Resumo

Resumo

Contexto: A heparina tem sido estudada como uma possível opção terapêutica antiviral para o tratamento de infecções por coronavírus. Neste estudo, investigamos o uso da heparina de alto peso molecular (HAPM) por via inalatória para o tratamento de pacientes com COVID-19. **Objetivos:** O objetivo geral foi avaliar a segurança e os efeitos terapêuticos da HAPM inalatória em pacientes com COVID-19. Os objetivos específicos foram investigar a ação antiviral e anti-inflamatória da HAPM inalatória, bem como sua influência nos parâmetros clínicos e laboratoriais. **Métodos:** Realizamos um ensaio clínico de fase I/II, randomizado, controlado por placebo, com participantes distribuídos aleatoriamente em grupos de tratamento (placebo ou HAPM). A inalação de HAPM ocorreu a cada 4 horas durante 7 dias. Avaliamos a segurança, os parâmetros clínicos, os exames laboratoriais e de imagem dos pacientes. **Resultados:** Dos 27 pacientes que concluíram o estudo, não foram observadas alterações nos parâmetros de coagulação sanguínea, indicando a segurança do uso da HAPM inalatória. O grupo que recebeu HAPM apresentou redução significativa na necessidade de oxigenoterapia suplementar e melhoria nos parâmetros respiratórios, como a relação PaO₂/FiO₂. Além disso, observou-se diminuição da inflamação, evidenciada pela queda dos níveis de IL-6 e pela diminuição da congestão pulmonar na tomografia. **Conclusões:** A administração inalatória da HAPM mostrou-se segura, sem impacto na coagulação sanguínea, e apresentou benefícios terapêuticos potenciais para pacientes com COVID-19. Houve melhoria nos parâmetros respiratórios e redução da inflamação. Esses resultados promissores justificam a continuação do estudo para a próxima fase, a fase II/III, a fim de avaliar ainda mais a eficácia terapêutica da HAPM inalatória no tratamento da pneumonia viral associada à COVID-19.

Palavras-chaves: COVID-19, Heparina, Antiviral, Ensaio Clínico.



Abstract



Abstract

Background: Heparin has been studied as a potential antiviral therapeutic option for the treatment of coronavirus infections. In this study, we investigated the use of high molecular weight heparin (HMWH) via inhalation for the treatment of COVID-19 patients. **Objectives:** The overall objective was to evaluate the safety and therapeutic effects of inhaled HAPM in patients with COVID-19. The specific objectives were to investigate the antiviral and anti-inflammatory actions of inhaled HAPM, as well as its influence on clinical and laboratory parameters. **Methods:** We conducted a randomized, placebo-controlled Phase I/II clinical trial with participants randomly assigned to treatment groups (placebo or HAPM). Inhalation of HAPM occurred every 4 hours for 7 days. We assessed safety, clinical parameters, laboratory tests, and imaging findings of the patients. **Results:** Among the 27 patients who completed the study, no changes in blood coagulation parameters were observed, indicating the safety of inhaled HAPM. The group receiving HAPM showed a significant reduction in the need for supplemental oxygen and improvement in respiratory parameters, such as the PaO₂/FiO₂ ratio. Furthermore, a decrease in inflammation was observed, evidenced by a decrease in IL-6 levels and reduced pulmonary congestion on tomography. **Conclusions:** Inhalation of HAPM demonstrated safety, with no impact on blood coagulation, and showed potential therapeutic benefits for COVID-19 patients. There were improvements in respiratory parameters and a reduction in inflammation. These promising results justify the continuation of the study to the next phase, Phase II/III, to further evaluate the therapeutic efficacy of inhaled HAPM in the treatment of COVID-19-associated viral pneumonia.

Keywords: *COVID-19, Heparin, Antiviral, Clinical Trial.*

Lista de Figuras

Lista de Figuras

Figura 1: Modelo esquemático da interação da heparina, proteína spike e enzima conversora da angiotensina 2. a) ligação da proteína spike com o receptor da enzima conversora de angiotensina 2; b-e) mecanismo de ação da heparina. ACE-2: *angiotensin converting enzyme 2*; HAPM: heparina de alto peso molecular; a, b e c (subunidades); S1 e S2 (domínios); *RBD receptor binding domain*. _____ 26

Figura 2: Placa de cultura aderente de 96 poços semeada com 5×10^4 células/mL de VERO CCL-81 (células de rim de macaco-verde africano). Mantida em meio de cultura aditivado com 2% de soro fetal bovino por 24-28h até alcançarem uma confluência de 80-90%. _____ 31

Figura 3: Fluxograma de recrutamento de pacientes de acordo com o protocolo CONSORT. _____ 44

Figura 4: Resultados tomográficos do padrão de acometimento pulmonar. Paciente 7 – A: Pré-tratamento com escore 3; B: Pós-tratamento com escore 1; Paciente 12 – C: Pré-tratamento com escore 2; D: Pós-tratamento com escore 1; Paciente 23 – E: Pré-tratamento com escore 3; F: Pós-tratamento com escore 1. _____ 56

Lista de Tabelas

Lista de Tabelas

Tabela 1. Cronograma de avaliações e visitas. _____	39
Tabela 2. Dados epidemiológicos. _____	46
Tabela 3. Evolução clínica. _____	47
Tabela 4. Exames laboratoriais. _____	49
Tabela 5. Perfil de citocinas _____	51
Tabela 6. Parâmetros respiratório. _____	53
Tabela 7. Resultados da carga viral. _____	54
Tabela 8. Tomografia computadorizada. _____	55

