



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 PaO_2/FiO_2 . 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 ($SpO_2 \geq 94\%$ em ar ambiente; 4) Doença grave: insuficiência respiratória com $SpO_2 < 94\%$ em ar ambiente, relação entre pressão parcial de oxigênio arterial e fração inspirada de oxigênio (PaO_2/FiO_2) 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

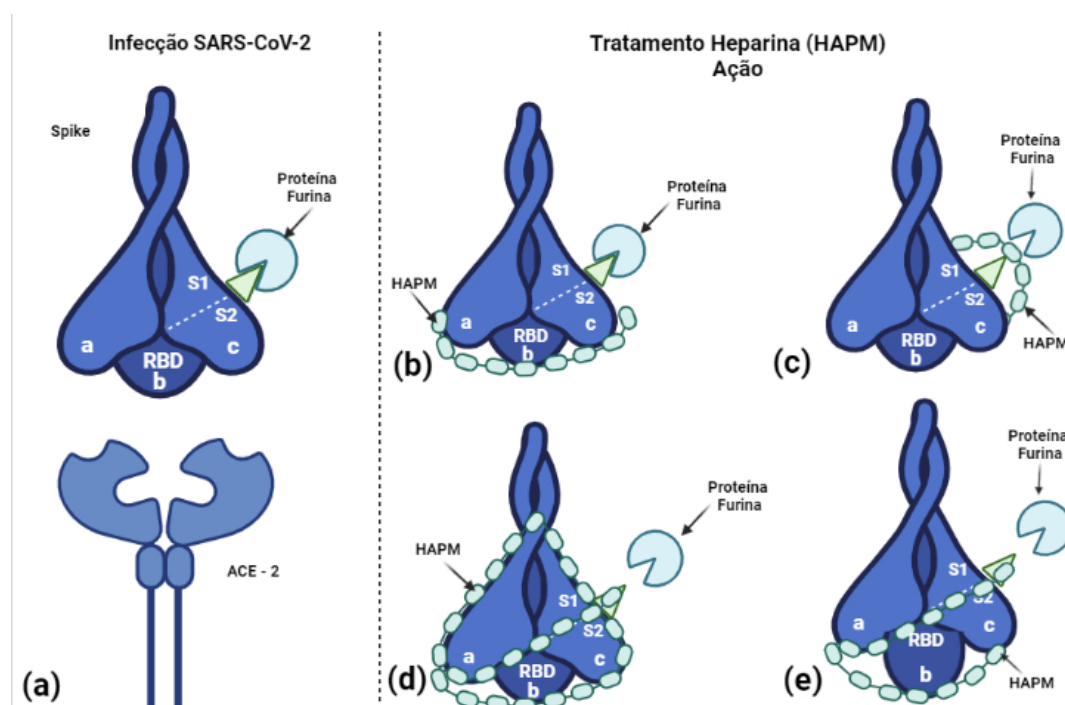


Figura 1. Modelo esquemático da interação da heparina, proteína *spike* e enzima conversora da angiotensina 2. a) ligação da proteína *spike* com o receptor da enzima conversora de angiotensina 2; b-e) mecanismo de ação da heparina. ACE-2: *angiotensin converting enzyme 2*; HAPM: heparina de alto peso 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.

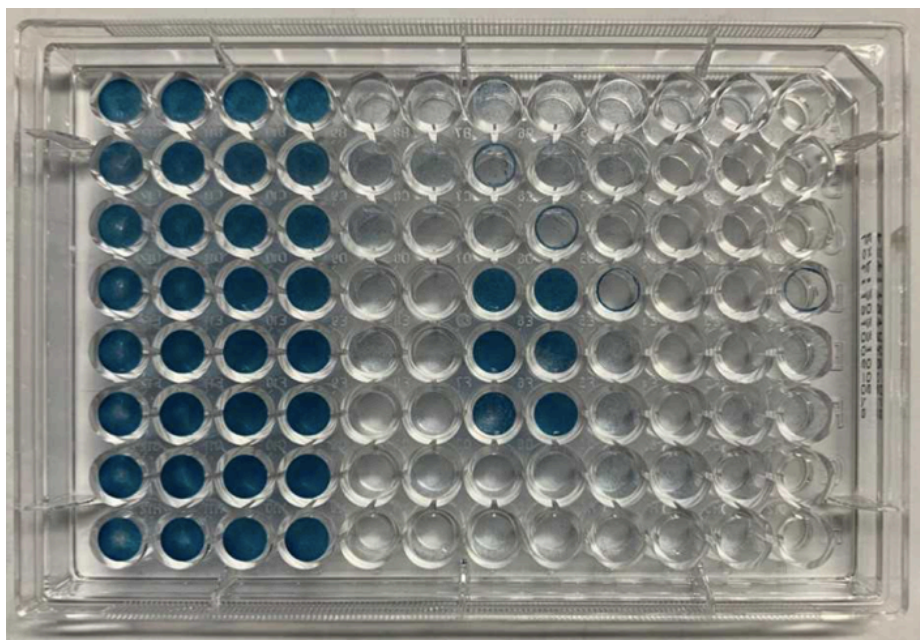


Figura 2. Placa de cultura aderente de 96 poços semeada com 5×10^4 células/mL de VERO CCL-81 (células de rim de macaco-verde africano). Mantida em meio de cultura aditivado com 2% de soro fetal bovino por 24-28h até alcançarem uma confluência de 80-90%. **Fonte:** Bertanha, Matheus. Composição de heparina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

Justificativa

2. JUSTIFICATIVA

A pandemia da COVID-19 tem gerado uma crise de saúde pública sem precedentes, com impactos significativos na economia e na sociedade. A alta infectividade e morbimortalidade associadas ao SARS-CoV-2 destacam a necessidade de estratégias terapêuticas efetivas. Embora a vacinação tenha se mostrado uma ferramenta promissora na prevenção da doença, o tratamento específico para pacientes que já contraíram o vírus ainda é um desafio. Nesse sentido, a investigação de fármacos com atividade antiviral torna-se crucial, a fim de fornecer alternativas terapêuticas seguras e efetivas para a população.

A heparina é uma classe de fármacos comprovadamente eficaz no tratamento de distúrbios tromboembólicos. Além disso, estudos prévios demonstraram o potencial antiviral da heparina em diferentes cepas virais, incluindo o SARS-CoV. Nesse contexto, a HAPM surge como uma opção promissora para o tratamento da COVID-19, uma vez que sua estrutura molecular pode interferir na entrada e replicação do vírus nas células hospedeiras, além de apresentar propriedades anti-inflamatórias.

Os protocolos de estudo em andamento para a HAPM concentram-se principalmente em seus efeitos antitrombóticos. No entanto, o presente estudo propõe uma abordagem diferente, com foco na ação antiviral e anti-inflamatória da HAPM inalatória nos alvéolos pulmonares, local principal da infecção pelo SARS-CoV-2. Assim, a análise da segurança e eficácia da HAPM inalatória em pacientes com COVID-19 pode fornecer evidências para o desenvolvimento de uma nova estratégia terapêutica contra a doença, bem como contribuir para o avanço do conhecimento na área de tratamento antiviral.

Objetivos

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste estudo foi avaliar a segurança do uso da HAPM de forma inalatória em pacientes com SARS-CoV-2 mediante parâmetros laboratoriais da coagulação e ausência de eventos adversos graves.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a eficácia do tratamento proposto frente aos parâmetros do sistema respiratório;
- Avaliar a evolução clínica dos participantes;
- Avaliar a carga viral (SARS-CoV-2) mediante coleta de *swab* nasofaríngeo;
- Avaliar o perfil infeccioso e parâmetros laboratoriais séricos;
- Avaliar o perfil inflamatório sérico através da dosagem de citocinas inflamatórias;
- Avaliar parâmetros do sistema respiratório através da tomografia computadorizada de tórax, gasometria e perfil de saturação.

Metodologia

4. METODOLOGIA

4.1 Ética

Este estudo foi realizado em conformidade com as leis e regulamentações nacionais brasileiras aplicáveis e as diretrizes internacionais, seguindo os princípios éticos estabelecidos na 18ª Assembleia Médica Mundial de Helsinki, em 1964, e suas emendas posteriores. O Comitê de Ética em Pesquisa avaliou e aprovou o estudo (CAAE 39872920.0.0000.5411) (Anexo 2). Todos os participantes ou seus representantes legais foram plenamente informados sobre os objetivos e os riscos do estudo e forneceram seu consentimento informado por escrito (Anexo 3).

4.2 Desenho do Estudo

Foi realizado um estudo clínico fase I/II, unicêntrico, randomizado, triplo cego e controlado por placebo no período de maio a agosto de 2021 no Hospital das Clínicas e na Unidade de Pesquisa Clínica (UPECLIN), ambos da Faculdade de Medicina de Botucatu da UNESP.

4.3 Critérios de Elegibilidade

4.3.1 Critérios de Inclusão

Para serem elegíveis para participar do estudo, os participantes devem atender aos seguintes critérios de inclusão:

- Ter assinado e concordado com o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE);
- Ter idade entre 18 e 90 anos, independentemente de sua origem étnica ou gênero;
- Ter sido diagnosticado com COVID-19 confirmado por RT-PCR de *swab* nasofaríngeo;
- Ter apresentado os sintomas da COVID-19 por um período menor que 14 dias antes da inclusão no estudo;
- Estar em regime de tratamento hospitalar com relação de troca gasosa ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$) acima de 200.

4.3.2 Critérios de Exclusão

Os participantes serão excluídos do estudo se atenderem a um ou mais dos seguintes critérios:

- Não concordar com o TCLE;
- Estarem grávidas ou em período de puerpério;
- Terem apresentado evolução clínica desfavorável com necessidade de intubação orotraqueal em até 48 horas após a inclusão no estudo;
- Serem portadores de doenças hematológicas que causam distúrbios da coagulação;
- Estarem em uso de anticoagulantes em dose terapêutica;
- Terem alergia à heparina ou histórico de plaquetopenia induzida por heparina, plaquetopenia com contagem inferior a 50.000 plaquetas/mm³.

4.4 Randomização e Cegamento

A randomização foi elaborada por um técnico, utilizando o programa de construção de tabelas numéricas aleatórias *Stat Trek* (Stat Trek LLC, versão 5.1, disponível em <https://stattrek.com>). Foram sorteadas 40 posições, sendo fixado o número 1 para o Grupo 1 (placebo) e o número 2 para o Grupo 2 (heparina), de forma aleatória e consecutiva. O envelope contendo a randomização ficou em posse de um profissional independente, sem conhecimento dos membros da equipe do estudo.

O ensaio clínico foi conduzido seguindo um protocolo triplo-cego. Nenhum dos participantes, investigadores ou analistas teve acesso aos dados da pesquisa durante o estudo. A randomização esteve em posse de um integrante da equipe, que não participou da execução do estudo nem do processamento dos dados. As soluções apresentavam características idênticas, sendo os frascos do placebo e da heparina visualmente indistinguíveis. Foram preparadas pela equipe de laboratório do HC-FMB e rotuladas por um funcionário que não participou do estudo. Pacientes, investigadores e analistas permaneceram cegos quanto à randomização até a análise final dos resultados.

4.5 Intervenção

4.5.1 Grupos de Estudo

Os participantes foram distribuídos aleatoriamente em uma proporção de 1:1 para o grupo placebo ou grupo heparina. O grupo 1 (placebo) recebeu inalação com 5mL de soro fisiológico 0,9%, enquanto o grupo 2 (heparina) recebeu inalação de 12,5mg de HAPM diluído em 5ml de soro fisiológico 0,9%. Ambos os grupos receberam a dose inalatória a cada 4 horas, exceto a dose da madrugada (8h, 12h, 16h, 20h e 00h), durante o período de 7 dias, totalizando 5 doses diárias e 35 doses durante o estudo.

Durante o estudo, todos os pacientes foram submetidos ao tratamento de suporte padrão conduzido pela equipe assistente, que não participou do desenho do estudo ou do processo de randomização. Foi fornecida oxigenioterapia suplementar, glicocorticoides, analgésicos e antitérmicos, além de antibióticos quando houve presença ou suspeita de agentes bacterianos associados. Todos os pacientes receberam dose profilática de 40mg diária de enoxaparina por via subcutânea. Nos casos mais graves, os pacientes foram transferidos para a UTI, onde receberam tratamento intensivo, incluindo intubação orotraqueal e ventilação mecânica.

4.5.2 Preparo e Procedimento de Administração da Medicação

Frascos estéreis individuais contendo 5mL de HAPM (2,5mg/mL) ou placebo foram preparados pelo farmacêutico, armazenados em freezer a -30°C e entregues à equipe de pesquisa em caráter cego. O frasco, contendo HAPM ou placebo, foi inserido no copo do nebulizador e administrado pela equipe de enfermagem em fonte de oxigênio (5 L/min ou conforme a necessidade do paciente) em quartos isolados, seguindo estritamente os protocolos de segurança e isolamento recomendados pela Comissão de Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde (CCIRAS) do HC-FMB. O tempo de nebulização foi de aproximadamente 15 minutos, respeitando-se as medidas de precaução para minimizar o risco de disseminação do vírus SARS-CoV-2.

4.5.3 Critérios de Descontinuidade do Estudo

Os critérios de descontinuidade do estudo foram estabelecidos de acordo com as seguintes condições:

- Retirada voluntária do consentimento por parte do participante, independentemente do motivo;
- Perda de seguimento, por qualquer motivo, durante o estudo;
- Ocorrência de eventos adversos graves, definidos de acordo com as normas da quinta versão do *Common Terminology Criteria for Adverse Events* (CTCAE).³⁹

4.6 Desfechos

4.6.1 Desfechos Primários

- Segurança do uso de HAPM de forma inalatória em pacientes com SARS-CoV-2: avaliação de eventos hemorrágicos de qualquer natureza, alteração do teste de coagulação, como alteração do teste de coagulação refletido em TTPa >1,5, trombocitopenia induzida por heparina e morte;
- Avaliação de eventos adversos locais e sistêmicos, definidos pelo CTCAE.³⁹

4.6.2 Desfechos Secundários

- Avaliação da eficácia do tratamento por meio da análise da carga viral do vírus SARS-CoV-2 nos participantes tratados;
- Avaliação do perfil inflamatório por meio da dosagem de citocinas séricas e elevação do teste de proteína C reativa (PCR) (>3mg/L);
- Avaliação do perfil infeccioso por meio do hemograma: aumento da contagem de leucócitos (>10.000 células/mm³);
- Ocorrência de pancreatite caracterizada por aumento da amilase >200 U/L;
- Deterioração da relação paO₂/pFiO₂ da gasometria arterial (<200);
- Desenvolvimento de insuficiência renal avaliada pelo aumento de ureia e creatinina;

- Avaliação da evolução respiratória por meio de imagem radiológica tomográfica: piora da área pulmonar acometida (%);
- Avaliação da evolução respiratória por meio de parâmetros clínicos: necessidade de oxigenoterapia suplementar e perfil de saturação.

4.7 Acompanhamento clínico e laboratorial

4.7.1 Momentos de Avaliação

O cronograma de visitas e avaliações é apresentado na tabela 1. Os participantes foram acompanhados por 8 dias, sendo 7 dias de tratamento com HAPM ou placebo (35 doses de inalação), durante os quais foram avaliados clinicamente diariamente, mediante realização de anamnese e exame físico, obtenção dos sinais vitais, pesquisa de eventuais eventos adversos e checagem das embalagens para confirmação da realização das inalações. A obtenção do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) ocorreu antes da inclusão dos pacientes no estudo (D0). As informações foram coletadas diariamente pelos pesquisadores e inseridas nos formulários e fichas de avaliações, incluindo dados de antecedentes epidemiológicos e pessoais (Anexo 4), avaliação clínica e exame físico (Anexo 5), achados laboratoriais e tomográficos (Anexo 6) e eventos adversos (Anexo 7).

As citocinas inflamatórias e a tomografia computadorizada de tórax foram realizadas em dois momentos: no dia da inclusão do paciente no estudo (D0) e ao final do tratamento (D7). A análise da carga viral pelo RT-PCR por *swab* nasofaríngeo e a coleta de exames laboratoriais de hemograma, D dímero, coagulograma, ureia, creatinina, proteínas totais e frações, glicemia, proteína C reativa, gasometria e amilase foram realizadas nos dias D0, D2, D5 e D7.

Ao final do tratamento e após a alta hospitalar, os pacientes foram encaminhados e acompanhados no ambulatório de COVID-19 do serviço de Infectologia do HC-FMB, seguindo o protocolo do hospital.

Tabela 1. Cronograma de avaliações e visitas

Procedimentos	V 1	V 2	V 3	V 4	V 5	V 6	V 7	V 8
	D0	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7
Termo de consentimento livre e esclarecido	X							
Avaliação dos critérios de inclusão e exclusão	X							
Visita médica	X	X	X	X	X	X	X	X
Avaliação da carga viral para Covid- 19 por RT-qPCR	X		X			X		X
Coleta dos exames laboratoriais	X		X			X		X
Coleta das citocinas inflamatórias	X							X
Tomografia de pulmão	X							X
Entrega da medicação teste	X	X	X	X	X	X	X	
Avaliação do uso da medicação (checagem de embalagem)		X	X	X	X	X	X	X
Avaliação dos eventos adversos	X	X	X	X	X	X	X	X
Crítérios de descontinuação	X	X	X	X	X	X	X	X
Finalização do tratamento do estudo								X

V: Visita; D: Dia do acompanhamento.

4.7.2 Exames Complementares

4.7.2.1 Hemograma

As amostras sanguíneas foram analisadas pelos métodos de citometria de fluxo, impedância, espectrofotometria e parâmetros calculados pelo analisador hematológico Yumizen H2500 (Horiba, Kyoto, Japão). Foram considerados como valores de normalidade: hemoglobina de 13,5 a 17,5 g/dL, hematócrito de 41 a 53%, VCM de 80 a 98 μmm^3 , RDW de 10 a 20%, plaquetas de 140 a 440 $\times 10^3/\text{mm}^3$,

leucócitos (glóbulos brancos) de 4 a 11 x10³/mm³, linfócitos de 23 a 33% e neutrófilos de 53 a 67%.

4.7.2.2 Coagulograma

Foram utilizados os métodos de análise de coagulação do analisador Destiny Max (Tcoag, Irlanda) para determinar os níveis de razão de TTPa e INR. O valor considerado normal para TTPa foi < 1,25 e para INR < 1,2.

4.7.2.3 D-Dímero

A quantificação do d-dímero sanguíneo foi realizada utilizando o analisador automatizado CS2500 (Sysmex Corporation, Kobe, Japão), seguindo as normas estabelecidas pelo fabricante. O valor de normalidade utilizado para a interpretação dos resultados foi de < 500 ng/dL.

4.7.2.4 Gasometria

As amostras de sangue foram coletadas por meio de aspiração manual e armazenadas em seringas de 1 mL. Os parâmetros oximétricos foram avaliados em sangue total utilizando um analisador RAPIDPoint® 500 (Siemens, Erlangen, Alemanha). Para a interpretação dos resultados, foram utilizados os valores de referência para pH entre 7,35-7,45, pO₂ 80-100mmHg, pCO₂ 35-45mmHg e bicarbonato entre 22-26 mEq/L.