Lista de Abreviaturas

Lista de Abreviaturas

ACE-2	<i>Angiotensin converting enzyme 2</i>
AT3	Antitrombina-III
ATB	Antibiótico
BE	Excesso de base (<i>Base Excess</i>)
CCIRAS	Comissão de Controle de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde
CCL	Ligante de quimiocina (<i>Chemokine Ligands</i>)
COVID-19	Coronavírus 2019
CTCAE	CrITÉrios terminológicos comuns para eventos adversos (<i>Common Terminology Criteria for Adverse Events</i>)
CXCL10	Ligante 10 de Quimiocina com Motivo (<i>Motif Chemokine Ligand 10</i>)
Da	Daltons
ECA-2	Enzima Conversora da Angiotensina 2
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FiO2	Fração Inspirada de Oxigênio
FMB	Faculdade de Medicina de Botucatu
G-CSF	Fator Estimulador de Colônia de Granulócitos (<i>Granulocyte Colony Stimulating Factor</i>)
HAPM	Heparina de Alto Peso Molecular
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
HBPM	Heparina de Baixo Peso Molecular
HC-FMB	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu
HCO3	Bicarbonato
HMGB1	Proteína do Grupo 1 de Alta Mobilidade (<i>High mobility group Box-1</i>)
HNF	Heparina Não Fracionada
HS	Sulfato de Heparano (<i>Heparan Sulfate</i>)
IL	Interleucina
INF	Interferon
MCP-1	Proteína Quimiotática de Monócitos-1 (<i>Monocyte Chemoattractant Protein-1</i>)
NF-κB	Fator Nuclear κB (<i>Nuclear factor-κB</i>)
OMS	Organização Mundial da Saúde
PaO2	Pressão Parcial de Oxigênio Arterial
PaO2/FiO2	Relação entre pressão parcial de oxigênio arterial e fração inspirada de oxigênio
pCO2	Pressão Parcial de Dióxido de Carbono Arterial
PCR	Proteína C Reativa
pH	Potencial Hidrogeniônico

Lista de Abreviaturas

PPSUS	Programa de Pesquisa para o Sistema Único de Saúde
RDW	Amplitude de Distribuição dos Glóbulos Vermelhos (<i>Red Cell Distribution Width</i>)
RNA	Ácido ribonucleico
RNI	Razão Normalizada Internacional
RT-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (<i>Real-Time Polymerase Chain Reaction</i>)
SARS-CoV-2	Coronavírus 2 da Síndrome Respiratória Aguda Grave
SpO2	Saturação Periférica de Oxigênio (SpO2)
TC	Tomografia Computadorizada
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TNF	Fator de Necrose Tumoral (<i>Tumour Necrosis Factor</i>)
TTPa	Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada
UNESP	Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
UPECLIN	Unidade de Pesquisa Clínica
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
VCM	Volume Corpuscular Médio

Sumário

Sumário

Resumo.....	12
Abstract	14
Lista de Figuras	16
Lista de Tabelas.....	18
Lista de Abreviaturas	20
1. INTRODUÇÃO	24
2. JUSTIFICATIVA.....	32
3. OBJETIVOS	33
3.1 Objetivo Geral	33
3.2 Objetivos Específicos.....	33
4. METODOLOGIA	34
4.1 Ética.....	34
4.2 Desenho do Estudo.....	34
4.3 Critérios de Elegibilidade.....	34
4.3.1 Critérios de Inclusão.....	34
4.3.2 Critérios de Exclusão.....	35
4.4 Randomização e Cegamento	35
4.5 Intervenção	36
4.5.1 Grupos de Estudo	36
4.5.2 Preparo e Procedimento de Administração da Medicação.....	36
4.5.3 Critérios de Descontinuidade do Estudo	37
4.6 Desfechos	37
4.6.1 Desfechos Primários.....	37
4.6.2 Desfechos Secundários.....	37
4.7 Acompanhamento clínico e laboratorial	38
4.7.1 Momentos de Avaliação.....	38
4.7.2 Exames Complementares	39
4.7.2.1 Hemograma	39
4.7.2.2 Coagulograma	40
4.7.2.3 D-Dímero	40
4.7.2.4 Gasometria	40
4.7.2.5 Exames bioquímicos	40
4.7.2.6 <i>Swab</i> nasofaríngeo com RT-PCR para COVID-19	41
4.7.2.7 Citocinas inflamatórias.....	41
4.7.2.8 Tomografia Computadorizada de Tórax	42
4.8 Estatística	43
4.8.1 Cálculo Amostral.....	43
4.8.2 Análise Estatística	43
4.9 Financiamento	44
5. RESULTADOS.....	44
5.1 Recrutamento e Inclusão	44
5.2 Dados Epidemiológicos.....	45
5.3 Evolução Clínica	47
5.4 Exames Laboratoriais.....	48
5.5 Citocinas.....	51

5.6 Avaliação de Parâmetros Respiratórios.....	52
5.7 Carga viral.....	54
5.8 Análise da Tomografia Computadorizada de Tórax	54
6. DISCUSSÃO.....	57
7. LIMITAÇÕES.....	24
8. CONCLUSÃO	63
9. REFERÊNCIAS	64
10. ANEXOS.....	69
10.1 Anexo 1: Patente de invenção: composição de heparina não fracionada de alto peso molecular para ação antiviral e respectivo uso..	69
10.2 Anexo 2: Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CAAE 39872920.0.0000.5411).....	86
10.3 Anexo 3: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.	90
10.4 Anexo 4: Formulário de antecedentes epidemiológicos e pessoais com base na epidemiologia brasileira.	92
10.5 Anexo 5: Formulário de avaliação clínica e exame físico com base nos sintomas mais prevalentes de SARS-CoV-2.	94
10.6 Anexo 6: Formulário de achados laboratoriais e tomográficos com base na rotina laboratorial do paciente internado com SARS-CoV-2.....	99
10.7 Anexo 7: Formulário de eventos adversos com base na frequência de observação de eventos adversos induzidos por heparina e categorizados de acordo com o Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTC-AE) 5.0.....	101
10.8 Anexo 8: Financiamento FAPESP/PPSUS, número do processo 2020/12165-8.....	103
10.9 Anexo 9: Protocolo Clínico Publicado Nebulized enriched heparin to treat no critical patients with Sars-Cov-2: Triple-blind clinical trial. Medicine (Baltimore). 2021 Dec 23;100(51):e28288. doi: 10.1097/MD.00000000000028288.	Erro! Indicador não definido.