4.7.2.5 Exames bioquímicos

Foram realizadas análises bioquímicas de amostras séricas para determinar os níveis de ureia, creatinina, proteína C reativa, amilase, proteínas totais e suas frações (albumina e globulina). A quantificação dos analitos foi realizada utilizando-se métodos colorimétricos e potenciométricos em um analisador bioquímico automatizado VITROS® XT 7600 (Ortho Clinical Diagnostics, Nova Iorque, Estados Unidos da América). As referências adotadas para os valores dos analitos foram: ureia (19 a 42 mg/dL), creatinina (0,66 a 1,25 mg/dL), proteína C reativa (< 1 mg/dL), proteínas totais (6,3 a 8,3 g/dL), albumina (3,5 a 5,0 g/dL) e

amilase (25 a 125 U/L).

4.7.2.6 Swab nasofaríngeo com RT-PCR para COVID-19

As amostras foram coletadas da nasofaringe dos pacientes com a utilização de *swab*. O RNA foi extraído do *swab* e o rRT-PCR foi realizado pelo sistema *Applied biosystems 7500 Real Time PCR* (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA) para detecção do RNA viral do SARS-CoV-2. A quantificação da carga viral foi realizada utilizando o kit TaqMan™ SARS-CoV-2 Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA), que segue a metodologia de amplificação quantitativa em tempo real (qPCR) e possui um limite de detecção de 10 cópias/mL. Os resultados foram expressos em termos de positividade ou negatividade e a carga viral foi quantificada através da comparação com um padrão de calibração de RNA sintético, utilizando a curva padrão gerada pelo fabricante. Os resultados de carga viral foram expressos em cópias/mL, e posteriormente transformados em logaritmo para análise estatística.

4.7.2.7 Citocinas inflamatórias

As citocinas foram quantificadas por meio da utilização de um kit comercial denominado LEGENDplex™ COVID 19 Cytokine Storm Panel 1 (14-plex), que permite a quantificação simultânea de 14 citocinas diferentes, incluindo IL-6, MCP-1 (CCL2), G-CSF, IFN- α 2, IL-2, IFN- γ , IL-7, IL-1RA, IL-8 (CXCL8), TNF- α , IP-10 (CXCL10), MIP-1 α (CCL3), RANTES (CCL5) e IL-10. Os reagentes, a curva padrão e a solução tampão de lavagem foram preparados seguindo as instruções do fabricante. As amostras de plasma foram previamente diluídas (1:2) em Assay Buffer. Em microplacas de 96 poços, foram adicionados 25 μ L das amostras ou de cada ponto da curva padrão, juntamente com 25 μ L de Assay Buffer nos poços das amostras, e 25 μ L de Matrix B nos poços da curva padrão. Em seguida, o mix de beads de captura (25 μ L) foi adicionado a todos os poços. As placas foram seladas e protegidas da luz para incubação sob leve agitação, por 2h em temperatura ambiente. Posteriormente, foram centrifugadas por 5 minutos a 250Xg, e invertidas para retirada do sobrenadante, adicionando-se 200 μ L de Wash Buffer (1X) em cada

poço, seguido de incubação sob agitação por 1 minuto para repetir o processo de lavagem. Após duas lavagens, adicionou-se 25µL do anticorpo de detecção em todos os poços, as placas foram seladas e protegidas da luz para incubação sob leve agitação durante 1h em temperatura ambiente. Após este período, foram adicionados 25µL do reagente SA-PE em cada poço e incubado por 30 minutos em temperatura ambiente, sob leve agitação, protegida da luz. O processo de centrifugação e retirada do sobrenadante foi repetido, adicionando em seguida 200µL de Wash Buffer em cada poço incubando por 1 minuto, realizando duas etapas processo de lavagem. As amostras foram ressuspensas em 150µL de tampão e transferidas da placa para tubos Falcon para leitura no citômetro FACSCalibur-4 cores (Becton Dickinson). A média de intensidade de fluorescência de cada analito é diretamente proporcional à concentração de citocina e os resultados foram expressos em pg/mL. Os dados foram analisados com o uso do software LEGENDPlex v8.0.

4.7.2.8 Tomografia Computadorizada de Tórax

Para a realização da tomografia computadorizada de tórax foi utilizado o tomógrafo Toshiba Activion 16 (Toshiba Medical Systems Corporation, Tochigi, Japão) com protocolo de avaliação pulmonar específico para pacientes com suspeita ou confirmação de COVID-19, que incluiu cortes axiais finos de 1 mm, sem contraste, do ápice dos pulmões até as bases, com reconstrução multiplanar nas projeções axial, coronal e sagital. As imagens foram analisadas por um único radiologista especializado.

Na avaliação da tomografia de tórax, foram considerados os parâmetros radiológicos de presença ou ausência de vidro fosco, consolidação, opacidades lineares e congestão. Além disso, foi utilizado um escore de percentual (0 a 4) para mensurar o comprometimento pulmonar em relação às áreas anormais, sendo: 0 – ausência de comprometimento pulmonar; 1 – menos de 25% da área pulmonar comprometida; 2 – entre 25% e 50%; 3 – entre 50% e 75%; e 4 – acima de 75% da área pulmonar comprometida.

4.8 Estatística

4.8.1 Cálculo Amostral

A prevalência de sangramentos clinicamente significativos decorrente da nebulização com heparina é estimada em 3%.⁴⁰ Dessa forma, o cálculo amostral foi de 24 participantes (12 para cada grupo), levando-se em consideração duas amostras independentes com o objetivo principal de avaliar a segurança do tratamento, com nível de confiança de 95% e taxa de erro de 10%. Estimando-se uma taxa de perda superior a 50%, a amostra total inicialmente proposta foi de 40 participantes.

4.8.2 Análise Estatística

Para analisar os dados de dois grupos foram utilizados métodos estatísticos descritivos e inferenciais. As variáveis qualitativas foram apresentadas por meio de distribuição de frequências absolutas e relativas. As variáveis quantitativas foram descritas por medidas de tendência central e de variação, e a normalidade foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. Na análise inferencial, os seguintes métodos foram aplicados:

- Para comparar a distribuição das variáveis qualitativas entre os grupos Placebo e Heparina, foi utilizado o teste Exato de Fisher;
- Para comparar as variáveis quantitativas entre os grupos Placebo e Heparina, foi aplicado o teste t de Student. No caso de distribuições não gaussianas ou heterocedásticas, foi utilizado o teste U de Mann-Whitney.
- Para realizar análise longitudinal comparando os momentos D0, D2, D5 e D7 em relação às variáveis quantitativas, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunn.

Foi estabelecido previamente um nível de significância (erro alfa) de 5% para a rejeição da hipótese nula. O processamento estatístico dos dados foi realizado utilizando os programas BioEstat versão 5.3 e SPSS versão 27.

4.9 Financiamento

O estudo foi realizado com os recursos provenientes da FAPESP/PPSUS, número do processo 2020/12165-8 (Anexo 8).

Resultados

5. RESULTADOS

5.1 Recrutamento e Inclusão

Setenta pacientes foram selecionados durante a triagem, 33 foram excluídos por não se enquadrarem nos critérios de elegibilidade. Assim, foram incluídos 37 pacientes (18 do grupo placebo e 19 do grupo heparina) e, destes, 27 concluíram o acompanhamento de 7 dias, dos quais 14 pertenciam ao grupo placebo e 13 ao grupo heparina. Dois pacientes (1 de cada grupo) evoluíram com melhora clínica evidente e receberam alta da equipe assistente no terceiro dia de acompanhamento, sem comunicar a equipe do estudo. Oito pacientes apresentaram evolução desfavorável rápida do quadro respiratório no dia do recrutamento (em menos de 24h da inclusão), necessitando de maiores doses de oxigênio, transferência para unidade de terapia intensiva (UTI) e intubação orotraqueal, o que impediu o seguimento por impossibilidade de receber o tratamento proposto (inaloterapia), sendo 3 participantes do grupo placebo e 5 participantes do grupo heparina (Figura 3).

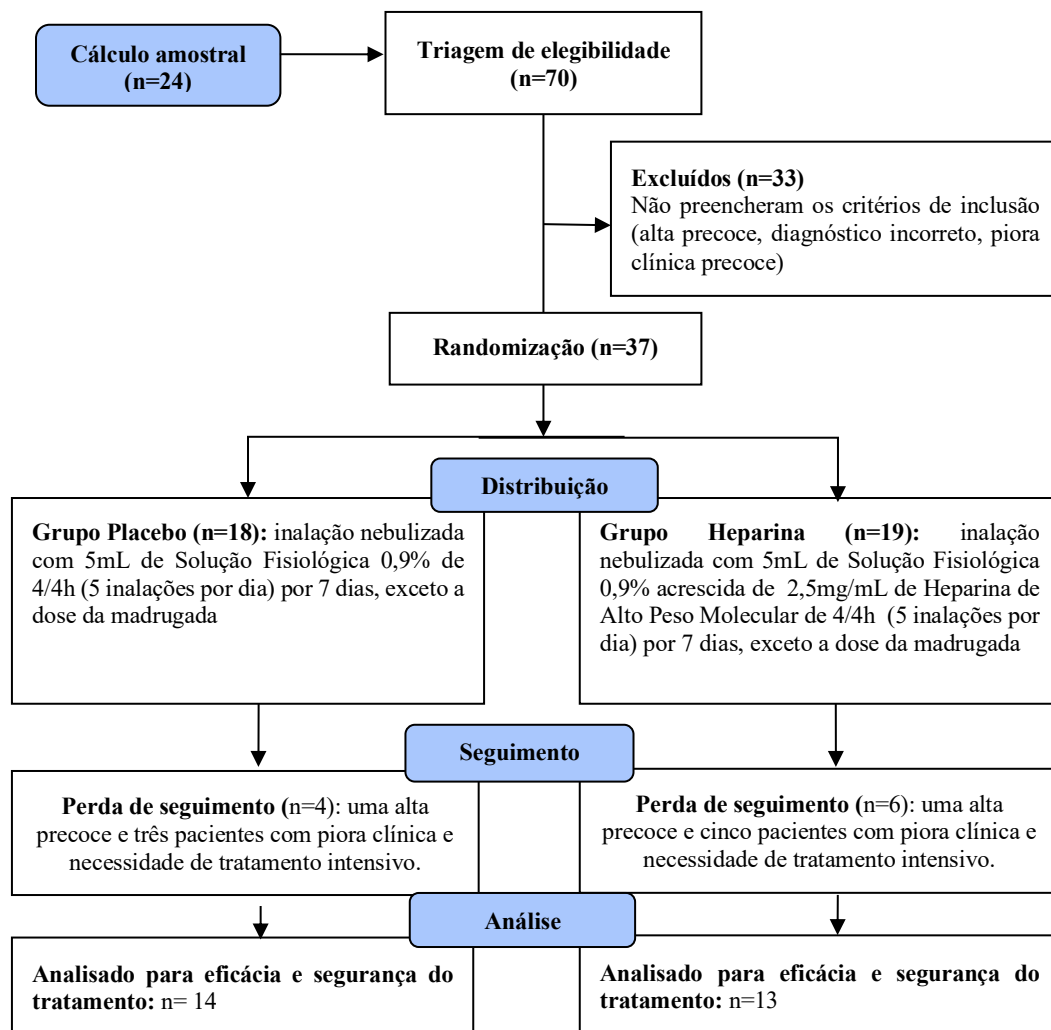


Figura 3. Fluxograma de recrutamento de pacientes de acordo com o protocolo CONSORT.

5.2 Dados Epidemiológicos

Vinte e sete participantes completaram o estudo, sendo 51,8% mulheres (14/27) e 48,2% homens (13/27). O grupo placebo representou 51,8% (14/27), com idade média de 55 anos e desvio padrão de 16,06, enquanto o grupo heparina representou 48,2% (13/27), com idade média de 50 anos e desvio padrão de 12,57. Os dados epidemiológicos analisados demonstraram que os grupos foram homogêneos (Tabela 2).

Tabela 2. Dados epidemiológicos e antecedentes pessoais da população estudada.

Variável	Grupo Placebo (n=14)	Grupo Heparina (n=13)	p-valor
Idade (anos) ^a	55±16,06	50±12,57	0.4667 *
Altura (cm) ^a	167±11,23	162±11,98	0.4375 *
Peso (kg) ^a	90,57±16,66	79,85±24,14	0.3440 *
IMC (kg/m ²) ^a	32,80±7,41	29,62±7,26	0,3958 *
Sexo Masculino ^b	57,1	38,5	0.4495 #
Sexo Feminino ^b	42,9	61,5	
Etnia Branca ^b	85,7	100	0.4815 #
Etnia Negra ^b	14,3	0	
Hipertensão arterial sistêmica ^b	64.3	46.2	0.4495 #
Doença cardíaca coronariana ^b	14.3	15.4	0.9999 #
Doença cardíaca não coronariana ^b	14.3	7.7	0.9999 #
Dislipidemia ^b	35.7	76.9	0.0542 #
Sedentarismo ^b	85.7	76.9	0.6483 #
Tabagismo ^b	7.1	15.4	0.5956 #
Ex-tabagismo ^b	14.3	30.8	0.3845 #
Alcoolismo ^b	0.0	15.4	0.9999 #
Eventos isquêmicos cerebrovasculares ^b	7.1	7.7	0.9999 #
Neoplasia ^b	0.0	0.0	0.9999 #
Transplante renal ou imunossupressão ^b	21.4	23.1	0.9999 #
Doença Auto-Imune ^b	0.0	7.7	0.4815 #
Pneumopatia ^b	7.1	15.4	0.5956 #
Hipotireoidismo ^b	0.0	15.4	0.2222 #
Depressão ^b	14.3	0.0	0.4815 #

a: dados expressos em média ± desvio padrão; b: dados expressos em %; *: p-valor associado ao teste U de Mann-Whitney; #: p-valor associado ao teste Exato de Fisher.

5.3 Evolução Clínica

A Tabela 3 apresenta a incidência dos sintomas desde o início do quadro até a entrada do paciente no estudo, para cada um dos grupos, bem como a evolução dos sintomas associados à COVID-19 durante o estudo (entre D0 e D7). A primeira coluna de cada grupo mostra a incidência do sintoma desde o início do quadro, antes da inclusão no estudo (até 14 dias). As colunas subsequentes apresentam o número de pacientes com esses sintomas no início (D0) e no final do estudo (D7).

O sintoma mais comum relatado foi tosse seca, presente em 96% dos pacientes. Além disso, 74% dos pacientes mencionaram cansaço, dor osteomuscular e dispneia. Outros sintomas que afetaram mais da metade dos pacientes foram febre (67%) e hiporexia (52%).

Observou-se que a maioria dos sintomas já havia desaparecido antes da inclusão dos pacientes no estudo e, dos que permaneceram sintomáticos em D0, a grande maioria dos sinais e sintomas desapareceram até o final do tratamento (D7). Houve uma diminuição significativa da tosse seca e da dispneia ao longo do tratamento, sem diferenças entre os grupos.

É importante ressaltar que nenhum caso de sangramento foi observado durante o período do estudo.

Tabela 3. Sinais e sintomas apresentados nos grupos placebo e tratamento.

Sintoma	Grupo	Incidência	D0	D7	p-valor
Tosse Seca	Placebo	14 (100%)	8 (57%)	1 (7%)	0.015
	Heparina	12 (92%)	8 (62%)	1 (8%)	0.015
Dispneia	Placebo	12 (85%)	7 (50%)	1 (7%)	0.031
	Heparina	8 (62%)	7 (54%)	0 (0%)	0.015
Astenia	Placebo	12 (86%)	2 (14%)	1 (7%)	0.99
	Heparina	8 (62%)	4 (31%)	0 (0%)	0.125
Mialgia	Placebo	13 (93%)	4 (29%)	0 (0%)	0.99
	Heparina	7 (54%)	3 (23%)	0 (0%)	0.25

Febre	Placebo	11 (79%)	1 (7%)	0 (0%)	0.99
	Heparina	7 (54%)	2 (15%)	0 (0%)	0.50
Hiporexia	Placebo	6 (43%)	3 (21%)	0 (0%)	0.99
	Heparina	8 (62%)	2 (15%)	0 (0%)	0.50
Cefaleia	Placebo	4 (29%)	0 (0%)	0 (0%)	0.99
	Heparina	8 (62%)	5 (38%)	1 (8%)	0.125
Diarreia	Placebo	5 (36%)	1 (7%)	0 (0%)	0.99
	Heparina	4 (31%)	1 (8%)	0 (0%)	0.99
Anosmia	Placebo	4 (29%)	0 (0%)	0 (0%)	0.99
	Heparina	4 (31%)	0 (0%)	0 (0%)	0.99
Ageusia	Placebo	4 (29%)	0 (0%)	0 (0%)	0.99
	Heparina	4 (31%)	0 (0%)	0 (0%)	0.99
Dor Torácica	Placebo	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0.99
	Heparina	4 (31%)	0 (0%)	2 (15%)	0.50
Odinofagia	Placebo	2 (14%)	0 (0%)	0 (0%)	0.99
	Heparina	1 (8%)	0 (0%)	0 (0%)	0.99
Sangramento	Placebo	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0.99
	Heparina	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0.99

Dados expressos em número absoluto e (%); p-valor associado ao teste de McNemar.

5.4 Exames Laboratoriais

Os exames laboratoriais séricos coletados nos dias D0, D2, D5 e D7 estão apresentados na Tabela 4. Houve diferença significativa, com aumento de leucócitos e amilase entre D0 e D7 para o grupo heparina, porém sem relevância clínica, pois mantiveram-se dentro dos padrões de normalidade. Com relação a Proteína C Reativa (PCR), houve queda significativa em ambos os grupos no decorrer dos dias de tratamento. Nota-se que os níveis de dímero D mantiveram-se alterados em todas as dosagens para ambos os grupos, sem diferença significativa no decorrer do tratamento.

Ressalta-se que, para os parâmetros de segurança relacionados a coagulação

sanguínea, não houve alterações significativas tanto na razão do Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (TTPa) quanto na Razão Normalizada Internacional (RNI).

Tabela 4. Exames laboratoriais dos grupos placebo e tratamento.

Exame	Grupo	D0	D2	D5	D7	p-valor [#]
Hemoglobina g/dL	Placebo	12.9±1.7	13±1.8	13.3±1.7	13.2±1.5	0.6564
	Heparina	13±2.8	12.9±3.3	13±2.7	13.4±2.8	0.9793
	p-valor*	0.5124	0.5542	0.8852	0.4628	
Leucocitos /mm ³	Placebo	9.5±4	9.2±3	10.5±3.2	12.2±3.5	0.6141
	Heparina	8±3.4	7.3±2.8	10.3±3.6	11.5±8.2	0.0097
	p-valor*	0.4375	0.1292	0.8625	0.1654	
Linfocitos /mm ³	Placebo	11.9±7.3	17±7.4	17.5±9.4	16.6±6.5	0.4332
	Heparina	22±15.8	28.4±17.1	23.8±12.3	25.4±17	0.1104
	p-valor*	0.0369	0.0350	0.1842	0.0502	
Neutrófilos /mm ³	Placebo	79.1±10.2	73.4±9	74.4±11.4	75.4±6.1	0.2101
	Heparina	68±17	61.7±17	68.7±8.9	67±17.6	0.0810
	p-valor*	0.0523	0.0449	0.2040	0.0727	
Plaquetas /mm ³ (x/1000)	Placebo	225.9±65.9	273.4±109.3	285.1±106.1	329.6±153.3	0.3565
	Heparina	258.2±113.7	330.3±141	352.7±151.7	369.1±146.1	0.3177
	p-valor*	0.4667	0.1228	0.1659	0.3841	
INR	Placebo	1.2±0.1	1.2±0.1	1.2±0.2	1.1±0.1	0.2847
	Heparina	1.1±0.2	1.2±0.2	1.1±0.1	1.1±0.2	0.4584
	p-valor*	0.3520	0.3226	0.1877	0.9783	
Razão TTPa	Placebo	0.9±0.2	1±0.1	1±0.3	1.2±0.8	0.5432
	Heparina	1.1±0.2	1.1±0.3	1.1±0.3	1.1±0.2	0.6711
	p-valor*	0.0221	0.0905	0.5561	0.1086	
TTPa seg	Placebo	26.7±5	27.7±3.1	29.9±7.9	33.6±23.1	0.6231
	Heparina	30.5±6.2	32.5±8.5	31.3±8.8	32.2±6.8	0.5380
	p-valor*	0.0236	0.1029	0.5561	0.1147	

Dimero ng/mL	Placebo	949.8±464.2	1091.1±415.7	1353±1435.7	1132±1160.3	0.8236
	Heparina	923.2±536.5	1016.6±1089.2	982.2±1008.2	1000.5±1229.6	0.6830
	p-valor*	0.9769	0.0940	0.2689	0.2040	
Proteína C Reativa mg/dL	Placebo	11.2±7.4	4.5±5.5	3.6±6.4	2.6±5.7	0.0001
	Heparina	9.3±6.8	3.3±2.5	2.8±4.7	3.6±8.9	0.0003
	p-valor*	0.5441	0.4715	0.3299	0.8651	
Ureia mg/dL	Placebo	60.4±37.1	53.9±19.3	46.2±24	47.1±20.4	0.2353
	Heparina	33.1±7.1	34.5±10.2	38.3±11.8	43.8±15.2	0.1305
	p-valor*	<0.0001	0.0076	0.3693	0.9227	
Creatinina mg/dL	Placebo	1.4±1.9	1.1±0.9	0.9±0.6	1.1±0.7	0.4637
	Heparina	1±1.3	0.9±0.8	1±0.8	1±0.9	0.3697
	p-valor*	0.6275	0.2968	0.9795	0.6104	
Amilase g/dL	Placebo	104.5±63	108.4±47.8	103.5±56.6	115.7±62.5	0.9323
	Heparina	59.8±27.6	71±25.4	79.5±28.9	92.9±39.8	0.0239
	p-valor*	0.0153	0.0193	0.4173	0.4375	
Proteínas Totais g/dL	Placebo	6.3±0.4	6.2±0.6	6.3±0.6	6.5±0.6	0.4377
	Heparina	6.5±0.7	6.5±0.6	6.4±0.4	6.8±0.4	0.3299
	p-valor*	0.5112	0.1711	0.7857	0.1649	
Albumina g/dL	Placebo	3.3±0.3	3.2±0.4	3.2±0.5	3.3±0.4	0.6474
	Heparina	3.2±0.4	3.2±0.4	3.3±0.3	3.5±0.4	0.8454
	p-valor*	0.9563	0.8267	0.0004	0.3159	
Globulina g/dL	Placebo	1.9±0.1	1.9±0.2	2±0.1	2±0.2	0.7676
	Heparina	2±0.3	2.1±0.3	2±0.2	2±0.2	0.8284
	p-valor*	0.7843	0.2284	0.4303	0.7773	
Hematócrito %	Placebo	39.4±5.4	39.3±5.3	40.5±5.2	40.4±4.5	0.7464
	Heparina	39.3±7.9	39.8±9.6	39.8±7.6	41.8±8.2	0.9950
	p-valor*	0.7524	0.5203	0.9540	0.3143	
VCM f/L	Placebo	88.2±4	88.1±4.3	88±4.3	88.3±3.9	0.4536
	Heparina	85.5±8.3	85.3±7.5	85.7±7.9	85.2±7.1	0.7739
	p-valor*	0.4375	0.4404	0.6442	0.2109	

RDW %	Placebo	13.5±1.2	13.5±1	13.5±1	13.5±0.8	0.5353
	Heparina	14.4±3.7	14.5±3.5	14.6±3.2	15.4±5	0.7959
	p-valor*	0.7896	0.9590	0.6442	<0.0001	

Dados expressos em média ± desvio padrão; *Teste de Kruskal-Wallis; #Teste U de Mann-Whitney.

5.5 Citocinas

O perfil inflamatório avaliado pela análise de citocinas séricas demonstrou alta variabilidade numérica, o que dificultou a observação de diferenças entre os grupos (Tabela 6). Entretanto, podemos destacar que houve diminuição significativa da IL-6 e aumento significativo da IL-2 para o grupo tratado com HAPM inalatória. A CXCL10 apresentou queda significativa entre os dias de tratamento para ambos os grupos. As demais interleucinas não apresentaram diferença estatisticamente significativa no decorrer do tratamento.

Tabela 5. Avaliação de marcadores inflamatórios em D0 e D7.

Marcador	Grupo	D0	D7	p-valor [#]
IL-6 (1M)	Placebo	33±46.6	17.9±26.9	0.0541
	Heparina	30.8±28.4	9.9±8.6	0.0049
	p-valor*	0.8312	0.5184	
MCP-1(CCL2) (1M)	Placebo	192.4±78.2	171.9±60.1	0.4322
	Heparina	131±45.3	143.5±46.5	0.4728
	p-valor*	0.0184	0.3692	
G-CSF (1M)	Placebo	115.4±67.4	138.4±69.2	0.3288
	Heparina	160.6±105.4	110.5±77.7	0.2265
	p-valor*	0.4808	0.3291	
IFN-α2 (1M)	Placebo	9±3	8.5±9.1	0.7112
	Heparina	6.9±7.2	6.4±5.5	0.9025
	p-valor*	0.2170	0.7576	
RANTES(CCL5) (1M)	Placebo	1728.3±647.3	1436.3±760.6	0.3299
	Heparina	1285.3±490.8	1518.6±660.9	0.2648

	p-valor*	0.1096	0.5820	
IL-2 (1M)	Placebo	4.9±3.5	3.7±1.5	0.8598
	Heparina	3±1.4	6±4.3	0.0346
	p-valor*	0.1914	0.2545	
IL-7 (1M)	Placebo	18.3±12.4	10.9±9.6	0.5444
	Heparina	17.3±14.6	17.3±11.5	0.6261
	p-valor*	0.5981	0.0721	
IL-1RA (1M)	Placebo	599±323.4	724.6±598	0.6464
	Heparina	685.9±357.8	756.1±356.4	0.898
	p-valor*	0.4382	0.5820	
CXCL10(IP-10) (1M)	Placebo	639.6±218.7	307.3±149	0.0019
	Heparina	729.7±398	294±141.5	0.0035
	p-valor*	0.6642	0.5149	

Dados expressos em média ± desvio padrão; *Teste de Kruskal-Wallis; #Teste U de Mann-Whitney.

5.6 Avaliação de Parâmetros Respiratórios

Para análise dos parâmetros respiratórios foram obtidos os sinais vitais, incluindo saturação periférica de oxigênio, necessidade de oxigenoterapia suplementar e análise da gasometria arterial. Os sinais vitais e a oxigenoterapia suplementar foram avaliados em todos os dias do acompanhamento (D0 a D7) e a gasometria arterial foi realizada em 4 momentos (D0, D2, D5 e D7).

Não houve diferença da evolução dos sinais vitais para ambos os grupos, que mantiveram-se estáveis durante o acompanhamento, porém, os pacientes que receberam a inalação com heparina, apresentaram diminuição significativa da necessidade de oxigenoterapia suplementar quando comparados aos do grupo placebo (p=0,0031).

Quanto aos achados da gasometria apresentados, nota-se que os pacientes do grupo heparina apresentaram aumento significativo da relação PaO₂/FiO₂

atingindo valores de normalidade de forma mais precoce do que os pacientes do grupo placebo ($p=0,0316$).

Tabela 6. Resultados de gasometria dos grupos placebo e tratamento.

Variável	Grupo	D0	D2	D5	D7	p-valor [#]
pH	Placebo	7.4±0.1	7.4±0	7.5±0	7.5±0	0.4343
	Heparina	7.4±0.1	7.4±0	7.4±0	7.4±0.1	0.3479
	p-valor*	0.3477	0.5006	0.1358	0.0200	
pCO ₂ (mmHg)	Placebo	33.7±6.7	34.8±3.7	34±2.4	32.8±4.3	0.0646
	Heparina	35.9±8.2	36.2±2.4	36.6±4.7	33±7.6	0.3607
	p-valor*	0.2057	0.1939	0.0833	0.7440	
pO ₂ (mmHg)	Placebo	69.2±12.3	77.9±16.6	72.5±8.2	84±27.9	0.4333
	Heparina	81.8±23.2	76.9±18.6	76.7±26.7	77.7±11.9	0.4580
	p-valor*	0.1416	0.3359	0.8474	0.5403	
PaO ₂ /FiO ₂	Placebo	242±52.4	252.6±112.7	257.5±96.6	351.8±171.5	0.3302
	Heparina	271.8±73.1	292±98.1	333±144.4	353.9±62.4	0.0316
	p-valor*	0.1914	0.3865	0.2898	0.4624	
SO ₂ (%)	Placebo	93.3±3.3	94.7±2.5	94±1	95.4±2.6	0.4313
	Heparina	95.1±3.3	94.3±2.9	93.8±3.7	95±2.2	0.3633
	p-valor*	0.0942	0.5637	0.5966	0.8703	
Lactato	Placebo	1.8±0.5	1.6±0.5	1.9±0.4	1.8±0.5	0.5435
	Heparina	1.6±0.5	1.7±0.5	2±0.6	1.9±0.5	0.3160
	p-valor*	0.2885	0.3606	0.4134	0.8703	
HCO ₃ (mEq/L)	Placebo	21.9±6.2	23.2±3.5	23.5±1.8	22.1±2.9	0.2561
	Heparina	23.5±7.3	24.3±2.9	24.3±3	21.1±5.6	0.1443
	p-valor*	0.1651	0.3123	0.2898	0.9674	
BE (Base Excess)	Placebo	-1.9±6.1	-0.5±3.5	0.2±1.5	-1.2±2.6	0.4334
	Heparina	-0.7±7.4	0.5±3.1	0.5±2.8	-2.7±5.6	0.1402
	p-valor*	0.3272	0.3123	0.3606	0.9349	
Suporte de O ₂	Placebo	2.6±1.1	1.8±2.3	2±4	1.5±4.1	0.5917

(litros/min)	Heparina	2.9±1.4	1.7±1.3	0.3±0.4	0.3±0.6	0.0031
	p-valor*	0.3958	0.4667	0.1907	0.9420	

Dados expressos em média ± desvio padrão; *Teste de Kruskal-Wallis; #Teste U de Mann-Whitney.

5.7 Carga viral

A carga viral foi analisada através da técnica de RT-PCR da amostra de *swab* nasofaríngeo coletada em D0, D2, D5 e D7. Apesar da notável diminuição da carga viral em relação ao tempo para os dois grupos, não houve diferença estatisticamente significativa.

Tabela 7. Resultados quantitativos de carga viral em avaliação longitudinal.

Variável	Grupo	D0	D2	D5	D7	p-valor [#]
Carga Viral	Placebo	5.1±1.4	2.2±2.1	2.4±1.9	2.4±1.9	0.4343
	Heparina	3.7±1.9	2±2.1	2.3±2.1	2.3±2.1	0.0995
	p-valor*	0.0523	0.7896	0.8083	0.8083	

Dados expressos em média ± desvio padrão; *Teste de Kruskal-Wallis; #Teste U de Mann-Whitney.

5.8 Análise da Tomografia Computadorizada de Tórax

Os resultados da avaliação estão apresentados na Tabela 8 e foi observado que os pacientes tratados com HAPM inalatória apresentaram diminuição significativa da congestão pulmonar, quando comparados com os pacientes do grupo placebo. Quanto a análise dos escores de acometimento pulmonar, houve diminuição significativa entre o D0 e D7, porém sem diferença entre os grupos.

Tabela 8. Alterações tomográficas e escore de acometimento pulmonar em D0 e D7.

Alterações	Placebo (n=14)			Heparina (n=13)		
	D0	D7	p-valor*	D0	D7	p-valor*
Vidro fosco	14 (100%)	14 (100%)	0.9999	13 (100%)	13 (100%)	0.9999
Consolidações	7 (50%)	3 (21,4%)	0.2188	5 (38,5%)	2 (15,4%)	0.4531
Opacidades Lineares	14 (100%)	13 (92,9%)	0.9999	12 (92,3%)	12 (92,3%)	0.9999

Congestão Pulmonar	10 (71,4%)	4 (28,6%)	0.0703	12 (92,3%)	3 (23,1%)	0.0039
Escore de Acometimento Pulmonar						
Escore 0: Sem alteração	0 (0%)	0 (0%)	0.0003 [#]	0 (0%)	1 (7,7%)	0.0005 [#]
Escore 1: < 25%	1 (7,1%)	7 (50%)		2 (15,4%)	8 (61,5%)	
Escore 2: 25% a 50%	7 (50%)	5 (35,7%)		6 (46,1%)	4 (30,8%)	
Escore 3: 50% a 75%	5 (35,7%)	0 (0%)		5 (38,5%)	0 (0%)	
Escore 4: ≥75%	1 (7,1%)	2 (14,3%)		0 (0%)	0 (0%)	

Dados expressos em número absoluto e (%); *Teste McNemar; [#]Teste de Qui-Quadrado de Independência.

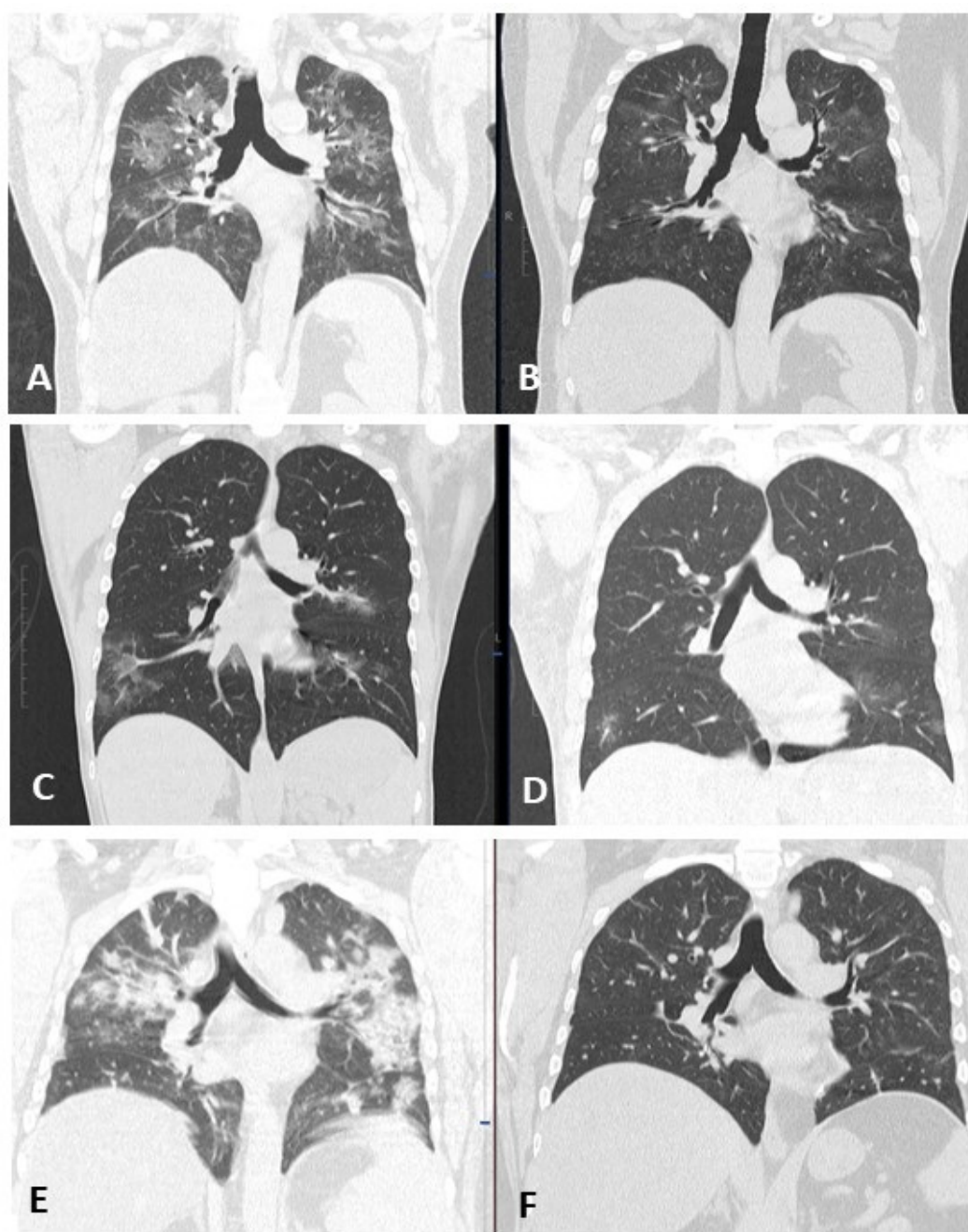


Figura 4. Resultados tomográficos do padrão de acometimento pulmonar. **Paciente 7** – **A:** Pré-tratamento com escore 3; **B:** Pós-tratamento com escore 1; **Paciente 12** – **C:** Pré-tratamento com escore 2; **D:** Pós-tratamento com escore 1; **Paciente 23** – **E:** Pré-tratamento com escore 3; **F:** Pós-tratamento com escore 1. **Autor:** Grillo VTRS, 2023.

Discussão

6. DISCUSSÃO

A HNF possui propriedades antivirais, anti-inflamatórias e anticoagulantes relevantes e que foram recentemente avaliadas para a infecção por SARS-CoV-2.⁴¹

Em ensaios clínicos pré-pandemia, realizados em diversas situações clínicas, incluindo injúria pulmonar de grandes queimados, por vezes, em associação com outros medicamentos (n-acetilcisteína e salbutamol), foi demonstrado que a heparina inalatória reduz a coagulopatia pulmonar, diminuindo o risco de eventos trombóticos microvasculares, além da associação com a melhora do suporte ventilatório, diminuição de atelectasias, otimização da eliminação de CO₂.^{42,43}

Phelps et al. (2020)⁴⁴ realizaram revisão sistemática sobre o uso de HNF inalatória para o tratamento de lesão inalatória em queimados e observaram a diminuição do tempo de ventilação mecânica, sem aumento do risco de sangramento, porém, sem diminuição de mortalidade.

No presente estudo, a utilização de HAPM inalatória não alterou significativamente os exames de coagulograma na comparação com o grupo controle, assim como não foi observado qualquer evento adverso hemorrágico, indicando que possa ser uma medicação segura nas condições empregadas.