Introdução

1. INTRODUÇÃO

Em dezembro de 2019, foram identificados os primeiros casos de pneumonia de origem desconhecida em Wuhan, capital da província de Hubei, na China. Tal doença foi denominada Coronavírus 2019 (COVID-19), tendo como patógeno responsável um novo membro da família de betacoronavírus de ácido ribonucleico (RNA) envelopado intitulado como Coronavírus 2 da Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS-CoV-2).¹

Essa doença viral altamente contagiosa rapidamente se disseminou e a Organização Mundial da Saúde (OMS) a declarou como uma pandemia global em março de 2020. Desde então, devastou e sobrecarregou muitos serviços de saúde ao redor do mundo.² Embora haja esforços globais conjuntos para o desenvolvimento e vacinação em massa, o SARS-CoV-2, como outros vírus de RNA, se adapta e pode desenvolver mutações ameaçadoras que contribuem para a sua propagação.²

A infecção pode acometer pessoas de qualquer idade, porém, pacientes acima de 60 anos, com comorbidades e aqueles que não completaram o esquema de vacinação tem maior risco de desenvolver a forma grave da doença. A percentagem de pacientes que necessitam de hospitalização e a taxa de mortalidade é maior nos pacientes com comorbidades do que naqueles previamente hígidos, 45,4% vs. 7,6% e 19,5% vs. 1,6%, respectivamente.³

Estima-se que 17,9% a 33,3% dos pacientes infectados permanecerão assintomáticos e a maioria dos sintomas tem baixa precisão diagnóstica, portanto, a presença ou não de sintomas não é suficiente para confirmar ou descartar a infecção.⁴⁻⁶ Os sintomas mais frequentes são febre, fadiga, tosse seca, mialgia e dispneia, além de outros menos comuns como cefaleia, tontura, dor abdominal, diarreia, náusea e vômito⁷. Dentre os pacientes sintomáticos, 70% apresentaram febre, tosse e falta de ar, 36% relataram mialgia e 34% relataram cefaleia.³

No início da pandemia, a gravidade clínica do COVID-19 variava de leve, atingindo em torno de 80% dos casos, até pneumonia hipoxêmica, a principal causa de hospitalização e mortalidade.⁸⁻¹¹ Devido a insuficiência respiratória, quase um

quarto dos pacientes hospitalizados evoluíram com necessidade de ventilação mecânica assistida.⁹

Com relação ao quadro clínico, os pacientes foram classificados em cinco grupos: 1) Assintomáticos; 2) Doença leve: com sintomas, porém sem dispneia e com exames de imagem torácica normais; 3) Doença moderada: sintomas clínicos ou evidência radiológica de doença pulmonar com saturação periférica de oxigênio (SpO₂) ≥ 94% em ar ambiente; 4) Doença grave: insuficiência respiratória com SpO₂ < 94% em ar ambiente, relação entre pressão parcial de oxigênio arterial e fração inspirada de oxigênio (PaO₂/FiO₂) entre 200-300mmHg, com taquipneia (frequência respiratória >30 respirações/min) ou infiltrados pulmonares acometendo mais de 50% do tórax; 5) Doença crítica: insuficiência respiratória aguda grave, choque séptico e/ou disfunção de múltiplos órgãos.²

Com relação às alterações laboratoriais, a maioria dos pacientes internados na fase crítica da pandemia, apresentava contagem normal de leucócitos (64,7%) e níveis elevados de proteína C reativa (65,9%). De forma menos frequente estavam presentes a linfopenia (47,6%), níveis anormais de enzimas miocárdicas (49,4%), alteração da função hepática (26,4%), leucopenia (23,5%), dímero D elevado (20,4%), leucocitose (9,9%), procalcitonina elevada (16,7%) e função renal anormal (10,9%).¹²

O SARS-CoV-2 é um vírus do subgênero *Sarbecovirus* da família *Coronaviridae*, que é constituído por quatro proteínas estruturantes principais (glicoproteína *spike*, envelope, nucleocapsídeo e membrana capsular), 16 proteínas não estruturais e 5 a 8 proteínas acessórias.¹³ A glicoproteína *spike* está localizada na cápsula viral e apresenta uma cabeça trimérica (subunidade A, B e C) que pode estar na conformação aberta ou fechada. Cada subunidade é composta por dois domínios, S1 e S2, conectados pela junção S1/S2. Quando está na conformação aberta, o domínio de ligação ao receptor (*RBD*, em inglês *receptor binding domain*) é exposto e pode se ligar a célula do hospedeiro.^{14,15}

Para que a fase infecciosa da COVID-19 se inicie, o *RBD* da glicoproteína *spike* da capsula viral se liga ao receptor da enzima conversora da angiotensina 2

(ECA-2) da célula hospedeira. Esta ligação é a primeira etapa da infecção, porém a adsorção do vírus na célula depende da clivagem das subunidades S1/S2 pelas proteases do hospedeiro, principalmente a furina, o que expõe S2 para fusão à membrana celular (Figura 1a).¹⁵

Existem duas fases relacionadas a infecção. Na fase inicial há replicação viral e dano tecidual direto, enquanto na fase tardia, há uma resposta imune com recrutamento de linfócitos T, monócitos e neutrófilos com liberação de citocinas como fator de necrose tumoral α (TNF- α), interleucina-1 (IL-1), IL-6, IL-1 β , IL-8, IL-12 e interferon- γ (IFN- γ). Na forma grave da doença, há superativação imunológica que resulta em uma "tempestade de citocinas", caracterizada principalmente pela liberação de altos níveis de IL-6 e TNF- α , causando uma resposta inflamatória local e sistêmica.^{16,17}

O *swab* nasofaríngeo foi o primeiro teste de coleta de secreções do trato respiratório para a identificação do RNA do SARS-CoV-2, submetendo a amostra ao ensaio de reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR), considerado teste padrão para o diagnóstico da doença. A especificidade da maioria dos ensaios comerciais aprovados de RT-PCR SARS-CoV-2 é de quase 100%, desde que não haja contaminação cruzada durante o processamento da amostra, erro de coleta ou coleta em momentos inadequados, como antes da viremia ou após o processo de cura infecciosa.¹⁸

O método de imagem diagnóstica de escolha para os casos com comprometimento respiratório ou evolução clínica desfavorável é a tomografia computadorizada (TC) de tórax, particularmente a de alta resolução, que é utilizada principalmente para a identificação do acometimento pulmonar. Os achados tomográficos mais comuns da infecção por SARS-CoV-2 são áreas multifocais bilaterais em "vidro fosco", associadas a áreas de consolidação com distribuição irregular, principalmente periférica, além de maior envolvimento dos lobos inferiores da região posterior.²

Na pior fase da pandemia, o tratamento de suporte padrão utilizado para os pacientes ambulatoriais foi conservador, com uso de sintomáticos e analgésicos.