Um estudo randomizado e controlado por placebo incluiu 60 pacientes com SDRA grave, que foram divididos para utilização de HNF inalatória, estreptoquinase ou placebo, e não observou nenhum efeito sobre marcadores de coagulação sistêmica.⁴⁵ Recentemente, uma série de casos retrospectiva avaliou a HNF inalatória em 98 paciente e observou que, embora ocorresse alteração estatisticamente significativa nos valores de coagulograma, não produziu um aumento clinicamente relevante (valores dentro da faixa de normalidade), corroborando com nossas observações a respeito da segurança da medicação.⁴¹

Em nosso estudo, exceto pelo aumento da amilase e dos leucócitos, que não apresentaram relevância clínica, não foram observadas diferenças na avaliação dos exames laboratoriais entre os grupos do estudo. Isso sugere que não houve absorção

sistêmica significativa do medicamento e que nenhum efeitos colateral foi observado nos demais sistemas do organismo, o que também corrobora com a segurança da HAPM inalatória.

Quanto aos parâmetros respiratórios, um ensaio clínico recente controlado por placebo foi realizado para investigar o uso de heparina de baixo peso molecular (HBPM) inalatória no tratamento da hipoxemia em pacientes com COVID-19. Os resultados desse estudo demonstraram uma melhora significativa nos casos de hipoxemia grave e uma redução na necessidade de tratamento com oxigênio ao final do período de tratamento de 10 dias.⁴⁶

Outro estudo multicêntrico, randomizado e controlado avaliou a administração de HNF por meio de um nebulizador acoplado ao ventilador mecânico de pacientes intubados, durante um período de 10 dias, com o objetivo de observação a recuperação física de pacientes com hipoxemia grave, a longo prazo. Os resultados mostraram que, embora não tenha sido observada melhora no desempenho de atividades físicas diárias após o período de intubação, a terapia foi bem tolerada. Além disso, os resultados sugeriram que houve uma menor progressão da lesão pulmonar para fibrose e alta hospitalar mais precoce.⁴⁰

No presente ensaio clínico, foi observado diminuição precoce e significativamente relevante na necessidade de oxigenioterapia suplementar para o grupo tratado com HAPM inalatória. Além disso, houve aumento significativamente relevante da relação PaO_2/FiO_2 de forma precoce no grupo tratado com HAPM, o que pode indicar um efeito anti-inflamatório/antitrombótico no tecido e na vascularização pulmonar.

Quanto a evolução clínica dos portadores de COVID-19, os sintomas mais comumente relatados na literatura incluem a tosse seca, dispneia, astenia e febre, o que também foi observado em nossa amostra.³ Na evolução do tratamento, houve diminuição significativa de tosse seca e dispneia para ambos os grupos, representando a evolução natural dos doentes que foram corretamente tratados e não apresentaram evolução rapidamente desfavorável por fatores apresentarem fatores de risco ou susceptibilidade constitucional. Entretanto, foi possível observar em

nossa amostra que, para a maioria dos parâmetros clínicos, houve melhora importante após o período de internação de 7 dias, o que corrobora com achados de literatura em que o tratamento clínico de suporte, associado com o uso de glicocorticoides e oxigenoterapia suplementar, além de antibioticoterapia quando necessária, são os grandes responsáveis por promover a maior parte do processo de controle da doença.^{47,48}

Com base na ausência de alterações clinicamente significativas nos exames laboratoriais e na não ocorrência de sangramentos ao longo do presente estudo, podemos considerar que a administração inalatória da HAPM é segura.

Quanto a avaliação do processo inflamatório provocado pela COVID-19, nosso estudo observou os valores de PCR, marcador do processo inflamatório de fase aguda, amplamente utilizada no contexto de infecção da COVID-19 devido à sua correlação com a inflamação. Há, na literatura científica, correlação estabelecida entre níveis elevados de PCR e maior taxa de mortalidade.⁴⁹ No presente estudo, houve queda significativa da PCR em ambos os grupos, sugerindo diminuição da inflamação no decorrer dos dias de internação, o que poderia ser justificado pelo tratamento suporte com glicocorticoides e/ou a evolução natural de cura da doença.

Em investigações prévias dos valores das citocinas inflamatórias, envolvidas com manifestações graves de infecções por outros tipos de coronavírus, foram observados aumentos nos níveis de várias citocinas inflamatórias como: IL-2; IL-6; TNF- α ; e MCP-1. Portadores de formas graves de COVID-19 também apresentam altas taxas de citocinas inflamatórias no plasma e no lavado broncoalveolar.⁴¹ Tal processo, também conhecido como “tempestade de citocinas”, foi responsabilizado por grande parte do desenvolvimento das complicações respiratórias da SARS provocada pela COVID-19. Estudos realizados em modelos de células alveolares humanas constataram que a HNF inibe a via NF- κ B, promovendo a diminuição significativa de IL-6, TNF- α e MCP-1, o que poderia influenciar no controle dos eventos de agravamento da doença.^{50,51}

Pacientes internados devido à forma grave de COVID-19 apresentam níveis

séricos elevados de IL-2, IL-7, IL-10, G-CSF, TNF, CXCL10, MCP1 e MIP1 α . Dentre esses mediadores, destaca-se que os níveis de IL-6 são significativamente mais altos em pacientes que evoluíram com óbito pela doença, além de estarem diretamente associados a necessidade de ventilação mecânica.

A interleucina-6 (IL-6) é uma citocina que desempenha um papel crucial na resposta imune inata e adaptativa. É produzida por várias células, incluindo monócitos, células endoteliais e fibroblastos, em resposta à presença de microrganismos. A IL-6 é normalmente expressa em níveis baixos, exceto durante infecções, traumas ou outros eventos estressantes e sua elevação está associada a processos inflamatórios, podendo desempenhar um papel significativo na regulação imunológica.⁵² Níveis elevados de IL-6 foram associados à gravidade da COVID-19, sendo que o seu monitoramento pode ajudar na detecção precoce da evolução desfavorável.⁵³

Um estudo avaliou a utilização do inibidor do receptor de IL-6 para o tratamento de pacientes graves com COVID-19 e observou menor mortalidade dos pacientes quando utilizadas de forma precoce.⁵⁴ Nosso estudo evidenciou diminuição significativa de IL-6 para os pacientes que utilizaram HAPM inalatória, o que pode ser um resultado bastante promissor para o controle da resposta inflamatória em pacientes com COVID-19.

Nesse estudo, também se observou diferença significativa da IL-2 entre os grupos durante o tratamento, sendo que aumentou nos pacientes tratados com a HAPM inalatória em relação ao controle. Apesar de ser uma citocina inflamatória, a IL-2 é uma mediadora importante da ativação de linfócitos T e B, que desempenham um papel fundamental na resposta imune antiviral. O aumento da IL-2 sugere que a HAPM pode estar estimulando a resposta linfocitária de defesa contra o vírus e pode indicar um processo positivo que precisa ser melhor elucidado.

Os níveis de CXCL10 reduziram significativamente nos dois grupos ao longo do tratamento, o que se relaciona a evolução favorável dos doentes, de forma geral. As demais citocinas avaliadas não apresentaram resultados suficientes análise, o que pode ser justificado pela labilidade molecular e rápida degradação nas

amostras.

Em relação à carga viral, não foi observada diferença estatisticamente significativa na comparação entre os grupos, porém houve uma redução significativa ao longo do tempo de tratamento nos dois grupos. Esses resultados sugerem que o tratamento padrão atualmente utilizado é eficaz na obtenção de uma boa resposta clínica, mesmo sem a administração de terapêutica antiviral direcionada. A redução da carga viral ao longo do tempo indica que o próprio sistema imunológico do paciente, juntamente com o tratamento de suporte, pode ser eficiente no controle da infecção viral, tendo em vista que os valores observados nessa fase tardia da doença já são praticamente indetectáveis e não são tão responsáveis pela gravidade tardia da doença.

A análise dos escores de acometimento pulmonar através da TC pulmonar revelou uma melhora significativa em ambos os grupos, durante a intermação. No entanto, uma observação importante foi feita em relação aos pacientes tratados com HAPM inalatória, os quais apresentaram uma diminuição significativa da congestão pulmonar em comparação com os pacientes do grupo placebo. Essa descoberta sugere que a HAPM pode desempenhar um papel relevante no rearranjo da arquitetura pulmonar, especialmente na redução do processo inflamatório. Essa melhora deve ser atribuída às propriedades específicas das heparinas na formação da fibrina e representa um achado bastante significativo desse estudo.

Limitações

7. LIMITAÇÕES

Este estudo apresenta algumas limitações que devem ser consideradas. Primeiramente, a quantidade de participantes incluídos foi afetada pela concorrência com outros projetos financiados pela indústria farmacêutica, o que dificultou a inclusão de um número maior de participantes, apesar de atingir o cálculo amostral previsto para análise de segurança. Além disso, a gravidade da doença levou à exclusão precoce de alguns participantes, o que pode ter impactado nos resultados de alguns dos parâmetros investigados.

Dois participantes foram excluídos devido a alta precoce, por decisão da equipe assistente que não seguiu o protocolo do estudo, interferindo no estudo. Além disso, o atraso na data prevista para o início do estudo, devido a problemas burocráticos locais, afetou a inclusão de participantes durante boa parte do pico da segunda onda da pandemia e diminuiu a probabilidade de inclusão de participantes.

É importante destacar que a efetiva vacinação em massa na cidade de Botucatu, onde o estudo foi realizado, resultou, de forma muito positiva, na redução de pacientes internados. Entretanto, isso diminuiu o número de pacientes que poderiam ser incluídos no estudo, após agosto de 2021.⁵⁵

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 $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$;
- 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, Perkhof 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, Guillaumat-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

.

Anexos

10. ANEXOS

10.1 Anexo 1: Patente de invenção: composição de heparina não fracionada de alto peso molecular para ação antiviral e respectivo uso.



Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2020 011964 8

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 48031818000124

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Rua Quirino de Andrade, 215

Cidade: São Paulo

Estado: SP

CEP: 01049-010

País: Brasil

Telefone: 11 56270217

Fax: 11 56270103

Email: suin@unesp.br

PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 15/06/2020 às 12:20, Peça 870200073996

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): COMPOSIÇÃO DE HEPARINA NÃO FRACIONADA DE ALTO PESO MOLECULAR PARA AÇÃO ANTIVIRAL

Resumo: Trata-se de composição de heparina não fracionada de alto peso molecular cujo mecanismo farmacológico compreende um agente modulador na infecção por SARS-CoV-2 tendo ação em proteínas de adesão e inibindo a divagem viral. O uso da composição de heparina não fracionada de alto peso molecular compõe a diminuição da carga viral entre 90 a 100% em cópias virais/mL.

Figura a publicar: 1**Dados do Procurador**

Procurador:**Nome ou Razão Social:** Renan Padron Almeida**Numero OAB:****Numero APT:****CPF/CNPJ:** 33778301896**Endereço:** Rua Joaquim Antunes 819**Cidade:** São Paulo**Estado:** SP**CEP:** 05415012**Telefone:** 1156270570**Fax:****Email:** renan.padron@unesp.br**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 15/06/2020 às 12:20, Petição 870200073996

Dados do Inventor (72)

Inventor 1 de 7

Nome: ANDREI MOROZ

CPF: 31102750824

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Av. Pio Correa Pinheiro 651

Cidade: Araraquara

Estado: SP

CEP: 14807-031

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email:

Inventor 2 de 7

Nome: EDISON LUIZ DURIGON

CPF: 00424202883

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Av. Lineu Prestes 1374, Butantã

Cidade: São Paulo

Estado: SP

CEP: 05508-000

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email:

Inventor 3 de 7

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 15/06/2020 às 12:20. Petição 870200073996

Nome: LENIZE DA SILVA RODRIGUES

CPF: 36387813808

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Biólogo, biomédico e afins

Endereço: Rua Waldemar de Brito 1-142

Cidade: Bauru

Estado: SP

CEP: 17033-400

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email:

Inventor 4 de 7

Nome: MARCONE LIMA SOBREIRA

CPF: 45401438320

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Médico

Endereço: Av. Prof. Mário Rubens Guimarães Montenegro

Cidade: Botucatu

Estado: SP

CEP: 18618-970

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email:

Inventor 5 de 7

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 15/06/2020 às 12:20, Petição 870200073996

Nome: MARIA INÊS DE MOURA CAMPOS PARDINI

CPF: 79366520663

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Fiscal: Pesquisador

Endereço: Rua Joaquim do Amaral Gurgel, 331

Cidade: Botucatu

Estado: SP

CEP: 18606-020

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email:

Inventor 6 de 7

Nome: MATHEUS BERTANHA

CPF: 25925804848

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Fiscal: Médico

Endereço: Rua Dr. Domingos Minicucci Filho, 312

Cidade: Botucatu

Estado: SP

CEP: 18607-030

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email:

Inventor 7 de 7

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 15/06/2020 às 12:20, Petição 87020073996

Nome: RAFAEL RAHAL GUARAGNA MACHADO
CPF: 40230858805
Nacionalidade: Brasileira
Qualificação Física: Biólogo, biomédico e afins
Endereço: Rua Sergipe, 627 – Consolação
Cidade: São Paulo
Estado: SP
CEP: 01243-001
País: BRASIL
Telefone:
Fax:
E-mail:

Documentos anexados

Tipo Anexo	Nome
Procuração	Proc e Posse 07-2018.pdf
Comprovante de pagamento de GRU 200	comprovante GRU 16 228672.pdf
Relatório Descritivo	Relatório.pdf
Reivindicação	Reivindicações.pdf
Desenho	UNESP_Heparina Covid19_figura.pdf
Resumo	Resumo.pdf

Acesso ao Patrimônio Genético

- ☒ Declaração Negativa de Acesso - Declaro que o objeto do presente pedido de patente de invenção não foi obtido em decorrência de acesso à amostra de componente do Patrimônio Genético Brasileiro, o acesso foi realizado antes de 30 de junho de 2000, ou não se aplica.

Declaração de veracidade

- ☒ Declaro, sob as penas da lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 15/06/2020 às 12:20, Petição 870200073996

"COMPOSIÇÃO DE HEPARINA NÃO FRACIONADA DE ALTO PESO MOLECULAR PARA AÇÃO ANTIVIRAL E RESPECTIVO USO".

CAMPO TÉCNICO DA INVENÇÃO

[001] A presente patente de invenção trata de composição de heparina não fracionada de alto peso molecular para ação antiviral, especificamente, no tratamento da COVID-19 onde no presente invento, é aplicada como segundo uso, uma vez que, demonstra não só novidade, inventividade decorrente de inúmeras pesquisas e testes, bem como aplicação industrial, como efeito antiviral associado a efeito antitrombótico e baixa citotoxicidade às células humanas.

HISTÓRICO DA INVENÇÃO

[002] Como é de conhecimento, as composições de heparina de alto peso molecular já estão descritas na literatura como vislumbrado no documento de nº. BR 10.2014.027804-4 que trata de processo de desenvolvimento de heparina não fracionada de alto peso molecular, heparina não fracionada de alto peso molecular e usos da mesma, produzida por filtração por peso molecular em tubo de concentração e purificações moleculares utilizando heparina não fracionada (HNF) que possui um "pool" de moléculas de variados pesos moleculares (5000 a 33000 Da) e então elimina a fração de baixo peso, pois o filtro elimina as moléculas menores que 10000Da, restando heparina de alto peso molecular. Supracitado documento relata o novo uso da mesma para tratamento, controle, e prevenção de câncer metastático.

[003] No artigo 'Capila I, Linhardt RJ. Heparin-protein interactions. *Angew Chem Int Ed Engl* 2002; 41:391-412. é apresentada todas as interações entre heparinas e heparan sulfato com as células e seu potencial antiviral, inibidor de adesão celular, regulador de inúmeras funções celulares. Há evidências recentes de que o tratamento com heparina reduz as metástases tumorais em camundongos, inibindo as interações das plaquetas mediadas por P-selectina com ligantes de mucina nas superfícies celulares do carcinoma.

[004] No artigo de Catani R., Bertini Júnior A., Pessa CIN, Gomes WJ, Lourenço DM, Nader HB, Dietrich CP, Branco JNR, Buffolo E. - "High molecular weight heparin. An alternative in extracorporeal circulation surgery: an experimental study" - Ver. Bras. Cir.

Cardiovasc 2001; 16:160-170 é relatado que isolou-se uma heparina de alto peso molecular (HAPM - peso modal de 25.000 Da), com 11 % de frações de HBPM (< 7.000 Daltons), para experiências "in vitro" e "in vivo", e comparou-se seu resultado como anticoagulante com a HNF (peso modal de 15.000 Daltons), com 21% de frações de HBPM. Os resultados mostraram atividade específica anticoagulante, por massa, superior quando comparada com a HNF tanto "in vitro", 273 ui/mg contra 181 ui/mg e TTPA mais elevado nas várias diluições, como "in vivo", em cães, durante CEC, comprovado pelo TCA, TTPA e heparinemia. A vida média da HNF foi de 60 minutos e acima de 90 minutos para a HAPM, na situação de experimentação. Conclui-se que a HAPM possa ser utilizada em seres humanos, para averiguação da sua melhor neutralização pela protamina e menor incidência de hemorragia intraoperatória.

[005] No artigo "Pourianfar HR, Poh CL, Fecondo J, Grollo L. *In vitro* evaluation of the antiviral activity of heparan sulfate mimetic compounds against Enterovirus 71." *Virus Res* 2012; 169:22-29, revela que o enterovírus 71 (EV71) é o agente causador da febre aftosa (HFMD) e também pode causar complicações neurológicas fatais para as quais atualmente não há vacina ou medicamento antiviral aprovado. Apesar das sugestões de que os compostos do tipo sulfato de heparano (HS) sejam antivirais eficazes contra vários vírus, nenhuma pesquisa foi realizada para examinar seus efeitos no EV71. Portanto, este estudo teve como objetivo investigar o efeito anti-EV71 in vitro de miméticos do HS (heparina, sulfato de heparano e polissulfato de pentosano). Os resultados revelaram que todos os compostos exibiram ações antivirais significativas ($p < 0,05$) contra o EV71 em concentrações inferiores a 250 µg/mL, em comparação ao controle de vírus e controle positivo, ribavirina. Entre os compostos, a heparina exibiu a atividade antiviral mais potente, pois 7,81 µg/mL impediram a infecção em mais de 90% ($p < 0,05$). Os ensaios para estudar o modo de ação revelaram que todos os compostos eram capazes de exercer atividade antiviral através do impedimento da ligação viral às células. Além disso, alguns dos compostos podem inibir a replicação viral quando adicionados às células 1 h antes da infecção, mas nenhum reduziu significativamente a penetração viral. No geral, esta pesquisa revelou que os compostos miméticos do HS podem inibir a infecção pelo EV71 e que o HS pode estar envolvido nas interações das

células hospedeiras do EV71, pois a ligação do vírus às células hospedeiras foi significativamente prejudicada pelos compostos do tipo HS, mas não pela ribavirina. Assim, são necessárias investigações adicionais para descobrir os mecanismos moleculares subjacentes à ação anti-EV71 de compostos do tipo HS. Nossos experimentos também corroboram com essa hipótese.

[006] Com o advento da pandemia de COVID-19 que já causou milhões de casos confirmados e óbitos em todo o mundo, autópsias de pacientes com COVID-19 revelaram trombos na microvasculatura, sugerindo coagulação intravascular como uma característica proeminente da falência de órgãos nesses pacientes. Curiosamente, no COVID-19, a complacência pulmonar é preservada, apesar da hipoxemia grave, corroborando a hipótese de que a incompatibilidade da perfusão pode desempenhar um papel significativo no desenvolvimento de insuficiência respiratória '*Heparin therapy improving hypoxia in COVID-19 patients - a case series. preprint doi: <https://doi.org/10.1101/2020.04.15.20067017>*'.