Entretanto, para pacientes em regime hospitalar, vários esquemas foram empregados visando diminuir a progressão da insuficiência respiratória e suas complicações, incluindo oxigenioterapia suplementar, analgesia, antitérmicos, broncodilatadores, anticoagulantes, antibioticoterapia quando na presença de agentes bacterianos associados, glicocorticoides, quando indicados e, nos quadros mais graves, tratamento em UTI com intubação orotraqueal e ventilação mecânica.

Durante o primeiro ano da pandemia, uma revisão sistemática foi conduzida para avaliar o impacto clínico de diversas terapias antivirais para COVID-19 e identificar a melhor abordagem terapêutica para a doença. A revisão destacou que, além da terapia de suporte, três medicamentos deveriam ser utilizados em diferentes etapas da doença. Na primeira fase da doença, a terapia incluiria uma dose de ataque de 200mg de remdesivir no primeiro dia seguida por 100mg/dia. Na segunda fase, a combinação de dexametasona 6mg/dia e baricitinibe 4mg/dia foi recomendada para combater a desregulação imunológica desencadeada pela infecção pelo SARS-CoV-2.¹⁹

Em 2021, a Sociedade Europeia de Microbiologia Clínica e Doenças Infecciosas divulgou suas diretrizes para o tratamento da COVID-19, indicando que o uso de hidroxicloroquina, ivermectina, azitromicina, colchicina, interferon β -1a e antibioticoterapia de rotina deve ser evitado, enquanto o uso de anticorpos monoclonais e remdesivir é recomendado para pacientes ambulatoriais de alto risco com COVID-19 leve e moderado. Para casos graves, recomenda-se a utilização de tocilizumabe e corticoides.²⁰ No entanto, uma revisão sistemática mais recente de 2022 observou que embora antivirais selecionados tenham demonstrado eficácia para melhorar os resultados clínicos em pacientes com COVID-19, nenhum demonstrou eficácia na redução da mortalidade.²¹

A infecção por SARS-CoV-2 está associada a um risco aumentado de complicações cardiovasculares, especialmente tromboembolismo venoso. Em pacientes hospitalizados com COVID-19, observa-se uma alta taxa de tromboembolismo, com uma prevalência geral estimada de 14,1% e uma incidência de 22,7% naqueles em regime de terapia intensiva. A gestão das complicações

tromboembólicas em pacientes com COVID-19 é controversa, incluindo questões sobre a dosagem profilática e a duração adequada do tratamento anticoagulante, com diferentes abordagens de heparina. No entanto, não se observam diferenças significativas na mortalidade entre doses padrão e elevadas de profilaxia, embora a última aumente o risco de sangramento.²²⁻²⁴

A descoberta de McLean há mais de 90 anos sobre as propriedades anticoagulantes da heparina continua a ser relevante até hoje.²⁵ A heparina é composta por moléculas longas e lineares de sulfato de heparano, que são purificadas principalmente a partir do processamento de intestinos de suínos. Sua carga negativa extremamente alta permite que ela se ligue seletivamente a uma ampla variedade de proteínas, incluindo a antitrombina-III (AT3), que é responsável pela atividade anticoagulante da heparina. A interação de heparina com outras proteínas também pode levar a efeitos positivos e negativos, o que é clinicamente relevante. O reconhecimento de um grande número de interações heparina-proteína biologicamente relevantes destaca a complexidade do papel da heparina na fisiologia e doença, e sua importância clínica.^{26,27}

A heparina não fracionada (HNF) consiste em uma mistura heterogênea de moléculas que variam em peso molecular de 3.000 a 30.000Da, apresentando uma média de 15.000Da. Por sua vez, a heparina de baixo peso molecular (HBPM) é derivada da HNF por meio de processos de despolimerização química ou enzimática, apresentando cerca de um terço do peso molecular da HNF, com valor médio de 4.000 a 5.000Da.²⁵

A heparina é amplamente estudada por sua potencial ação antiviral, que promove a inibição de diferentes vírus envelopados, incluindo os coronavírus.²⁸ Conzelmann et al. (2020)²⁸ observaram que a heparina reduziu em cinco vezes a infecção por vírus em células epiteliais brônquicas humanas primárias e suprimiu a replicação viral do SARS-CoV-2 em 60% em células VERO E6, enquanto Mycroft-West et al. (2020)²⁹ relataram essa inibição em até 80%. Além disso, a heparina apresenta importante ação anti-inflamatória, inibindo as interações da proteína nuclear HMGB1-lipopolissacarídeos e impedindo a degradação do glicocálice pela

heparinase de macrófagos.³⁰ Estudos comparativos entre a HNF e a HBPM mostraram que a HNF apresenta atividade antiviral significativamente mais efetiva contra o SARS-CoV-2 em células VERO E6, sendo 150 vezes mais potente.³¹ Esses resultados sugerem que a heparina e seus derivados, principalmente as moléculas de maior peso molecular, têm o potencial de serem usados como terapêuticas no combate ao SARS-CoV-2.^{29,32,33}

A heparina possui três mecanismos de atividade antiviral contra o SARS-CoV-2: 1) estabiliza a glicoproteína *spike* na conformação fechada (Figura 1b); 2) oculta o local de clivagem das subunidades S1/S2 (Figura 1d e 1e); e 3) evita a clivagem no local do pico S1/S2 pela furina (Figura 1c).¹⁴