[007] O dímero D elevado é um preditor de gravidade e mortalidade em pacientes com COVID-19 e o uso de heparina (Heparina de Baixo Peso Molecular – Enoxaparina 0,5mg/kg a cada 24h em casos moderados e 0,5mg/kg de 12/12h em casos com piora clínica ou graves) durante a internação hospitalar tem sido associado à diminuição da mortalidade. Este estudo brasileiro foi realizado com uma série de 27 casos consecutivos de pacientes com Covid-19 em São Paulo - Brasil (não é um estudo controlado). Resultados: A relação PaO₂ / FiO₂ aumentou significativamente nas 72 horas após o início da anticoagulação, de 254 (± 90) para 325 (± 80), p = 0,013, e mais da metade dos pacientes receberam alta em casa em um tempo médio de 7,3 (± 4,0) dias. Metade dos pacientes sob ventilação mecânica foi extubada em 10,3 (± 1,5) dias. Os demais pacientes apresentaram melhora progressiva e não houve complicações hemorrágicas ou eventos fatais.

[008] Da mesma forma no artigo '*COVID-19 and Thrombotic or Thromboembolic Disease: Implications for Prevention, Antithrombotic Therapy, and Follow-up*'. JAC 27284 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2020.04.031>. (Paper) é possível vislumbrar que a doença de coronavírus 2019 (COVID-19), uma doença respiratória viral causada pela

grave síndrome respiratória aguda coronavírus 2 (SARS-CoV-2), pode predispor pacientes à trombose, tanto arterial quanto venosa, isso devido a inflamação excessiva, ativação plaquetária, disfunção endotelial e estase. Além disso, pacientes portadores de doença tromboembólica arterial ou venosa podem se contaminar com COVID-19, o que pode requerer manutenção ou implementação de terapia antitrombótica, o que leva a escolha dos melhores anticoagulantes nesta situação. Esta revisão sobre patogênese, epidemiologia, manejo e resultados de pacientes com COVID-19 que desenvolvem trombose venosa ou arterial e com doenças trombóticas preexistentes que desenvolveram COVID-19 ou mesmo aqueles que precisam de prevenção ou tratamento de sua doença trombótica durante a pandemia de COVID-19.

[009] Em suma, no artigo 'Lang J, Yang N, Deng J, et al. Inhibition of SARS pseudovirus cell entry by lactoferrin binding to heparan sulfate proteoglycans. *PLoS One*. 2011;6(8):e23710. doi:10.1371/journal.pone.0023710 foi relatado que a lactoferrina (LF) participa da resposta imune do hospedeiro contra a invasão do Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS-CoV), aumentando a atividade das células NK e estimulando a agregação e adesão de neutrófilos. Investiga ainda o papel do LF na entrada do pseudovírus SARS nas células HEK293E / ACE2-Myc. Os resultados revelam que a LF inibe a infecção por pseudovírus por SARS de maneira dependente da dose. Análises posteriores sugeriram que o LF foi capaz de bloquear a ligação da proteína spike às células hospedeiras a 4 ° C, indicando que o LF exercia sua função inibidora no estágio de ligação viral. No entanto, a LF não interrompeu a interação da proteína spike com a enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2), o receptor funcional da SARS-CoV. Estudos anteriores mostraram que a LF se coloca com os proteoglicanos de heparan sulfato de superfície celular amplamente distribuídos (HSPGs). O tratamento das células com heparinase ou heparina exógena impediu a ligação da proteína spike às células hospedeiras e inibiu a infecção por pseudovírus SARS, demonstrando que os HSPGs fornecem os locais de ligação para invasão de SARS-CoV na fase inicial de inserção.

[010] Diante de levantamentos do histórico de efeitos técnicos encontrados em heparinas de alto peso molecular e estado da técnica das composições para tratamento de COVID-19, não foram encontrados documentos que descrevem as heparinas de alto

peso molecular para tal aplicação, tampouco com os resultados obtidos nos estudos supracitados.

TESTES 'IN VITRO' PARA O ESTABELECIMENTO DA AÇÃO ANTIVIRAL DA HEPARINA DE ALTO PESO MOLECULAR

[011] Técnica 'in vitro' padronizada para o estabelecimento da ação antiviral de potenciais medicamentos contra SARS-CoV-2.

[012] Inicialmente, uma placa de cultura aderente de 96 poços (ver figura 1) é semeada com 5×10^4 células/mL de Vero CCL-81, que consiste de uma linhagem oriunda de células de rim de macaco-verde africano (*Cercopithecus aethiops*), sendo a mesma amplamente utilizada para ensaios 'in vitro' com SARS-CoV-2. As células são mantidas em meio de cultura DMEM aditivado com 2% de soro fetal bovino (SFB) por 24-48h até alcançarem uma confluência de 80-90%.

[013] Neste momento, a placa de cultura está pronta para a infecção viral. Inicialmente, as células hospedeiras são incubadas com o medicamento (neste caso, a heparina de alto peso molecular em várias concentrações) por 1 hora. Em seguida é aplicada na mesma proporção (1:1) solução de vírus com MOI 0,02 por poço utilizando a cepa SARS-CoV-2/SP02/human/2020/BRA (MT350282). A mesma é mantida em incubação (adsorção viral) por 1 hora a 37°C e 5% de CO₂. Após a incubação, o sobrenadante é descartado e a solução teste contendo DMEM suplementado com SFB 2% sem medicamento (controle) e com medicamento (no caso, heparina de alto peso molecular em várias concentrações) é colocado no poço de cultura (100 µL por poço). Ressalta-se que, seguindo as recomendações da OMS, todas as etapas envolvendo a manipulação do SARS-CoV-2 foram realizadas no laboratório de biossegurança nível 3 (NB3+), localizado nas dependências do Instituto de Ciências Biomédicas II da Universidade de São Paulo (ICB-USP).

[014] Teste piloto "in vitro".

[015] A heparina de alto peso molecular apresentou ação antiviral em um protocolo "in vitro" como teste de avaliação de fundamentação para a teoria de que as heparinas, incluindo esta deste estudo, apresentam papel modulador na infecção por SARS-CoV-2. Os resultados preliminares apontaram uma redução da carga viral em torno de 90%

neste modelo.

[016] O estudo utilizou placa de cultura celular com células de linhagem VERO infectadas com COVID-19 cepa brasileira, e tratadas com heparina não fracionada de alto peso molecular (100ug/mL) em comparação com heparina de baixo peso molecular (100ug/mL) por 3 dias. O ensaio foi realizado em duplicata uma única vez. Foi utilizado como controle meio de cultura sem o medicamento.

[017] Ao final do experimento observou-se que não ocorreu mortalidade das células hospedeiras após coloração com azul de tripano. Observa-se grande diferença visual entre os dois tratamentos, podendo-se inferir alguma atividade antiviral. Confirmação por RT-PCR demonstrou diferença de 90 a 100% de carga viral entre o grupo tratado com o medicamento heparina não fracionada de alto peso molecular em comparação com o grupo controle e com o grupo tratado com heparina de baixo peso molecular.

[018] Após 72h da infecção com a carga viral de controle com 10^8 cópias virais/mL, os resultados obtidos foram os seguintes:

- (i) heparina de alto peso molecular 250µg/mL com carga viral de $3,6 \times 10^6$ cópias virais/mL;
- (ii) heparina de alto peso molecular 125µg/mL com carga viral de $2,4 \times 10^8$ cópias virais/mL; e
- (iii) heparina de alto peso molecular 62,5µL/mL com carga viral de $3,2 \times 10^6$ cópias virais/mL.

[019] Foi representada uma redução comparativa com o controle de 3 logs ou 9.9 Ct (cycle threshold).

OBJETIVOS DA INVENÇÃO

[020] Diante do exposto, é objetivo desta invenção apresentar a composição de heparina de alto peso molecular, mais especificamente voltada a seu segundo uso, em especial à ação antiviral contra cepa brasileira do vírus causador da doença COVID-19, associada a efeito antitrombótico e baixa citotoxicidade às células humanas, sendo, assim, uma importante solução médica suplementar para o controle de óbitos durante a pandemia.

DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[021] A complementar a presente descrição de modo a obter uma melhor compreensão das características do presente invento, acompanha a descrição, em anexo, uma imagem fotográfica, onde, de maneira exemplificada, embora não limitativa, se representou:

[022] a figura 1 representa uma imagem fotográfica e em vista superior da placa de cultura aderente.

DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

[023] A presente patente de invenção se refere à "COMPOSIÇÃO DE HEPARINA NÃO FRACIONADA DE ALTO PESO MOLECULAR PARA AÇÃO ANTIVIRAL E RESPECTIVO USO", foi especialmente desenvolvida para atuar no efeito técnico terapêutico contra o COVID-19. O uso da composição de heparina não fracionada de alto peso molecular da presente invenção apresenta diminuição da carga viral de 90 a 100% sem promover citotoxicidade, podendo apontar para um possível alvo terapêutico com dupla função, antiviral e antitrombótica. O mecanismo farmacológico de funcionamento do alcance de heparina de alto peso molecular contra o coronavírus 2019, ora desenvolvido, apresentou ação em proteínas de adesão ou clivagem viral.

[024] Tomando por base após 72h da infecção com a carga viral de controle com 108 cópias virais/mL, os resultados obtidos foram os seguintes:

- Heparina de alto peso molecular 250µg/mL com carga viral de $3,6 \times 10^6$ cópias virais/mL;
- Heparina de alto peso molecular 125µg/mL com carga viral de $2,4 \times 10^6$ cópias virais/mL;
- Heparina de alto peso molecular 62,5µg/mL com carga viral de $3,2 \times 10^6$ cópias virais/mL.

[025] Adicionalmente, informa-se que foram realizados levantamentos do histórico de efeitos técnicos encontrados em heparinas de alto peso molecular e estado da técnica das composições para tratamento de COVID19 e não foram encontrados documentos que descrevem as heparinas de alto peso molecular para tal aplicação, tampouco com os resultados obtidos no desenvolvimento supracitado.

[026] É certo que quando o presente invento for colocado em prática, poderão ser

introduzidas modificações, sem que isso implique afastar-se dos princípios fundamentais que estão claramente substanciados no quadro reivindicatório, ficando assim entendido que a terminologia empregada não teve a finalidade de limitação.

Referências

1. Gillim-Ross L, Taylor J, Schall DR, Ridenour J, Masters PS, Wentworth DE. Discovery of novel human and animal cells infected by the severe acute respiratory syndrome coronavirus by replication-specific multiplex reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol*. 2004;42(7):3196–206.
2. Chu H, Chan JF, Yuen TT, Shuai H, Yuan S, Wang Y, et al. Comparative tropism, replication kinetics, and cell damage profiling of SARS-CoV-2 and SARS-CoV with implications for clinical manifestations, transmissibility, and laboratory studies of COVID-19: an observational study. *The Lancet Microbe* [Internet]. 2020;5247(20). Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S2666-5247\(20\)30004-5](http://dx.doi.org/10.1016/S2666-5247(20)30004-5)
3. Harcourt J, Tamin A, Lu X, Kamili S, Sakthivel SK, Murray J et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 from patient with 2019 novel coronavirus disease, United States. *Emerg Infect Dis*. 2020;26(6).
4. Kaye M, Druce J, Tran T, Kostecki R, Chiba D, Morris J, et al. SARS-associated Coronavirus Replication in Cell Lines. *Emerg Infect Dis*. 2006;12(1):128–33.
5. World Health Organization (WHO). Manual de segurança biológica em laboratório. World Health Organization (WHO) Geneva: WHO, 2004. Disponível em: 2004; acessado em <https://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/BisLabManual3rdwebp ort.pdf?ua=1>. Acesso em: 10/05/2020.

REIVINDICAÇÕES

- 1) **"COMPOSIÇÃO DE HEPARINA NÃO FRACIONADA DE ALTO PESO MOLECULAR PARA AÇÃO ANTIVIRAL"**, *caracterizado* por mecanismo farmacológico do alcance da heparina não fracionada de alto peso molecular compreender um agente modulador na infecção por SARS-CoV-2 tendo ação em proteínas de adesão e inibindo a clivagem viral.
- 2) **"COMPOSIÇÃO DE HEPARINA NÃO FRACIONADA DE ALTO PESO MOLECULAR PARA AÇÃO ANTIVIRAL"**, de acordo com a reivindicação 1, *caracterizado* por ação em proteínas de adesão pela heparina não fracionada de alto peso molecular apresentar diminuição da carga viral na faixa de 90 a 100% em cópias virais/mL causadoras da doença COVID-19.
- 3) **"COMPOSIÇÃO DE HEPARINA NÃO FRACIONADA DE ALTO PESO MOLECULAR PARA AÇÃO ANTIVIRAL"**, de acordo com a reivindicação 1, *caracterizado* por heparina de alto peso molecular de 250µg/mL apresentar carga viral de $3,6 \times 10^6$ cópias virais/mL.
- 4) **"COMPOSIÇÃO DE HEPARINA NÃO FRACIONADA DE ALTO PESO MOLECULAR PARA AÇÃO ANTIVIRAL"**, de acordo com a reivindicação 1, *caracterizado* por heparina de alto peso molecular de 125µg/mL apresentar carga viral de $2,4 \times 10^6$ cópias virais/mL.
- 5) **"COMPOSIÇÃO DE HEPARINA NÃO FRACIONADA DE ALTO PESO MOLECULAR PARA AÇÃO ANTIVIRAL"**, de acordo com a reivindicação 1, *caracterizado* por heparina de alto peso molecular de 62,5µg/mL apresentar carga viral de $3,2 \times 10^6$ cópias virais/mL.
- 6) **"USO DA HEPARINA NÃO FRACIONADA DE ALTO PESO MOLECULAR"**, de acordo com a reivindicações 1 e 2, *caracterizado* por uso da heparina não fracionada de alto peso molecular prever ação antiviral no tratamento da COVID-19 associado ao efeito antitrombótico e baixa citotoxicidade às células humanas.

1/1

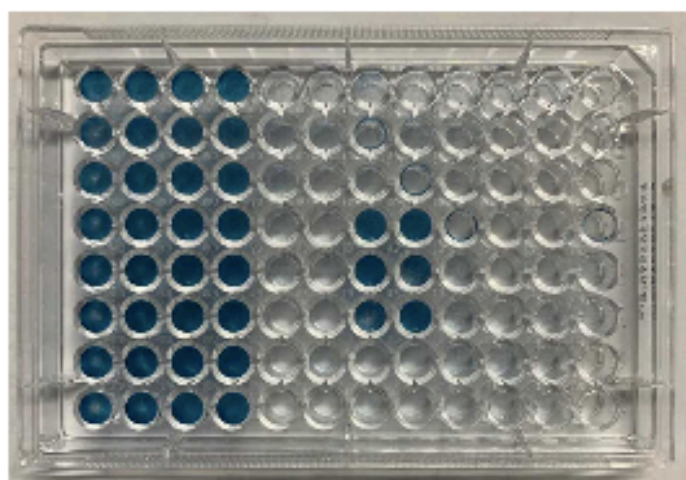


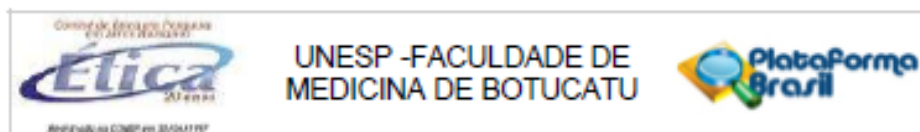
FIG. 1

RESUMO

"COMPOSIÇÃO DE HEPARINA NÃO FRACIONADA DE ALTO PESO MOLECULAR PARA AÇÃO ANTIVIRAL".

Trata-se de composição de heparina não fracionada de alto peso molecular cujo mecanismo farmacológico compreende um agente modulador na infecção por SARS-CoV-2 tendo ação em proteínas de adesão e inibindo a clivagem viral. O uso da composição de heparina não fracionada de alto peso molecular compõe a diminuição da carga viral entre 90 a 100% em cópias virais/mL.

10.2 Anexo 2: Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CAAE 39872920.0.0000.5411).



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: HEPARINA DE ALTO PESO MOLECULAR POR VIA INALATÓRIA PARA O TRATAMENTO DE SARS-COV-2

Pesquisador: Matheus Bertanha

Área Temática:

Versão: 9

CAAE: 39872920.0.0000.5411

Instituição Proponente: Departamento de Cirurgia e Ortopedia

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.979.704

Apresentação do Projeto:

Trata-se de emenda para análise de proposta de adequações ao projeto de pesquisa.

Objetivo da Pesquisa:

Inalterados e avaliados anteriormente.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Inalterados e avaliados anteriormente.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de emenda para análise de Inclusão de Novos Membros ao projeto de pesquisa.

", apresentar as retificações realizadas no projeto de pesquisa "Heparina de alto peso molecular por via inalatória para o tratamento de SARS-COV-2", CAAE: 39872920.0.0000.5411 (Plataforma Brasil) e protocolo SIPE 391/2020, para aprovação da emenda junto ao Comitê de ética em pesquisa. Tais modificações foram necessárias para adequação na equipe de pesquisadores, incluímos o Pesquisador Vinícius Tadeu Ramos da Silva Grillo, portador do CPF 528.630.772-87, que vem desenvolvendo papel fundamental na pesquisa juntamente com o resto da equipe."

Endereço: Chácara Buñgnoli, s/n

Bairro: Rubião Junior

UF: SP

Telefone: (14)3880-1600

CEP: 18.618-070

Município: BOTUCATU

E-mail: cep@fmb.unesp.br

 Comitê de Ética em Pesquisa FMB UNESP	UNESP - FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU	 Plataforma Brasil
---	--	--

Continuação do Parecer: 4.879.704

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresentou os seguintes documentos:

OFICIO_CEP_DOCUMENTOS_EMENDA4.pdf

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O Comitê de ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu manifesta-se pela aprovação da presente Emenda.

Considerações Finais a critério do CEP:

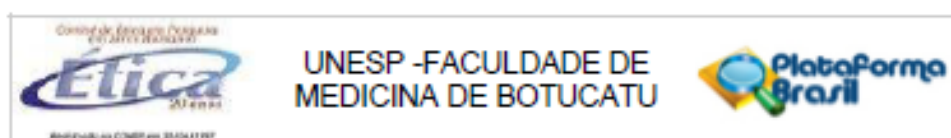
O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu, em reunião dia 16/09/2021, manifesta-se pela aprovação da presente Emenda.