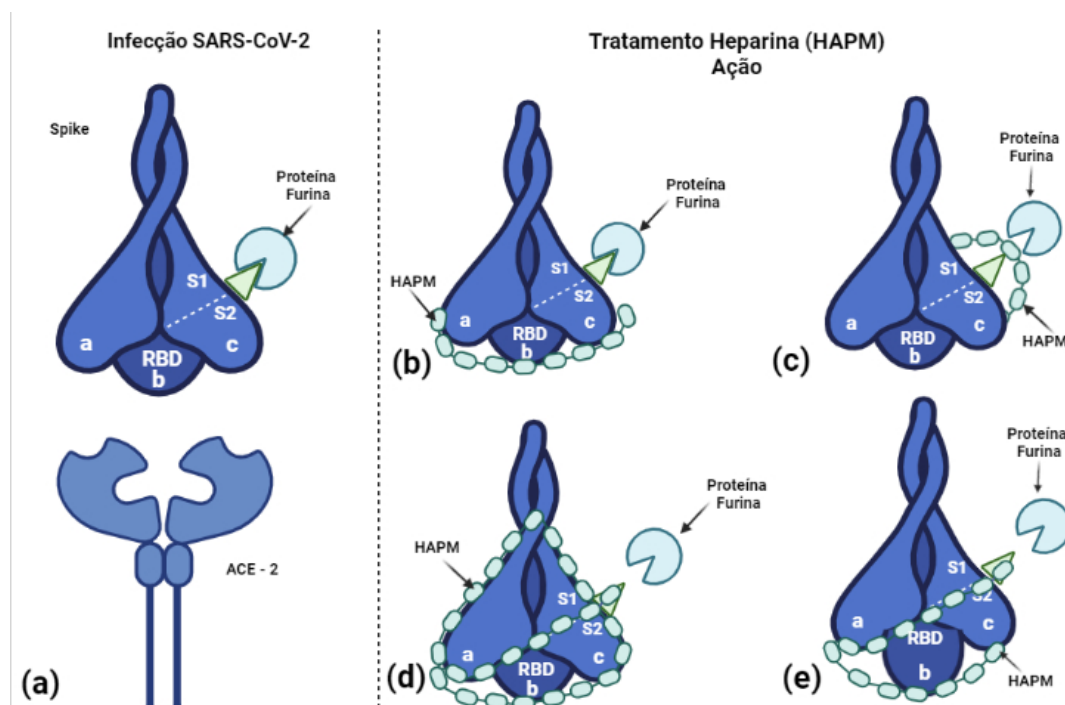


Figura 1. Modelo esquemático da interação da heparina, proteína *spike* e enzima conversora da angiotensina 2. a) ligação da proteína *spike* com o receptor da enzima conversora de angiotensina 2; b-e) mecanismo de ação da heparina. ACE-2: *angiotensin converting enzyme 2*; HAPM: heparina de alto peso molecular; a, b e c (subunidades); S1 e S2 (domínios); RBD *receptor binding domain*. **Autor:** Grillo VTRS, 2023.

Embora a heparina seja amplamente utilizada na prática médica e considerada benéfica, é importante destacar que ela pode causar efeitos adversos, sendo o sangramento o mais comum.³⁴ Estudos mostram que a incidência de

sangramento associado a doses terapêuticas de heparina e antagonistas da vitamina K é de 2 a 5% ao ano para sangramento maior e 0,5 a 1% por ano para sangramento fatal.³⁵

Devido à capacidade do vírus de sofrer constantes mutações, não é possível garantir que as vacinas existentes sejam eficazes contra todas as novas variantes do SARS-CoV-2. Por esse motivo, é fundamental o desenvolvimento de terapias medicamentosas específicas ou coadjuvantes para o tratamento da COVID-19, com o objetivo de prevenir e tratar as graves complicações da doença. Apesar de a pesquisa científica estar em constante evolução, atualmente ainda há uma carência de tratamentos eficazes baseados em evidências científicas para a COVID-19, reforçando a necessidade de esforços contínuos nessa área.^{26,33}

Embora o COVID-19 afete principalmente os pulmões, até o momento nenhum medicamento inalado foi aprovado para o tratamento da doença.³³ A administração de fármacos por via pulmonar inalatória oferece a vantagem de entregar a medicação diretamente no local de ação, resultando em um rápido início de atividade, menores doses administradas e concentrações mais altas no tecido pulmonar. Além disso, a biodisponibilidade sistêmica é reduzida, o que pode diminuir a incidência potencial de toxicidade e eventos adversos sistêmicos.³⁶

A heparina não fracionada de alto peso molecular (HAPM) foi objeto de duas patentes de processo depositadas pelo orientador desta tese, o Dr. Matheus Bertanha. Uma delas, intitulada “Processo de desenvolvimento de heparina não fracionada de alto peso molecular” (BR 102014027804-4 A2), foi concedida pelo Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI). A outra, intitulada “Composição de heparina não fracionada de alto peso molecular para ação antiviral” (BR 102020011964-8), foi depositada no INPI.^{37,38}

A HAPM é uma solução tamponada livre de moléculas de baixo peso, composta por 97% de moléculas com peso molecular superior a 10.000Da. Ela é obtida em ambiente estéril através do processo de ultrafiltração com o filtro para centrífuga Amicon Ultra - 10kDa® (Merck Millipore™ Merck, Burlington, Massachusetts, Estados Unidos da América), seguindo as recomendações do

fabricante, a partir da HNF comercial (heparina sódica, solução injetável 5.000UI/mL HEMAPAX® - Blau Farmacêutica™ - São Paulo, Brasil). A solução final para uso é rica em moléculas de alto peso molecular, com pH estável de 7, livre de contaminantes prejudiciais e com alto grau de pureza.