O presente projeto, seguiu nesta data para análise da CONEP e só tem o seu início autorizado após a aprovação pela mesma.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB INFORMACOES_BASICAS_1819008_E4.pdf	10/09/2021 15:13:45		Aceito
Outros	OFICIO_CEP_DOCUMENTOS_EMENDA4.pdf	10/09/2021 15:11:52	Matheus Bertanha	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	HEPARINA_PROJETO_HUMANO_CEP_REDLINE_EMENDA3_24_06_2021.pdf	25/06/2021 12:16:42	Matheus Bertanha	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	HEPARINA_PROJETO_HUMANO_CEP_EMENDA3_24_06_2021.pdf	25/06/2021 12:16:33	Matheus Bertanha	Aceito
Outros	OFICIO_CEP_DOCUMENTOS_EMENDA3_24_06_2021.pdf	25/06/2021 12:16:19	Matheus Bertanha	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	HEPARINA_PROJETO_HUMANO_CEP_24_06_2021.pdf	25/06/2021 12:15:13	Matheus Bertanha	Aceito
Outros	OFICIO_CEP_DOCUMENTOS_Emenda2.pdf	12/04/2021 18:26:25	Lenize da Silva Rodrigues	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Emenda_2_HEPARINA_PROJETO_HUMANO_CEP_red_line.pdf	12/04/2021 18:25:54	Lenize da Silva Rodrigues	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Emenda_2_HEPARINA_PROJETO_HUMANO_CEP.pdf	12/04/2021 18:25:44	Lenize da Silva Rodrigues	Aceito

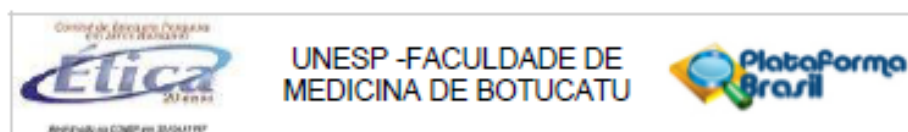
Endereço: Chácara Buñoli, s/n
 Bairro: Rubião Junior CEP: 18.618-070
 UF: SP Município: BOTUCATU
 Telefone: (14)3880-1809 E-mail: cep@fmb.unesp.br



Continuação do Parecer: 4.979.704

Projeto Detalhado / Brochura Investigador	HEPARINA_PROJETO_HUMANO_CEP_red_line_pendencia_emenda.pdf	16/02/2021 12:03:01	Lenize da Silva Rodrigues	Acelto
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	HEPARINA_PROJETO_HUMANO_CEP_alteracao_pendencia.pdf	16/02/2021 12:01:22	Lenize da Silva Rodrigues	Acelto
Outros	oficio_pendencia_emenda_16_02_2021.pdf	16/02/2021 12:00:38	Lenize da Silva Rodrigues	Acelto
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	emenda_HEPARINA_PROJETO_HUMANO_red_line.pdf	05/02/2021 11:03:21	Lenize da Silva Rodrigues	Acelto
Outros	OFICIO_emenda_.pdf	05/02/2021 10:51:11	Lenize da Silva Rodrigues	Acelto
Outros	oficio_evento_adverso_grave.pdf	26/11/2020 19:47:14	Matheus Bertanha	Acelto
Outros	oficio_reposta_2.pdf	26/11/2020 19:46:15	Matheus Bertanha	Acelto
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	HEPARINA_PROJETO_HUMANO_Final.pdf	26/11/2020 19:45:53	Matheus Bertanha	Acelto
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Covid_pronto.pdf	17/11/2020 15:44:40	Matheus Bertanha	Acelto
Outros	biorepositorio_HAPM.docx	05/11/2020 17:11:18	Matheus Bertanha	Acelto
Outros	CienciaEAnuenciadosGestoresDeArea2020MIP.pdf	05/11/2020 17:09:39	Matheus Bertanha	Acelto
Outros	AnaliseDeViabilidadeDoProjetoDePesquisaSlpe3912020.pdf	05/11/2020 15:59:03	Matheus Bertanha	Acelto
Outros	DeclaracaoDoHcDeCienciaDoMertitoCientifico.pdf	05/11/2020 15:58:34	Matheus Bertanha	Acelto
Outros	CienciaEAnuenciadosGestoresDeAreaAbloMol.pdf	05/11/2020 15:53:27	Matheus Bertanha	Acelto
Declaração de Instituição e Infraestrutura	TermoDeAnuenciainstitucional.pdf	05/11/2020 15:52:40	Matheus Bertanha	Acelto
Folha de Rosto	FolhaDeRostoAssinada.pdf	05/11/2020 15:43:27	Matheus Bertanha	Acelto
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Bloco	biorepositorio_HAPM.pdf	19/10/2020 13:55:10	Matheus Bertanha	Acelto
Orçamento	Orcamento_Final.pdf	19/10/2020 12:01:49	Matheus Bertanha	Acelto
Cronograma	Cronograma_Final.pdf	19/10/2020	Matheus Bertanha	Acelto

Endereço: Chácara Butgnoli, s/n
 Bairro: Rubião Junior CEP: 18.618-970
 UF: SP Município: BOTUCATU
 Telefone: (14)3880-1809 E-mail: cep@fmb.unesp.br



Continuação do Parecer: 4.979.704

Cronograma	Cronograma_Final.pdf	11:50:27	Matheus Bertanha	Acelto
------------	----------------------	----------	------------------	--------

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Sim

BOTUCATU, 16 de Setembro de 2021

Assinado por:
Trajano Sardenberg
(Coordenador(a))

Endereço: Chácara Buignoli, s/n
Bairro: Rubião Junior CEP: 18.618-070
UF: SP Município: BOTUCATU
Telefone: (14)3880-1600 E-mail: cep@fmb.unesp.br

10.3 Anexo 3: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

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

CONVIDO, o Senhor (a) para participar do Projeto de Pesquisa intitulado “HEPARINA DE ALTO PESO MOLECULAR POR VIA INALATÓRIA PARA O TRATAMENTO DE SARS-COV-2”, que será desenvolvido por mim Professor Dr. Matheus Bertanha, (Médico Cirurgião Vascular) e Professor Dr. Carlos Magno Castelo Branco Fortaleza, ambos da Faculdade de Medicina de Botucatu –UNESP.

Estou estudando adoença SARS-COV-2, também conhecida como coronavírus, com o objetivo de encontrar um novo tratamento efetivo para a mesma. Para que eu possa ter um resultado nesse momento preciso realizar exames laboratoriais com a coleta de amostras de 10ml do seu sangue que será realizado os seguintes exames (Hemograma Completo, Dímero-D, Coagulograma, Uréia, Creatinina, Proteínas totais e frações, Glicemia, Proteína C Reativa), além de realizarmos teste rápido para COVID-19 (IgG e IgM) através da coleta de uma gota de sangue da ponta do dedo, Teste de RT-qPCR necessitando de coleta de *swab* nasal e tomografia computadorizada (sem contraste). O risco com a coleta de sangue e dos demais exames serão mínimos, podendo aparecer uma manchinha roxa no local da punção, que desaparecerá bem rapidamente.

Solicito seu consentimento para consultar seu prontuário médico para coletar outras informações lá contidas como (Exames laboratoriais e imagem) referentes a consultas feitas anteriormente pelo (a) Senhor (a). Além disso o(a) Senhor (a) responderá um questionário que levará uns 15 minutos de duração.

Os pacientes serão divididos em dois grupos, um dos grupos receberá o tratamento proposto por nosso grupo de pesquisa, com a medicação “Heparina de Alto Peso Molecular” por via inalatória, enquanto que o outro grupo receberá inalação de soro fisiológico, apenas, também conhecido como “grupo controle”, esse soro fisiológico, não apresentará qualquer efeito negativo ao paciente.

A doença SARS-COV-2, “coronavírus”, pode evoluir para formas graves, mesmo em vigência dos melhores tratamentos existentes, incluindo os tratamentos propostos aos participantes do presente estudo. Qualquer sintoma de agravamento da doença será devidamente avaliado pelos profissionais de saúde do Hospital das Clínicas de Botucatu, onde receberá todo o suporte necessário de acordo com as protocolos de tratamento vigentes para as formas graves da infecção.

Seu benefício em participar será a possibilidade de receber um novo tratamento promissor para SARS-COV-2, por via inalatória. Sendo que neste momento, por tratar-se de uma doença recente, ainda não há um tratamento eficaz ou métodos alternativos bem estabelecidos e este tratamento poderá ajudar o senhor

(a) e outras pessoas no futuro. Esperamos, com a pesquisa, estabelecer a segurança e efetividade deste novo tratamento como benefício para sociedade.

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

Será garantido o direito à assistência integral e gratuita a você em caso de quaisquer danos decorrentes da participação nessa pesquisa e pelo tempo que for necessário, inclusive após o término do estudo, com acompanhamento via ambulatório de infectologia até a cura e remissão total dos sintomas. Você tem direito de buscar indenização diante de eventuais danos decorrentes desta pesquisa.

Este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido será elaborado em 2 vias de igual teor, o qual 01 via será entregue ao Senhor (a) devidamente rubricada, sendo fundamental que a guarde em seus arquivos, com a garantia de que uma nova cópia será enviada pelos ao participante, caso solicitado, e a outra via será arquivada e mantida pelos pesquisadores por um período de 5 anos após o término da pesquisa. Todas as informações pessoais serão sigilosas e a privacidade do participante será garantida.

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

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

Botucatu, ____/____/____

Pesquisador: Matheus Bertanha

Participante da Pesquisa

Nome: Matheus Bertanha

Endereço: Av. Prof. Mário Rubens Guimarães Montenegro, s/n - UNESP - Campus de Botucatu - Botucatu/SP - CEP 18618687

Telefone: 14 3880-1444

E-mail: matheus.bertanha@unesp.br

Nome: Carlos Magno Castelo Branco Fortaleza

Endereço: Av. Prof. Mário Rubens Guimarães Montenegro, s/n - UNESP - Campus de Botucatu - Botucatu/SP - CEP 18618687

Telefone: 14 3880-1444

E-mail: carlos.fortaleza@unesp.br

10.4 Anexo 4: Formulário de antecedentes epidemiológicos e pessoais com base na epidemiologia brasileira.

Epidemiological and personal antecedents form				
Form Number:	Date:			
Sex	F ☐	M ☐		
Age (in years)				
Color (self-declared) (Terminology used by the Brazilian Institute of Geography and Statistics)	White ☐	Black ☐	Indigeno us ☐	Brow n ☐ Asian ☐
Residency	Urban ☐	Rural ☐		
Height (m)				
Weight (kg)				
Abdominal circumference (cm)				
Diabetes	Yes ☐	No ☐		
Hypertension	Yes ☐	No ☐		
Heart disease	Yes ☐	No ☐		
Dyslipidemia	Yes ☐	No ☐		
Obesity	Yes ☐	No ☐		
Sedentary lifestyle	Yes ☐	No ☐		
Smoking	Yes ☐	No ☐		

If smoker, smoking load (pack-year)			
Alcoholism	Yes ☐	No ☐	
Previous cardiovascular ischemic events	Yes ☐	No ☐	
Previous cerebrovascular ischemic events	Yes ☐	No ☐	
Previous venous thrombosis or pulmonary thromboembolism	Yes ☐	No ☐	
Neoplasia under treatment (<5 years)	Yes ☐	No ☐	
Acquired immunodeficiency syndrome	Yes ☐	No ☐	
Autoimmune disease	Yes ☐	No ☐	
Other diseases (report)			

10.5 Anexo 5: Formulário de avaliação clínica e exame físico com base nos sintomas mais prevalentes de SARS-CoV-2.

Clinical assessment and physical examination form			
Form Number:	Date:		
Diagnosis day			
Time elapsed since diagnosis (days)			
Time elapsed since start of treatment (days)			
Time elapsed since start of symptoms (days)			
Hospitalization unit	Nursery ☐ ICU ☐		
Patient status	In Treatment ☐	Hospital Discharge ☐	Death ☐
Correct use of inhalation treatment	Yes ☐	No ☐	
Symptomatic medications use	Yes ☐	No ☐	
Supplementary oxygen use	Yes ☐	No ☐	
Non-invasive ventilation use	Yes ☐	No ☐	
Mechanical ventilation use	Yes ☐	No ☐	
Bleeding	Yes ☐	No ☐	

Type of bleeding (epistaxis, hematuria, upper / lower digestive hemorrhage, others)			
Bleeding start date (blank if not present)			
Bleeding end date (blank if still present)			
Fever	Yes ☐	No ☐	
Fever start date (blank if not present)			
Fever end date (blank if still present)			
Dry cough	Yes ☐	No ☐	
Dry cough start date (blank if not present)			
Dry cough end date (blank if still present)			
Tiredness	Yes ☐	No ☐	
Tiredness start date (blank if not present)			
Tiredness end date (blank if still present)			
Osteomuscular aching and pain	Yes ☐	No ☐	
Osteomuscular aching and pain start date (blank if not present)			
Osteomuscular aching and pain end date (blank if still present)			
Sore throat	Yes ☐	No ☐	
Sore throat start date (blank if not present)			

Sore throat end date (blank if still present)			
Diarrhea	Yes ○	No ○	
Diarrhea start date (blank if not present)			
Diarrhea end date (blank if still present)			
Conjunctivitis	Yes ○	No ○	
Conjunctivitis start date (blank if not present)			
Conjunctivitis end date (blank if still present)			
Headache	Yes ○	No ○	
Headache start date (blank if not present)			
Headache end date (blank if still present)			
Loss of smell	Yes ○	No ○	
Loss of smell start date (blank if not present)			
Loss of smell end date (blank if still present)			
Loss of taste	Yes ○	No ○	
Loss of taste start date (blank if not present)			
Loss of taste end date (blank if still present)			
Cutaneous rash	Yes ○	No ○	
Cutaneous rash start date (blank if not present)			

Cutaneous rash end date (blank if still present)			
Cutaneous pallor	Yes ○	No ○	
Cutaneous pallor start date (blank if not present)			
Cutaneous pallor end date (blank if still present)			
Cutaneous cyanosis	Yes ○	No ○	
Cutaneous cyanosis start date (blank if not present)			
Cutaneous cyanosis end date (blank if still present)			
Dyspnea	Yes ○	No ○	
Dyspnea start date (blank if not present)			
Dyspnea end date (blank if still present)			
Chest pain	Yes ○	No ○	
Chest pain start date (blank if not present)			
Chest pain end date (blank if still present)			
Aphasia	Yes ○	No ○	
Aphasia start date (blank if not present)			
Aphasia end date (blank if still present)			
Hyporexia	Yes ○	No ○	
Hyporexia start date (blank if not present)			

Hyporexia end date (blank if still present)					
Heart rate (BPM)					
Brachial systolic pressure (mmHg)					
Brachial diastolic pressure (mmHg)					
Peripheral oxygen saturation (%)					
Axillary temperature (Celsius)					
Paleness	Normal ○	1+/4 + ○	2+/4 + ○	3+/4 + ○	4+/4+ ○
Cyanosis	Normal ○	1+/4 + ○	2+/4 + ○	3+/4 + ○	4+/4+ ○
Oral cavity	Normal ○	Altered ○			
Description					
Pulmonary auscultation	Normal ○	Altered ○			
Description					
Cardiac auscultation	Normal ○	Altered ○			
Description					
Abdominal examination	Normal ○	Altered ○			
Description					
Limbs (pulses, edema, skin conditions)	Normal ○	Altered ○			
Description					

10.6 Anexo 6: Formulário de achados laboratoriais e tomográficos com base na rotina laboratorial do paciente internado com SARS-CoV-2.

Laboratory results and tomographic findings form			
Form Number:	Date:		
RT-qPCR	Positive ☐	Negative ☐	
RT-qPCR quantitative viral load			
Blood count	Normal ☐	Altered ☐	
Hemoglobin (g / dL)			
Hematocrit (%)			
Mean corpuscular volume (fL)			
Red cell distribution width (%)			
Platelets count (10^3 / μL)			
White cell count (10^3 / μL)			
Neutrophils (%)			
Lymphocytes (%)			
Bands (%)			
Arterial gas	Normal ☐	Altered ☐	
pH			
pCO₂ (mmHg)			
PaO₂ / FiO₂			
HCO₃ (mEq / L)			
SO₂ (%)			
Base Excess			
D-Dimer (μg / mL)			

aPTT	Normal ☐	Altered ☐	
Prothrombin time (PT)			
International normalized ratio (INR)			
Activated partial thromboplastin time (aPTT)			
Normalized aPTT Ratio			
Renal function	Normal ☐	Altered ☐	
Urea (mg / dL)			
Creatinine (mg / dL)			
Fasted glucose (mg / dL)			
C reactive protein (CRP) (mg / L)			
Amylase (U / L)			
Thoracic tomography description			

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.

Adverse events form					
Form Number:		Date:			
Thrombotic thrombocytopenic purpura	Grade 1 ☐	Grade 2 ☐	Grade 3 ☐	Grade 4 ☐	Grade 5 ☐
Time between event and last dose administered (hours)					
Disseminated intravascular coagulation	Grade 1 ☐	Grade 2 ☐	Grade 3 ☐	Grade 4 ☐	Grade 5 ☐
Time between event and last dose administered (hours)					
Hemorrhage	Grade 1 ☐	Grade 2 ☐	Grade 3 ☐	Grade 4 ☐	Grade 5 ☐
Site of hemorrhage					
Time between event and last dose administered (hours)					
Anaphylaxis	Grade 1 ☐	Grade 2 ☐	Grade 3 ☐	Grade 4 ☐	Grade 5 ☐
Time between event and last dose administered (hours)					
Hypophysitis	Grade 1 ☐	Grade 2 ☐	Grade 3 ☐	Grade 4 ☐	Grade 5 ☐
Time between event and last dose administered (hours)					
Ischemia	Grade 1 ☐	Grade 2 ☐	Grade 3 ☐	Grade 4 ☐	Grade 5 ☐
Site of Ischemia					

Time between event and last dose administered (hours)					
Other adverse events (description)					
Grading	Grade 1 ○	Grade 2 ○	Grade 3 ○	Grade 4 ○	Grade 5 ○
Time between event and last dose administered (hours)					
Other adverse events (description)					
Grading	Grade 1 ○	Grade 2 ○	Grade 3 ○	Grade 4 ○	Grade 5 ○
Time between event and last dose administered (hours)					
Other adverse events (description)					
Grading	Grade 1 ○	Grade 2 ○	Grade 3 ○	Grade 4 ○	Grade 5 ○
Time between event and last dose administered (hours)					

10.8 Anexo 8: Financiamento FAPESP/PPSUS, número do processo 2020/12165-8



Pesquisa para
Inovação

Difusão do
Conhecimento

Acordos e
Convênios

Sobre a
BV FAPESP



1 resultado(s)
1

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

Processo: 20/12165-8

Linha de fomento: Auxílio à Pesquisa - Pesquisa em Políticas Públicas

Vigência: 01 de março de 2021 - 28 de fevereiro de 2023

Área do conhecimento: Ciências da Saúde - Medicina

Convênio/Acordo: CNPq - PPSUS

Pesquisador responsável: Carlos Magno Castelo Branco Fortaleza

Beneficiário: Carlos Magno Castelo Branco Fortaleza

Instituição-sede: Faculdade de Medicina (FMB), Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Botucatu, Botucatu, SP, Brasil

Pesq. associados: Gustavo Constantino de Campos; Matheus Bertanha; Rejane Maria Tommasini Grotto

Assunto(s): Doenças negligenciadas Tratamento de doenças Antivirais COVID-19 Heparina Ensaio clínico

Resumo

Coronavírus 19 (COVID-19) é uma doença respiratória de causa viral que foi identificada em dezembro de 2019 após os primeiros casos na China, espalhando-se rapidamente até atingir o status de pandemia, ocasionando o colapso de inúmeros sistemas de saúde e forte impacto econômico-social. O tratamento até este momento não foi estabelecido e existem vários ensaios clínicos testando medicamentos conhecidos e que apresentaram atividade antiviral in vitro, decorrente da urgência que a situação global nos impõe. Medicamentos com ação específica podem levar anos até serem descobertos, enquanto uma vacina também demanda muito tempo. Recentemente foi demonstrado que o agravamento da infecção pelo Coronavírus pode estar relacionado à formação de micro coágulos nos vasos sanguíneos e anticoagulantes têm sido utilizados como adjuvantes no tratamento. Justifica-se este estudo mediante a realização de um estudo piloto que evidenciou uma ação antiviral in vitro (anti-COVID-19) de uma nova heparina de alto peso. Será realizado um ensaio clínico de fase I/II. Ao todo, 40 participantes serão incluídos em dois braços. Os participantes alocados no Grupo 1 (controle). Inalação com soro fisiológico 0,9% aplicado de 4-4 horas, por 7 dias. Participantes alocados no Grupo 2 (intervenção) receberão Heparina de alto peso molecular inalatória (250ug/mL de SF 0,9%), em posologia de 4/4 horas, por 7 dias. Os desfechos de interesse serão segurança (ausência de eventos adversos moderados ou graves) e eficácia (medida em score de 7 pontos, sendo 1 ausência de limitações e 7, morte). Espera-se o desenvolvimento de uma nova opção terapêutica para COVID-19, com possibilidade de utilização em outras doenças graves por coronavírus, para ser posteriormente testada em estudos de fase III. (AU)

1 resultado(s)
1

[Exportar 1 registro\(s\) selecionado\(s\)](#)
[Marcar todos desta página](#) | [Limpar seleção](#)

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.



Nebulized enriched heparin to treat no critical patients with Sars-Cov-2 Triple-blind clinical trial

Matheus Bertanha, PhD^{a,b,*}, Lenize da Silva Rodrigues, MSc^a, Pedro Luciano Mellucci Filho, MD^a, Andrei Moroz, PhD^c, Maria Inês de Moura Campos Pardini, PhD^{b,d}, Marcione Lima Sobreira, PhD^a, Edison Luiz Durigon, PhD^{a,f}, Rafael Rahal Guaragna Machado, MSc^a, Rejane Maria Tommasini Grotto, PhD^{b,g}, Marcelo Andrade de Lima, PhD^h, Helena Bonciani Nader, PhDⁱ, Mari Leite de Moraes, PhD^j, Alexandre Nalme Barbosa, PhD^k, Natália Bronzatto Meddago, PhD^l, Fábio Fibreça Cardoso, PhD^m, Angelo José Magro, PhDⁿ, Cristiane Rodrigues Guzzo Carvalho, PhD^o, Leonardo Nazário de Moraes, PhD^{p,q}, Rita de Cássia Alvarado, MSc^r, Helga Caputo Nunes, PhD^s, Gustavo Constantino de Campos, PhD^t, Vinicius Tadeu Ramos da Silva Grillo, MD^u, Nathalia Dias Sertorio, MD^v, Carlos Magno Castelo Branco Fortaleza, PhD^k

Abstract

Background: Coronavirus disease 2019 (COVID-19) is a viral respiratory disease that spreads rapidly, reaching pandemic status, causing the collapse of numerous health systems, and a strong economic and social impact. The treatment so far has not been well established and there are several clinical trials testing known drugs that have antiviral activity, due to the urgency that the global situation imposes. Drugs with specific mechanisms of action can take years to be discovered, while vaccines may also take a long time to be widely distributed while new virus variants emerge. Thus, drug repositioning has been shown to be a good strategy for

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP. Grant number 2020/12165-8.

Dr Carlos Magno Castelo Branco Fortaleza and Dr Matheus Bertanha are responsible for the study design and have ultimate authority over the activities performed during the trial. The São Paulo State Research Support Foundation (FAPESP) is a state-funded agency that encourages research and development in Brazil and has no accountability over the trial's activities.

BHAnCad is registered on Brazilian and international platforms under the following registration IDs: World Health Organization (WHO) International Clinical Trials Registry Platform (ICTRP) Universal Trial Number (UTN): U1111-1264-8258, submitted under the Brazilian Clinical Trials Registry (ReBEC).

National Institute of Health (NIH) United States National Library of Medicine ClinicalTrials.gov platform ID: NCT04743011.

All items from the World Health Organization Trial Registration Data Set are available at the Brazilian Clinical Trials Registry (ReBEC).

Trial Sponsor is Dr Carlos Magno Castelo Branco Fortaleza, Department of Infectious Diseases, São Paulo State University - UNESP, Clinical Hospital, Professor Montenegro Avenue, Botucatu SP 18618-687, Brazil. Email: carlos.fortaleza@unesp.br

Research data available at the Department of Surgery and Orthopedics of São Paulo State University - UNESP.

The authors declare that there is no conflict of interest.

Supplemental Digital Content is available for this article.

The datasets generated during and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

^aDepartment of Surgery and Orthopedics, São Paulo State University - UNESP, Botucatu Medical School, Botucatu, SP, Brazil; ^bApplied Biotechnology Laboratory, Research Nucleus of Clinical Hospital, São Paulo State University - UNESP, Botucatu Medical School, Botucatu, SP, Brazil; ^cDepartment of Bioprocess and Biotechnology, São Paulo State University - UNESP, School of Pharmaceutical Sciences, Araraquara, SP, Brazil; ^dInternal Medicine Division, São Paulo State University - UNESP, Botucatu Medical School, Botucatu, SP, Brazil; ^eDepartment of Microbiology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo - USP, São Paulo, SP, Brazil; ^fScientific Platform Pastour, University of São Paulo - USP, São Paulo, SP, Brazil; ^gBioprocessing and Biotechnology Department, São Paulo State University - UNESP, School of Agriculture, Botucatu, SP, Brazil; ^hMolecular & Structural Biosciences, School of Life Sciences, Keele University, Newcastle-Under-Lyme, Staffordshire, UK; ⁱDepartment of Biochemistry, Federal University of São Paulo - UNIFESP, São Paulo, SP, Brazil; ^jInstitute of Science and Technology, Federal University of São Paulo - UNIFESP, São José dos Campos, SP, Brazil; ^kDepartment of Infectious Diseases, São Paulo State University - UNESP, Botucatu Medical School, Botucatu, SP, Brazil; ^lClinical Research Unit, São Paulo State University - UNESP, Botucatu Medical School, Botucatu, SP, Brazil; ^mBiosciences Institute, São Paulo State University - UNESP, Botucatu, SP, Brazil; ⁿQuality control laboratory, Galvita Scientific Research, Valinhos, SP, Brazil; ^oDepartment of Orthopedics and Traumatology, University of Campinas - UNICAMP, School of Medical Sciences, Campinas, SP, Brazil.

* Correspondence: Matheus Bertanha, Department of Surgery and Orthopedics, São Paulo State University - UNESP, Clinical Hospital, Professor Montenegro Avenue, Botucatu SP 18618-687, Brazil (e-mail: matheus.bertanha@unesp.br).

Copyright © 2021 the Author(s). Published by Wolters Kluwer Health, Inc.

This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License 4.0 (CCBY), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

How to cite this article: Bertanha M, Rodrigues LS, Mellucci Filho PL, Moroz A, Pardini MI, Sobreira ML, Durigon EL, Machado RR, Grotto RM, Lima MA, Nader HB, Moraes LM, Barbosa AN, Meddago NB, Cardoso FF, Magro AJ, Carvalho CR, Moraes LN, Alvarado RC, Nunes HC, Campos GC, Grillo VT, Sertorio ND, Fortaleza CM. Nebulized enriched heparin to treat no critical patients with Sars-Cov-2: triple-blind clinical trial. *Medicine* 2021;100(51):e28288.

Received: 24 November 2021 / Accepted: 29 November 2021

<https://dx.doi.org/10.1097/MD.00000000000028288>

defining new therapeutic approaches. Studies of the effect of enriched heparin in the replication of severe acute respiratory syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) in vitro assays justify the advance for clinical tests.

Methods and analysis: A phase I/II triple-blind parallel clinical trial will be conducted. Fifty participants with radiological diagnosis of grade IIA pneumonia will be selected, which will be allocated in 2 arms. Participants allocated in Group 1 (placebo) will receive nebulized 0.9% saline. Participants allocated in Group 2 (intervention) will receive nebulized enriched heparin (2.5 mg/mL 0.9% saline). Both groups will receive the respective solutions on a 4/4 hour basis, for 7 days. The main outcomes of interest will be safety (absence of serious adverse events) and efficacy (measured by the viral load).

Protocols will be filled on a daily basis, ranging from day 0 (diagnosis) until day 8.

Abbreviations: µg/mL = Micrograms per Milliliter, ACE2 = Angiotensin-converting Enzyme 2, aPTT = Activated Partial Thromboplastin Time, CAEE = Ethics Presentation Appreciation Certificate, Cells/mm³ = Cells per Cubic Millimeter, COVID-19 = Corona Virus Disease 2019, CRP = C Reactive Protein, CTC-AE = Common Terminology Criteria for Adverse Events, Da = Dalton (unit), DNA = Deoxyribonucleic Acid, DVT = Deep Vein Thrombosis, FIO₂ = Fraction of Inspired Oxygen, g/L = Grams per Liter, GCP = Good Clinical Practice, HIV = Human Immunodeficiency Virus, HMWH = High Molecular Weight Heparin, HS = Heparin Sulfate, ICH = International Council for Harmonization, ICTRP = International Clinical Trials Registry Platform, ICU = Intensive Care Unit, ID = Identification, kDa = Kilo Dalton (unit), L/min = Liters per Minute, mg/mL = Milligrams per Milliliter, NIH = National Institute of Health, NIV = Non-Invasive Ventilation O₂, Oxygen paO₂ = Partial Pressure of Oxygen, RBD = Receptor Binding Domain, ReBEC = Brazilian Clinical Trials Registry, RT-PCR = Real Time Polymerase Chain Reaction, S1 = Spike Protein, SARS-CoV-2 = Severe Acute Respiratory Syndrome Corona Virus 2, U/L = Unit per Liter, UNESP = São Paulo State University, UTN = Universal Trial Number, WHO = World Health Organization.

Keywords: antiviral agents, clinical protocol, COVID-19, heparin, inhalation, SARS-CoV-2

1. Introduction

The first cases of coronavirus in humans were initially identified in 1937 and their particular crown-like morphology was demonstrated in 1965.^[1] A new coronavirus, named as severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), was discovered in December 2019 at Wuhan province, China, is the causative agent of the coronavirus disease 19 (COVID-19).^[2] The disease spreads rapidly worldwide, reaching a pandemic status, causing a significant amount of occurrences related to severe respiratory failure, which can quickly progress to the need for mechanical ventilation assistance.^[3,4] The severity of the cases and the need for highly complex medical and hospital resources, associated with a large number of cases due to the high infectivity of the virus, has led numerous health systems to their maximum support capacity. This caused the collapse of health services and strong socioeconomic impact worldwide related to health policies and social isolation measures imposed to decrease the accelerated progression of the disease.

1.1. Rationale

Heparin is naturally polydisperse and heterogeneous acidic polysaccharide member of the glycosaminoglycans family.^[5] It has been used as an anticoagulant for over 80 years, with well-established safety, stability, bioavailability, and pharmacokinetics. Recent studies have shown the impact of pharmacological thromboprophylaxis and systemic anticoagulation as effective in protecting thrombotic events in critically and non-critically COVID-19 patients.^[6-8] In addition to its anticoagulant nature, it also has other clinical applications that are not completely explored, including antiviral activity against flavivirus,^[9,10] herpes,^[11] influenza^[12] and HIV,^[13,14] and, more recently, evidenced antiviral action against SARS-CoV.^[15]

The interactions that occur between viral surface proteins and host cell receptors are the basis for viral infectivity and transmissibility.^[16] SARS-CoV-2 expresses the surface glycoprotein S1 (spike protein), which contains a receptor binding domain (RBD) that interacts with the angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2), enabling the onset of infection.^[17] Previous studies

demonstrated that heparin and its analogues are able to bind to the SARS-CoV-2 spike protein and block SARS-CoV-2 infection using therapeutic relevant concentrations. Such inhibition is likely to be caused by overlapping heparin/heparan sulfate (HS) binding sites on the subunit S1 of the spike protein, where the RBD is located, which restrict S1 binding to the ACE2 receptor.^[18]

Pharmaceutical unfractionated heparin formulations contain polysaccharide chains of molecular weight ranging from ~5000 to ~30,000 Da.^[19] We have developed a method to enrich commercially available unfractionated heparin by simple filtration, where heparin formulations are filtered and cleared by centrifugation (Amicon Ultra-15 Centrifugal filters 10 kDa, Merck Millipore, Burlington, Massachusetts, United States of America) to obtain an enriched heparin preparation, produced in a clean area and sterilized by filtration with a 0.22 µm filter. The enriched heparin shows an antiviral activity in vitro (data not shown) (standardized VERO cell-based assays with a clinical isolate SARS-CoV-2/SP02/human/2020/BRA (GenBank access no. MT126808.1)). Upon heparin treatment, there was a significant decrease in viral load (≥75%) with no observed cytotoxicity for the tested doses (62.5–250 µg/mL). On the basis of the findings of this in vitro evaluation, we conceived the hypothesis that this enriched heparin preparation could be effective to inhibit SARS-CoV-2 viral replication in infected patients, superior to the inhibition by conventional unfractionated heparin at low doses.

1.2. Inhaled heparin

The mechanism of nebulized heparin has been tested in several clinical studies in the last 2 decades, mainly for the treatment of acute airway inflammation caused by smoke inhalation and severe acute respiratory diseases.^[20] Due to its systemic anticoagulant nature, the administration of heparin by inhalation presented an initial concern regarding the risk of bleeding during treatment. However, it is known that the systemic absorption of heparin by this route is minimal.^[21]

In the study carried out by Bendstrup et al.,^[21] the inhibitory effects over systemic coagulation by nebulized unfractionated heparin at doses up to 64 mg were evaluated. This study showed that there is a dose-dependent effect on factor Xa inactivation

with minimal changes in the activated partial thromboplastin time (aPTT) and indicated the safety of unfractionated heparin nebulization for clinical or research purposes, without increasing the risk of bleeding.^[22] Phelps et al.^[23] recently carried out a systematic review about the use of unfractionated heparin inhalation for the treatment of heat injuries in the respiratory system of burn patients and concluded that nebulized heparin did not demonstrate an increase in the risk of bleeding rates and decreased the duration of mechanical ventilation.

For COVID-19, the heparin anti-viral effect is expected to be related to the fact that heparin blocks viral interaction with host cell receptors thereby inhibiting viral interaction with the cell and, consequently, the viral infection.^[24,25] Furthermore, there are other important mechanisms that are relevant for the potential effects of inhaled heparin in COVID-19, including effects on inflammation, on coagulation, on reduction of DNA NETS, and on mucus.^[26] To this moment, some studies indicate that the treatment with systemic heparin reduces hospital mortality in patients with COVID-19^[27] and strongly support the clinical investigation of heparin as a potential treatment for patients with COVID-19.^[28,29] Thus, these findings justify further investigation to deepen the knowledge about the clinical effects of different heparin preparations.

1.3. General objectives

The main objective of this study is to evaluate the safety and efficacy of the use of nebulized enriched heparin administered in patients with SARS-CoV-2.

1.4. Specific objectives

The specific objectives of this study are as follows:

1. To assess the anticoagulation profile of treated patients;
2. To assess the viral load of the SARS-CoV-2 virus of treated patients;
3. To assess the inflammatory profile of the treated patients;
4. To assess the infectious profile of the treated patients;
5. To evaluate the respiratory evolution of treated patients;
6. To assess the clinical evolution of treated patients, including the need for an intensive care unit (ICU).

1.5. EnHanCed study design

The present protocol refers to a phase III, prospective, randomized, parallel, triple-blind clinical trial. This design is justified by the lack of a drug-specific, cost-efficient treatment for SARS-CoV-2 patients and is expected to evaluate safety of the intervention. The use of a therapeutic drug justifies the need for a placebo control group. Triple-blind clinical studies have the lowest levels of bias and, therefore, the highest level of evidence for a clinical study. It is understood that there is no need for a purdyphase I study based on the literature data previously presented.

2. Methods and analysis

2.1. Study setting

The study will be carried out at the São Paulo State University (UNESP) Clinical Hospital of the Botucatu Medical School, Botucatu, São Paulo, Brazil.

2.2. Eligibility criteria

Eligibility criteria are as follows:

1. Sign and agree to the free and informed consent form;
2. Both genders, of any ethnic origin, aged between 18 and 90 years;
3. COVID-19 infected, diagnosed by reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) and/or with a strong suspicion of COVID-19, according to compatible clinical and radiological findings;
4. Time of disease evolution less than 14 days;
5. Radiological diagnosis of grade IIA pneumonia, with gas exchange ratio >200 in blood gas analysis ($paO_2/pFiO_2$), characterizing mild hypoxemia;
6. Indication of hospital treatment regime, provided that the period of hospitalization before inclusion is not more than 48 hours;
7. Demand for supplemental oxygen therapy (O_2) less than 5 L/min.

2.3. Exclusion criteria

Exclusion criteria are as follows:

1. Disagree with the terms of the study;
2. Moderate or severe respiratory failure requiring ICU admission requiring invasive mechanical ventilation or positive pressure noninvasive ventilation (NIV);
3. Pregnancy or puerperium;
4. Hematological diseases;
5. Coagulation disorders;
6. Previous use of anticoagulants in therapeutic dosages;
7. Previous heparin-induced allergy or thrombocytopenia or current thrombocytopenia with a count of less than 50,000 platelets/ mm^3 ;
8. COVID-19 vaccinated patients.

2.4. Interventions

Considering the pulmonary water loss of 8 to 10 mL during the gas exchange in 15 minutes (of inhalation) and compensating the dilution of the solution in the pulmonary fluids, we opted for the dose of 2.5 mg heparin in 1 mL of 0.9% saline, aiming the effective mean tested doses (62.5–250 $\mu g/mL$), jet nebulized (atomizers) 4/4 hours, except the nebulization that would be administered between 12 PM and 6 AM. The treatment will be done with 5 mL of this solution previously prepared (2.5 mg heparin in 1 mL of 0.9% saline - totaling 12.5 mg of enriched heparin per cycle), for 7 days consecutively. We assumed that any reductions in viral load promoted by enriched heparin would have a significant impact during the first 14 days of the infectious process. We considered that most patients have developed the disease for at least 7 days prior to being admitted and that the viral load tends to reduce spontaneously after 14 days. For those reasons, and looking to mitigate any prolongation of hospital stay that we could cause, we opted for a period of 7 days of treatment. All measures for containment of aerosol dispersion during nebulization including unidirectional inspiration and expiration valves.

Individual sterile vials containing 5 mL of enriched heparin (2.5 mg/mL, which will be adjusted after the filtration process

based on the result of biochemical analysis) or placebo (adding to the same total volume of 0.9% saline) will be prepared by the pharmacist, stored in a freezer at -30°C, and delivered to the research team in a blind character. After receiving the preparation (enriched heparin or placebo), these will be inserted into the nebulizer cup and administered in a source of oxygen (5 L/min or according to the patient's need) in isolated rooms, a process that takes 15 minutes. Nebulization therapy will be performed after isolation of the patient and with support from the hospital infection control committee, so that there will be no greater risk of spreading the virus.

1. Group 1 - Control: Jet nebulization with 5 mL of 0.9% saline, administered every 4 hours for 7 days, except the nebulization that would be administered between 12 PM and 6 AM (5 inhalations per day).
2. Group 2 - Experimental: Jet nebulization with 5 mL of enriched heparin (2.5 mg/mL diluted in 0.9% saline - totaling 12.5 mg of enriched heparin per cycle), administered every 4 hours, for 7 days, except the nebulization that would be administered between 12 PM and 6 AM (5 inhalations per day).