A HAPM apresentou ação antiviral em protocolos *in vitro* utilizando linhagem celular VERO, oriunda de rim de macaco-verde africano (*Cercopithecus aethiops*) infectadas com cepa brasileira de SARS-CoV-2/SP02/humano/2020/BRA (Acesso GenBank nº MT126808.1). Utilizando a dose de 12,5mg de HAPM, foi observada uma diminuição variável da carga viral (de até 90%), sem causar citotoxicidade (Figura 2; Anexo 1). Esse resultado sugere que a HAPM pode ter um potencial alvo terapêutico com dupla função antiviral e antitrombótica. Embora o mecanismo de ação farmacológico da HAPM ainda não esteja completamente elucidado, acredita-se que ela possa ter ação em proteínas de adesão ou clivagem viral, impedindo a replicação viral.

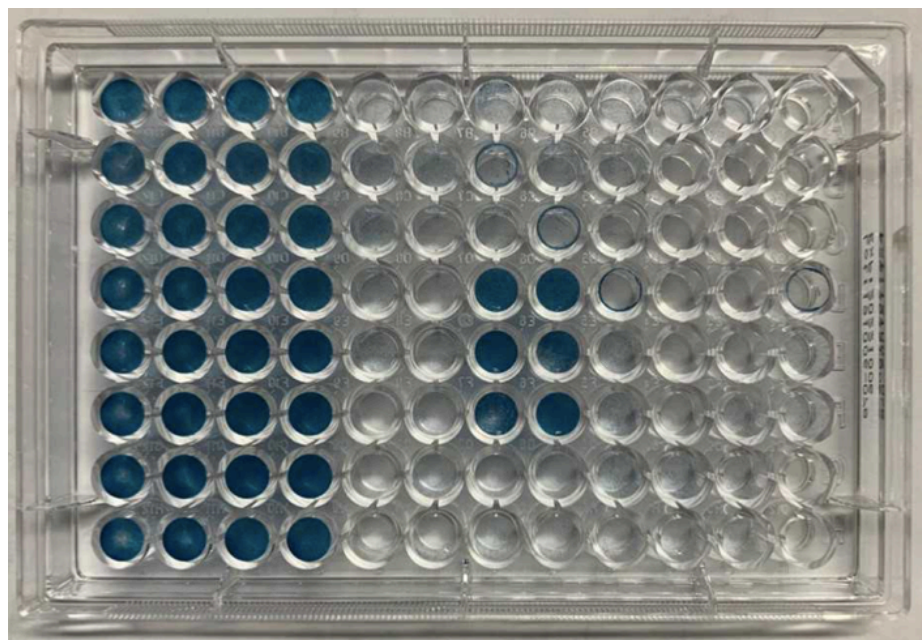


Figura 2. Placa de cultura aderente de 96 poços semeada com 5×10^4 células/mL de VERO CCL-81 (células de rim de macaco-verde africano). Mantida em meio de cultura aditivado com 2% de soro fetal bovino por 24-28h até alcançarem uma confluência de 80-90%. **Fonte:** Bertanha, Matheus. Composição de heparina não fracionada de alto peso molecular para ação antiviral. Depositante: Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho. BR 102020011964-8. Depósito: 2020.

Conclusão

8. CONCLUSÃO

A utilização da heparina de alto peso molecular por via inalatória para o tratamento de SARS-CoV-2 demonstrou que:

- É uma medicação segura, pois não alterou significativamente exames laboratoriais da coagulação e nem foi observada a ocorrência de eventos adversos hemorrágicos;
- Houve queda significativa da necessidade de oxigenioterapia suplementar;
- Houve aumento significativo e precoce da relação PaO_2/FiO_2 ;
- Houve queda significativa da IL-6;
- Não houve diferença na evolução clínica dos sintomas apresentados pelos pacientes;
- Não houve diferença na carga viral do SARS-CoV-2;
- Houve diminuição da congestão pulmonar evidenciada pela tomografia de tórax.

Referências

9. REFERÊNCIAS

1. Dhont S, Derom E, van Braeckel E, Depuydt P, Lambrecht BN. The pathophysiology of ‘happy’ hypoxemia in COVID-19. *Respir Res.* 2020;21(1):198. doi:10.1186/s12931-020-01462-5
2. Cascella M, Rajnik M, Aleem A, Dulebohn SC, di Napoli R. *Features, Evaluation, and Treatment of Coronavirus (COVID-19).*; 2022. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32150360>
3. Strokes EK, Zambrano LD, Anderson KN, et al. Coronavirus Disease 2019 Case Surveillance — United States, January 22–May 30, 2020. *Morbidity and Mortality Weekly Report.* 2020;69(24):759.
4. Mizumoto K, Kagaya K, Zarebski A, Chowell G. Estimating the asymptomatic proportion of coronavirus disease 2019 (COVID-19) cases on board the Diamond Princess cruise ship, Yokohama, Japan, 2020. *Eurosurveillance.* 2020;25(10):6-18. doi:10.2807/1560-7917.ES.2020.25.10.2000180
5. Nishiura H, Kobayashi T, Miyama T, et al. Estimation of the asymptomatic ratio of novel coronavirus infections (COVID-19). *International Journal of Infectious Diseases.* 2020;94:154-155. doi:10.1016/j.ijid.2020.03.020
6. Struyf T, Deeks JJ, Dinnes J, et al. Signs and symptoms to determine if a patient presenting in primary care or hospital outpatient settings has COVID-19. *Cochrane Database of Systematic Reviews.* 2022;2022(5). doi:10.1002/14651858.CD013665.pub3
7. Wang D, Hu B, Hu C, et al. Clinical Characteristics of 138 Hospitalized Patients With 2019 Novel Coronavirus–Infected Pneumonia in Wuhan, China. *JAMA.* 2020;323(11):1061. doi:10.1001/jama.2020.1585
8. Wang C, Wang Z, Wang G, Lau JYN, Zhang K, Li W. COVID-19 in early 2021: current status and looking forward. *Signal Transduct Target Ther.* 2021;6(1):114. doi:10.1038/s41392-021-00527-1
9. Haren FMP, Richardson A, Yoon H, et al. INHALEd nebulised unfractionated HEParin for the treatment of hospitalised patients with COVID-19 (INHALE-HEP): Protocol and statistical analysis plan for an investigator-initiated international metatrial of randomised studies. *Br J Clin Pharmacol.* 2021;87(8):3075-3091. doi:10.1111/bcp.14714
10. Xie J, Covassin N, Fan Z, et al. Association Between Hypoxemia and Mortality in Patients With COVID-19. *Mayo Clin Proc.* 2020;95(6):1138-1147. doi:10.1016/j.mayocp.2020.04.006
11. Wu Z, McGoogan JM. Characteristics of and Important Lessons From the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Outbreak in China. *JAMA.* 2020;323(13):1239. doi:10.1001/jama.2020.2648
12. Zhu J, Zhong Z, Ji P, et al. Clinicopathological characteristics of 8697 patients with COVID-19 in China: a meta-analysis. *Fam Med Community Health.* 2020;8(2):e000406. doi:10.1136/fmch-2020-000406

13. Jiang S, Hillyer C, Du L. Neutralizing Antibodies against SARS-CoV-2 and Other Human Coronaviruses. *Trends Immunol.* 2020;41(5):355-359. doi:10.1016/j.it.2020.03.007
14. Paiardi G, Richter S, Oreste P, Urbinati C, Rusnati M, Wade RC. *Three-Fold Mechanism of Inhibition of SARS-CoV-2 Infection by the Interaction of the Spike Glycoprotein with Heparin.* <https://swissmodel.expasy.org/repository/species/2697049>
15. Belen-Apak FB, Sarialioglu F. The old but new: Can unfractionated heparin and low molecular weight heparins inhibit proteolytic activation and cellular internalization of SARS-CoV2 by inhibition of host cell proteases? *Med Hypotheses.* 2020;142:109743. doi:10.1016/j.mehy.2020.109743
16. Wang J, Jiang M, Chen X, Montaner LJ. Cytokine storm and leukocyte changes in mild versus severe SARS-CoV-2 infection: Review of 3939 COVID-19 patients in China and emerging pathogenesis and therapy concepts. *J Leukoc Biol.* 2020;108(1):17-41. doi:10.1002/JLB.3COVR0520-272R
17. Azkur AK, Akdis M, Azkur D, et al. Immune response to SARS-CoV-2 and mechanisms of immunopathological changes in COVID-19. *Allergy.* 2020;75(7):1564-1581. doi:10.1111/all.14364
18. Gandhi RT, Lynch JB, del Rio C. Mild or Moderate Covid-19. Solomon CG, ed. *New England Journal of Medicine.* 2020;383(18):1757-1766. doi:10.1056/NEJMcp2009249
19. Cantini F, Goletti D, Petrone L, Najafi Fard S, Niccoli L, Foti R. Immune Therapy, or Antiviral Therapy, or Both for COVID-19: A Systematic Review. *Drugs.* 2020;80(18):1929-1946. doi:10.1007/s40265-020-01421-w
20. Bartoletti M, Azap O, Barac A, et al. ESCMID COVID-19 living guidelines: drug treatment and clinical management. *Clinical Microbiology and Infection.* 2022;28(2):222-238. doi:10.1016/j.cmi.2021.11.007
21. Vegivinti CTR, Evanson KW, Lyons H, et al. Efficacy of antiviral therapies for COVID-19: a systematic review of randomized controlled trials. *BMC Infect Dis.* 2022;22(1). doi:10.1186/s12879-022-07068-0
22. Dybowska M, Wrostkiewicz D, Opoka L, et al. Venous Thromboembolic Disease in COVID-19, Pathophysiology, Therapy and Prophylaxis. *Int J Mol Sci.* 2022;23(18):10372. doi:10.3390/ijms231810372
23. Vedovati MC, Graziani M, Agnelli G, Becattini C. Efficacy and safety of two heparin regimens for prevention of venous thromboembolism in hospitalized patients with COVID-19: a meta-analysis. *Intern Emerg Med.* 2023;18(3):863-877. doi:10.1007/s11739-022-03159-7
24. Nopp S, Moik F, Jilma B, Pabinger I, Ay C. Risk of venous thromboembolism in patients with COVID-19: A systematic review and meta-analysis. *Res Pract Thromb Haemost.* 2020;4(7):1178-1191. doi:10.1002/rth2.12439
25. Parenteral Anticoagulants | Elsevier Enhanced Reader.
26. Hippensteel JA, LaRiviere WB, Colbert JF, Langouët-Astrié CJ, Schmidt EP.

- Heparin as a therapy for COVID-19: current evidence and future possibilities. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2020;319(2):L211-L217. doi:10.1152/ajplung.00199.2020
27. Weiss RJ, Esko JD, Tor Y. Targeting heparin and heparan sulfate protein interactions. *Org Biomol Chem*. 2017;15(27):5656-5668. doi:10.1039/C7OB01058C
 28. Conzelmann C, Müller JA, Perkhofer L, et al. Inhaled and systemic heparin as a repurposed direct antiviral drug for prevention and treatment of COVID-19. *Clinical Medicine*. 2020;20(6):e218-e221. doi:10.7861/clinmed.2020-0351
 29. Mycroft-West CJ, Su D, Pagani I, et al. Heparin Inhibits Cellular Invasion by SARS-CoV-2: Structural Dependence of the Interaction of the Spike S1 Receptor-Binding Domain with Heparin. *Thromb Haemost*. 2020;120(12):1700-1715. doi:10.1055/s-0040-1721319
 30. Yu X. Another new application of heparin in COVID-19: more than anticoagulation and antiviral. *Journal of Investigative Medicine*. 2021;69(6):1258-1258. doi:10.1136/jim-2021-001951
 31. Tree JA, Turnbull JE, Buttigieg KR, et al. Unfractionated heparin inhibits live wild type SARS-CoV-2 cell infectivity at therapeutically relevant concentrations. *Br J Pharmacol*. 2021;178(3):626-635. doi:10.1111/bph.15304
 32. Kim SY, Jin W, Sood A, et al. Characterization of heparin and severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2 (SARS-CoV-2) spike glycoprotein binding interactions. *Antiviral Res*. 2020;181:104873. doi:10.1016/j.antiviral.2020.104873
 33. Sahin G, Akbal-Dagistan O, Culha M, et al. Antivirals and the Potential Benefits of Orally Inhaled Drug Administration in COVID-19 Treatment. *J Pharm Sci*. Published online June 2022. doi:10.1016/j.xphs.2022.06.004
 34. Maffei FHA, Yoshida WB, Moura R, Sobreira M, Giannini M, Lastoria S. *Doenças Vasculares Periféricas*. Vol 1. 5th ed. Guanabara Koogan; 2016.
 35. Seth Landefeld C, Bemh RJ, Landefeld S. *Anticoagulant-Related Bleeding: Clinical Epidemiology, Prediction, and Prevention*. REVIEW
 36. Eedara BB, Alabsi W, Encinas-Basurto D, Polt R, Ledford JG, Mansour HM. Inhalation Delivery for the Treatment and Prevention of COVID-19 Infection. *Pharmaceutics*. 2021;13(7):1077. doi:10.3390/pharmaceutics13071077
 37. Bertanha, Matheus. *Processo de desenvolvimento de heparina não fracionada de alto peso molecular*. Depositante: Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho. BR 102014027804-4 A2. Depósito: 2020.
 35. Bertanha, Matheus. *Composição de heparina não fracionada de alto peso molecular para ação antiviral*. Depositante: Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho. BR 102020011964-8. Depósito: 2020.
 39. Cancer Institute N. *Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) v5.0.;*