Between 12 PM and 6 AM, nebulizations will not be administered to avoid the inconvenience of sleep disruption. All participants will be on continuous oxygen saturation monitors.

2.5. Discontinuation criteria

Participants can withdraw from the study, if they wish, at any time and regardless of the reason, without consent of the research team. Any type of severe adverse events, according to the rules of the Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE 5.0),^[30] will be considered criteria for discontinuation.

The reasons for discontinuing treatment will be properly documented by the research team and, in case the study is closed, the researchers will ensure the continuity of the medical and hospital assistance to the participant.

If COVID-19 is not confirmed by RT-PCR within 72 hours of the inclusion, the patient will be withdrawn from the study.

2.6. Outcomes: primary objectives assessment

1. Safety: related to the use of nebulized enriched heparin by patients with SARS-CoV-2 by the assessment of hemorrhagic events of any nature, alteration of the coagulation testing, such as alteration of the coagulation testing as reflected in a prolonged aPTT, indicated by an increase in aPTT >1.5, and heparin-induced thrombocytopenia;
2. Efficacy: related to the proposed treatment, by the analysis of the SARS-CoV-2 viral load of the participants treated for 7 days, by the sequential assessment of RT-PCR in the nasal swab, that will be compared between pre-treatment, 2, 5, and 7 days (study termination).

2.7. Outcomes: secondary objectives assessment

1. Safety measured by respiratory, clinical, laboratorial, and tomographic findings as follows, in a number of patients, and hospitalization days (including hospital discharge day):
2. Supplemental oxygen therapy needed;
3. Mechanical pulmonary ventilation needed;

4. Renal failure development;
5. Development of major cardiovascular events such as pulmonary embolism and acute myocardial infarction;
6. Demand for ICU treatment;
7. Secondary pulmonary bacterial infections (bacterial pneumonia);
8. Deep vein thrombosis (DVT) by Doppler ultrasonography assessment;
9. Pancreatitis characterized by increase in amylase >200 U/L;
10. Demand for corticosteroid therapy such as hydrocortisone, dexamethasone, and other corticosteroids due to inflammatory pulmonary disease;
11. Death;
12. Increase in white blood cell count ($>10,000 \text{ cells/mm}^3$);
13. Increase in C reactive protein test (CRP) ($>3.00 \text{ mg/L}$);
14. Deterioration of arterial blood gas $\text{paO}_2/\text{pFiO}_2$ ratio (<200);
15. Altered sodium (<135 or $>145 \text{ mEq/L}$);
16. Altered potassium (<3.5 or $>5.5 \text{ mEq/L}$);
17. Worsening of the pulmonary area compromised (%) by inflammation or infection by tomographic assessment.

2.8. Participant timeline

The closure assessment will be carried out on day 8. Randomization will be performed in up to 48 hours after admission. After the end of the study, the participant will be referred and accompanied at the COVID-19 outpatient clinic São Paulo State University (UNESP) Clinical Hospital (Table 1).

2.9. Sample size and recruitment

The total recruitment size will be 50 participants, aiming at a minimum of 40 patients followed during the study period. The sample was estimated considering the number of patients diagnosed as COVID-19 at the São Paulo State University (UNESP) Clinical Hospital that met the study's eligibility criteria.

The minimum sample calculation of 40 patients took into account 2 independent study arms, with an estimated proportion in the viral load reduction rate of 30% for group 1, which will receive placebo, and 75% for group 2 that will be treated with enriched nebulized heparin as proposed in this study, considering 80% test power and a 5% significance level for a bilateral test.

2.10. Allocation

Participants will be divided into 2 groups and randomized 1:1. In this way, they will receive a sequential inclusion number from an electronically drawn number table and will receive the treatment according to the allocation in one of the groups.

The randomization list will be prepared by an independent statistician, using Stat Trek, a program to construct random number tables, available at <http://stattrek.com/Tables/Random.aspx>. Fifty positions will be drawn in a random and consecutive manner. The envelope containing the randomization will be kept in possession of an independent professional (pharmacist), so that the members of the study team will not know the order of allocation.

2.11. Blinding

The clinical trial will be triple-blind. Participants, researchers, the data, and statistical analysis team will not have access to the allocation numbers. A pharmacist will produce the heparin and

Table 1									
Schedule for assessments and intervention.									
Activities	Day 0	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	Day 6	Day 7	Day 8
Informed consent form	X								
Medical visit, patient story and physical examination	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Vital signs assessment	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Medications in use	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Inclusion and exclusion criteria	X								
COVID-19 viral load in RT-qPCR	X		X			X		X	X
Complete blood count, D-dimer, aPTT, urea, creatinine, glucose, reactive protein C, blood gas, and amylase	X		X			X		X	X
Computed thoracic tomography	X								X
HMMH or placebo administration		X	X	X	X	X	X	X	
Adverse events	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Discontinuation criteria	X	X	X	X	X	X	X	X	X

The participants will be followed up and evaluated on days 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, and 8 days after randomization.

the placebo and will assign a researcher of the team to distribute the product to each participant, according to the randomization list. In addition, presentation of the preparation to the control and experimental group will be identical, as enriched heparin is colorless and odorless to the human eye and nose, as well as the saline. The blinding code will not be broken until all research participants have completed the study and the database is closed, that is, it will not undergo further changes (Table 2).

2.12. Emergency unmasking

In an emergency, and if necessary, members of the data and security monitoring committee can request a blinding break, only for the participant at risk and after evaluation of the security committee.

2.13. Data collection plan

Data will be collected daily by the researchers by filling of assessment forms.

All assessment forms are available as supplementary materials, <http://links.lww.com/MD/G541>: Epidemiological and personal antecedents form; Clinical assessment and physical examination form; Laboratory results and tomographic findings form; Adverse events form. (Supplement Material 1 - Figure 1, <http://links.lww.com/MD/G537>, Supplement Material 2 - Figure 2, <http://links.lww.com/MD/G538>, Supplement Material 3 - Figure 3, <http://links.lww.com/MD/G539>, Supplement Material 4 - Figure 4, <http://links.lww.com/MD/G540>).

2.14. Retention

The closure assessment will be carried out on day 8. Randomization will be performed in up to 48 hours after

admission. After the end of the study, the participant will be referred and accompanied at the COVID-19 outpatient clinic São Paulo State University (UNESP) Clinical Hospital.

2.15. Statistics

Categorical variables will be evaluated with Fisher's exact test, continuous variables will be compared with non-parametric methods such as Mann-Whitney test or U test, paired comparisons will be evaluated with the Wilcoxon test, multivariate analysis will be evaluated with regression Cox analysis and long-term clinical analyzes will be compiled on Kaplan-Meier curves.

Missing data and multiple imputations will cause discontinuation of the patient enrollment in order to avoid bias.

2.16. Adverse effects

Adverse effects related to the nebulized use of heparins will be tracked and analyzed according to the Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTC-AE 5.0),^[30] and will be graded from 1 to 5, according to the severity of the event.

Adverse effects secondary to the use of heparins will cause the discontinuation of the study if graded 3 or more. All severe adverse effects noted by the researchers will be reported to the independent data and security monitoring committee.

The following data will be analyzed in case of an adverse event: the type of event or reaction, including predefined events (major bleeding, pulmonary bleeding, and heparin-induced thrombocytopenia); start date and time; date and time of the most recent administration of heparin; the extent of any causal link to the enriched heparin; the severity of the event.

The following adverse events and reactions will be considered severe: Any event that is related to the use of enriched heparin and

Table 2	
Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTC-AE) 5.0 classification^[30].	
Grade	Description
Grade 1: Mild	Asymptomatic or mild symptoms; clinical or diagnostic observations only; intervention not indicated.
Grade 2: Moderate	Minimal, local or noninvasive intervention indicated; limiting age-appropriate instrumental activities of daily life.
Grade 3: Severe or medically significant but not immediately life-threatening	Medical hospitalization or prolongation of hospitalization indicated; disabling; limiting self-care activities of daily life.
Grade 4: Life-threatening consequences	Urgent intervention indicated.
Grade 5: Death	Death related to adverse effects.

causes prolongation of hospital stay, disabling, limiting self-care activities, urgent interventions needed and death; bleeding that results in death, that occurs in a critical area or organ (intracranial, spinal, intraocular, retroperitoneal, intra-articular, or intramuscular), which results in a drop in hemoglobin of 20 g/L or more or demands transfusion of 2 or more units of whole blood or red blood cells; lung bleeding, which is the notable bleeding from the lungs, trachea, or bronchi with repeated hemoptysis or which requires repeated aspiration and is associated with acute deterioration of the respiratory state; heparin-induced thrombocytopenia, which is an unexplained drop in platelet count and a positive heparin antibody test; any other adverse event and reaction that, after evaluated by the independent data and security monitoring committee, are considered not part of the expected clinical course and may be related to the study.

2.17. Patient and public involvement

This research was designed to evaluate the safety of a well established drug, heparin, for a novel purpose. This trial and its questions are in line with a moment of patient's high expectations for treatment options for COVID-19 pneumonia. Drug efficacy and low cost are of paramount importance, considering the extension and raw number of patients worldwide, particularly in developing countries.

To achieve a minimum level of bias, we designed a triple-blind study, in which patients are recruited after in-hospital admission and are fully aware of its methodology, risks, and benefits. All patients are oriented of heparin's primal role as an anticoagulant, although the proposed dosage and the nebulized administration has already shown not to increase thromboplastin time, and, therefore, does not induce anticoagulation.

The burdens of intervention will be assessed daily by clinical evaluations and laboratory tests, and patients can report any signals or symptoms at any given moment.

2.18. Strengths and limitations

This is the first clinical trial that uses inhaled enriched heparin, which allows a lower dosage of heparin to be administered in comparison to other ongoing trials.

It is a triple-blind randomized study.

Dropout rate may be high.

Hospitalization time may be affected, as laboratory exams will be assessed for 7 days.

2.19. Ethics and dissemination

The EnHanCed clinical trial will be conducted in accordance with all applicable Brazilian national laws and international guidelines; in accordance with the ethical principles defined in the 18th World Medical Assembly, Helsinki, 1964, and all applicable amendments; following the International Council for Harmonization (ICH) guidelines for Good Clinical Practice (GCP).

EnHanCed is registered on Brazilian and international platforms under the following registration IDs:

World Health Organization (WHO) International Clinical Trials Registry Platform (ICTRP) Universal Trial Number (UTN): U1111-1264-8253, submitted under the Brazilian Clinical Trials Registry (ReBEC).

National Institute of Health (NIH) United States National Library of Medicine ClinicalTrials.gov platform ID: NCT04743011

Author contributions

Conceptualization: Matheus Bertanha, Andrei Moroz, Maria Inês de Moura Campos Pardini, Edison Luiz Durigon, Rafael Rahal Guaragna Machado, Marcelo Andrade de Lima, Helena Bonciani Nader, Marli Leite de Moraes, Angelo José Magro, Cristiane Rodrigues Guzzo Carvalho, Rita de Cássia Alvarado, Carlos Magno Castelo Branco Fortaleza.

Data curation: Lenize da Silva Rodrigues, Marcone Lima

Sobreira, Alexandre Naime Barbosa, Natália Bronzatto

Medolago, Helga Caputo Nunes, Gustavo Constantino de Campos.

Formal analysis: Helga Caputo Nunes, Gustavo Constantino de Campos.

Funding acquisition: Matheus Bertanha.

Investigation: Matheus Bertanha, Pedro Luciano Mellucci Filho, Vinicius Tadeu Ramos da Silva Grillo, Nathalia Dias Sertorio.

Methodology: Matheus Bertanha, Pedro Luciano Mellucci Filho, Andrei Moroz, Maria Inês de Moura Campos Pardini, Edison Luiz Durigon, Rafael Rahal Guaragna Machado, Rejane Maria Tommasini Grotto, Marcelo Andrade de Lima, Helena Bonciani Nader, Marli Leite de Moraes, Natália Bronzatto Medolago, Angelo José Magro, Cristiane Rodrigues Guzzo Carvalho, Rita de Cássia Alvarado, Carlos Magno Castelo Branco Fortaleza.

Project administration: Matheus Bertanha, Carlos Magno Castelo Branco Fortaleza.

Resources: Lenize da Silva Rodrigues, Alexandre Naime Barbosa, Fábio Florença Cardoso, Leonardo Nazário de Moraes.

Software: Pedro Luciano Mellucci Filho.

Supervision: Lenize da Silva Rodrigues, Marcone Lima Sobreira, Marcelo Andrade de Lima, Alexandre Naime Barbosa, Carlos Magno Castelo Branco Fortaleza.

Validation: Andrei Moroz, Maria Inês de Moura Campos Pardini, Edison Luiz Durigon, Rafael Rahal Guaragna Machado, Rejane Maria Tommasini Grotto, Helena Bonciani Nader, Marli Leite de Moraes, Fábio Florença Cardoso, Angelo José Magro, Cristiane Rodrigues Guzzo Carvalho, Leonardo Nazário de Moraes, Rita de Cássia Alvarado, Carlos Magno Castelo Branco Fortaleza.

Visualization: Marcelo Andrade de Lima.

Writing – original draft: Matheus Bertanha, Pedro Luciano Mellucci Filho.

Writing – review & editing: Matheus Bertanha, Marcelo Andrade de Lima, Natália Bronzatto Medolago, Carlos Magno Castelo Branco Fortaleza.

References

- [1] Mahase E. Covid-19: Coronavirus was first described in The BMJ in 1965. *BMJ* 2020;369:m1547.
- [2] World Health Organization. Naming the coronavirus disease (COVID-19) and the virus that causes it. [Internet]. 2021 [update March 31, 2021]. Available at: [https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/naming-the-coronavirus-disease-\(covid-2019\)-and-the-virus-that-causes-it](https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/naming-the-coronavirus-disease-(covid-2019)-and-the-virus-that-causes-it). Accessed April 04, 2021.
- [3] Bikdeli B, Madhavan MV, Jimenez D, et al. Global COVID-19 Thrombosis Collaborative Group, endorsed by the ISTH, NATF, ESVM, and the IUA, Supported by the ESC Working Group on Pulmonary Circulation and Right Ventricular Function. COVID-19 and

- Thrombotic or Thromboembolic Disease: implications for prevention, antithrombotic therapy, and follow-up: JACC state-of-the-art review. *J Am Coll Cardiol* 2020;75:2950–73.
- [4] Yang X, Yu Y, Xu J, et al. Clinical course and outcomes of critically ill patients with SARS-CoV-2 pneumonia in Wuhan, China: a single-centered, retrospective, observational study. *Lancet Respir Med* 2020;8:475–81.
- [5] Jeanloz RW. The nomenclature of mucopolysaccharides. *Arthritis Rheum* 1960;3:233–7.
- [6] ATTACC Investigators, ACTIV-4a Investigators, REMAP-CAP Investigators. Therapeutic anticoagulation with heparin in noncritically ill patients with Covid-19. *N Engl J Med* 2021;385:790–802.
- [7] Atallah B, Mallah SI, Almahmeed W. Anticoagulation in COVID-19. *Eur Heart J Cardiovasc Pharmacother* 2020;6:260–1.
- [8] Atallah B, Sadik ZG, Salem N, et al. The impact of protocol-based high-intensity pharmacological thromboprophylaxis on thrombotic events in critically ill COVID-19 patients. *Anaesthesia* 2021;76:327–35.
- [9] Belen-Apak FB, Sarialiloglu 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.
- [10] Bardam M, Yang H, Rao Z. Structural insights into SARS coronavirus proteins. *Curr Opin Struct Biol* 2005;15:664–72.
- [11] Coutard B, Valle C, de Lamballerie X, et al. The spike glycoprotein of the new coronavirus 2019-nCoV contains a furin-like cleavage site absent in CoV of the same clade. *Antiviral Res* 2020;176:104742.
- [12] Miller JK, Whitaker GR. Host cell proteases: critical determinants of coronavirus tropism and pathogenesis. *Virus Res* 2015;202:120–34.
- [13] Du L, Kao RY, Zhou Y, et al. Cleavage of spike protein of SARS coronavirus by protease factor Xa is associated with viral infectivity. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;359:174–9.
- [14] Chen L, Gui C, Luo X, et al. Ginsenoside is an inhibitor of the 3C-like proteinase of severe acute respiratory syndrome coronavirus and strongly reduces virus replication in vitro. *J Virol* 2005;79:7095–103.
- [15] Han YS, Chang GG, Joo CG, et al. Papain-like protease 2 (PLP2) from severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV): expression, purification, characterization, and inhibition. *Biochemistry* 2005;44:10349–59.
- [16] Maginnis MS. Virus-receptor interactions: the key to cellular invasion. *J Mol Biol* 2018;430:2590–611.
- [17] Lima MA, Skidmore M, Khamis F, Richardson A. Development of a nano-luciferase based assay to measure the binding of SARS-CoV-2 spike receptor binding domain to ACE-2. *Biochem Biophys Res Commun* 2021;534:485–90.
- [18] Mycroft-West CJ, Su D, Pagani L, 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 Haemostasis* 2020;120:1700–15.
- [19] Mulloy B, Hogwood J, Gray E, et al. Pharmacology of heparin and related drugs. *Pharmacol Rev* 2016;68:76–141.
- [20] Olson ST, Björk I. Predominant contribution of surface approximation to the mechanism of heparin acceleration of the antithrombin-thrombin reaction. Elucidation from salt concentration effects. *J Biol Chem* 1991;266:6353–64.
- [21] Bendstrup KE, Gram J, Jensen JJ. Effect of inhaled heparin on lung function and coagulation in healthy volunteers. *Eur Respir J* 2002;19:606–10.
- [22] Dixon B, Schultz MJ, Hofstra JJ, et al. Nebulized heparin reduces levels of pulmonary coagulation activation in acute lung injury. *Crit Care* 2010;14:445.
- [23] Phelps MK, Olson LM, Patel MAVB, et al. Nebulized heparin for adult patients with smoke inhalation injury: a review of the literature. *J Pharm Technol* 2020;36:130–40.
- [24] Thomas R, Brooks T. Common oligosaccharide moieties inhibit the adherence of typical and atypical respiratory pathogens. *J Med Microbiol* 2004;53:833–40.
- [25] Martínez I, Melero JA. Binding of human respiratory syncytial virus to cells: implication of sulfated cell surface proteoglycans. *J Gen Virol* 2000;81:2715–22.
- [26] van Haren FMP, Page C, Laffey JG, et al. Nebulised heparin as a treatment for COVID-19: scientific rationale and a call for randomised evidence. *Crit Care* 2020;24:454.
- [27] Ayerbe I, Risco C, Ayis S. The association between treatment with heparin and survival in patients with Covid-19. *J Thromb Thrombolysis* 2020;50:298–301.
- [28] Tree JA, Turnbull JE, Bumjig KR, et al. Unfractionated heparin inhibits live wild type SARS-CoV-2 cell infectivity at therapeutically relevant concentrations. *Br J Pharmacol* 2021;178:626–35.
- [29] Abdelkhal 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;34:436–43.
- [30] National Cancer Institute. Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) 5.0. [Internet]. Washington: U.S. Department of Health and Human Services; 2017 [updated November 27, 2017; cited February 24, 2021]. Available at: http://ftp.cancer.gov/proc/ctcaev5.0/ctcaev5.0_quick_reference_8.5.