-
2017. <https://www.meddra.org/>
40. Dixon B, Smith RJ, Campbell DJ, et al. Nebulised heparin for patients with or at risk of acute respiratory distress syndrome: a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet Respir Med.* 2021;9(4):360-372. doi:10.1016/S2213-2600(20)30470-7
 41. van Haren FMP, Laffey JG, Artigas A, et al. Can nebulised HepArin Reduce morTality and time to Extubation in patients with COVID-19 Requiring invasive ventilation Meta-Trial (CHARTER-MT): Protocol and statistical analysis plan for an investigator-initiated international meta-trial of prospective randomised clinical studies. *Br J Clin Pharmacol.* 2022;88(7):3272-3287. doi:10.1111/bcp.15253
 42. Camprubí–Rimblas M, Guillamat-Prats R, Lebouvier T, et al. Role of heparin in pulmonary cell populations in an in-vitro model of acute lung injury. *Respir Res.* 2017;18(1):89. doi:10.1186/s12931-017-0572-3
 43. Lan X, Huang Z, Tan Z, Huang Z, Wang D, Huang Y. Nebulized heparin for inhalation injury in burn patients: a systematic review and meta-analysis. *Burns Trauma.* 2020;8. doi:10.1093/burnst/tkaa015
 44. Phelps MK, Olson LM, Patel MAVB, Thompson MJ, Murphy C v. Nebulized Heparin for Adult Patients With Smoke Inhalation Injury: A Review of the Literature. *Journal of Pharmacy Technology.* 2020;36(4):130-140. doi:10.1177/8755122520925774
 45. Abdelaal Ahmed Mahmoud A, Mahmoud HE, Mahran MA, Khaled M. Streptokinase Versus Unfractionated Heparin Nebulization in Patients With Severe Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS): A Randomized Controlled Trial With Observational Controls. *J Cardiothorac Vasc Anesth.* 2020;34(2):436-443. doi:10.1053/j.jvca.2019.05.035
 46. Erelel M, Kaskal M, Akbal-Dagistan O, et al. Early Effects of Low Molecular Weight Heparin Therapy with Soft-Mist Inhaler for COVID-19-Induced Hypoxemia: A Phase Iib Trial. *Pharmaceutics.* 2021;13(11):1768. doi:10.3390/pharmaceutics13111768
 47. Johns M, George S, Taburyanskaya M, Poon YK. A Review of the Evidence for Corticosteroids in COVID-19. *J Pharm Pract.* 2022;35(4):626-637. doi:10.1177/0897190021998502
 48. Granata G, Schiavone F, Pipitone G, Taglietti F, Petrosillo N. Antibiotics Use in COVID-19 Patients: A Systematic Literature Review. *J Clin Med.* 2022;11(23). doi:10.3390/jcm11237207
 49. Sadeghi-Haddad-Zavareh M, Bayani M, Shokri M, et al. C-Reactive Protein as a Prognostic Indicator in COVID-19 Patients. *Interdiscip Perspect Infect Dis.* 2021;2021:1-5. doi:10.1155/2021/5557582
 50. WONG CK, LAM CWK, WU AKL, et al. Plasma inflammatory cytokines and chemokines in severe acute respiratory syndrome. *Clin Exp Immunol.* 2004;136(1):95-103. doi:10.1111/j.1365-2249.2004.02415.x
 51. Mahallawi WH, Khabour OF, Zhang Q, Makhdoum HM, Suliman BA. MERS-CoV infection in humans is associated with a pro-inflammatory Th1
-

-
- and Th17 cytokine profile. *Cytokine*. 2018;104:8-13. doi:10.1016/j.cyto.2018.01.025
52. Gomes MAM, Macêdo Neto NC, Bispo IGA. Interleucina-6, Moléculas de Adesão Intercelular-1 e Microalbuminúria na Avaliação da Lesão Endotelial: Revisão de Literatura. *Rev SOCERJ*. 2009;22(6):398-403.
53. Zhu J, Pang J, Ji P, et al. Elevated interleukin-6 is associated with severity of COVID-19: A meta-analysis. *J Med Virol*. 2021;93(1):35-37. doi:10.1002/jmv.26085
54. Sinha P, Mostaghim A, Bielick CG, et al. Early administration of interleukin-6 inhibitors for patients with severe COVID-19 disease is associated with decreased intubation, reduced mortality, and increased discharge. *International Journal of Infectious Diseases*. 2020;99:28-33. doi:10.1016/j.ijid.2020.07.023
55. Costa Clemens SA, Fortaleza CMCB, Crowe M, et al. Effectiveness of the Fiocruz recombinant ChadOx1-nCoV19 against variants of SARS-CoV-2 in the Municipality of Botucatu-SP. *Front Public Health*. 2022;10. doi:10.3389/fpubh.2022.1016402