

Projeto de pesquisa

Heparinização plena versus profilática para o tratamento das formas graves de SARS-Covid-19: estudo clínico, randomizado e controlado - HeSAcovid trial

Full versus prophylactic heparinization for the treatment of severe forms of SARS-Covid-19: clinical, randomized, open and controlled study - HeSAcovid trial

Divisão de Medicina de Emergência do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Ribeirão Preto

2020

Projeto de pesquisa

Resumo

Introdução: A emergência de um novo coronavírus, o SARS-CoV-2, no fim de 2019 tornou-se em poucas semanas uma ameaça à saúde pública mundial. A infecção aguda por esse vírus respiratório pode causar comprometimento importante das trocas gasosas. Um ponto que chama atenção nestes pacientes é que a complacência pulmonar está normal ou pouco reduzida e que os níveis dos produtos de degradação de fibrina, como os d-dímeros, estão muito elevados. Por outro lado, estes vírus podem desencadear o desnudamento do glicocálix endotelial o que propicia a adesão e agregação plaquetária. A nossa hipótese é que este vírus causa desnudamento do glicocálix endotelial levando a agregação plaquetária e ativação da coagulação o que acarreta a trombose da microcirculação pulmonar acarretando efeito espaço morto (áreas ventiladas e não perfundidas) contribuindo para a hipoxemia arterial grave observada nestes casos.

Objetivo: Avaliar se a heparinização plena em comparação com a heparinização profilática melhora as trocas gasosas e diminui a disfunção de múltiplos órgãos em pacientes com COVID-19. Correlacionar a alteração da coagulação com os níveis dos biomarcadores de lesão do glicocálix endotelial.

Metodologia: Os pacientes serão randomizados através de aplicativo eletrônico na proporção 1:1:1 para três grupos: primeiro grupo será utilizado a heparinização plena com enoxaparina corrigida para o clearance de creatinina, no segundo grupo será utilizado a heparina não fracionada ajustada pelo TTPA (mantendo um ratio entre 1,5 a 2,0 vezes) e o terceiro grupo a heparinização profilática através da heparina não fracionada 5000 UI SC 8/8 hs em pacientes com infecção confirmada por SARS-CoV-2 através de RT-PCR e com apresentação clínica grave de insuficiência respiratória necessitando de ventilação mecânica ou refratária a oxigenoterapia (manutenção de frequência respiratória > 24 ipm e saturação <90% com cateter de oxigênio a 4 litros/min). Serão coletados os seguintes exames: gasometria, lactato, D-dímero, PCR, biomarcadores de lesão do glicocálix endotelial (sindecano-1, hialurano, trombomodulina, heparan sulfato, CD44 solúvel, sulfato de condroitina) no momento da inclusão (D0) e após 96 horas da heparinização (D4). Os desfechos primários serão: comparação entre o antes e depois da relação PO₂/FIO₂, disfunção orgânica avaliada através do score SOFA (*Sequential Organ Failure Assessment*), variação D-dímero, dias livre de ventilação mecânica, mortalidade em 28 dias. O desfecho secundário será um desfecho combinado de mortalidade geral em 28 dias, necessidade de hemodiálise, hipoxemia refratária. A heparinização plena será mantida no mínimo por 96 horas e poderá ser suspensa se ocorrer sangramentos ou redução das plaquetas < 30.000 mm³. Será avaliado o desfecho de segurança: sangramento maior, sangramento menor e sangramento que requer atenção médica de acordo com os critérios de TIMI *bleeding risk*. Considerando uma amostra pareada, um nível de significância de 5% e um poder de 85% e uma melhora da relação PO₂/FIO₂ de 150±50 para 200±50 consideramos necessário a inclusão de 10 pacientes em cada grupo. O grupo heparinização plena será avaliado agregado (enoxaparina+heparina não fracionada) e separadamente versus a heparina profilática.

Palavras-chave: SARS-CoV-2; COVID-19; glicocálix endotelial; trombose da microcirculação; heparinização plena

Projeto de pesquisa

Abstract

Introduction: The emergence of a new corona virus, SARS-CoV-2, at the end of 2019 has become a threat to public health worldwide. Acute infection by this respiratory virus can cause significant impairment of gas exchange. A point that draws attention in these patients is that lung compliance is normal or little reduced and that the levels of fibrin degradation products, such as d-dimers, are very high. On the other hand, these viruses can trigger the shedding of the endothelial glycocalyx, which promotes platelet adhesion and aggregation. Our hypothesis is that this virus causes denudation of the endothelial glycocalyx leading to platelet aggregation and activation of coagulation which leads to pulmonary microcirculation thrombosis causing ventilated and non-perfused areas contributing to the severe arterial hypoxemia observed in these cases.

Objective: To evaluate whether full heparinization compared to prophylactic heparin improves gas exchange and decreases multiple organ dysfunction in patients with COVID-19. Correlate the change in coagulation with the levels of the biomarkers of damage to the endothelial glycocalyx. **Methods:** Patients will be randomized using an electronic application in a 1: 1: 1 ratio for three groups: the first group will use full heparinization with enoxaparin corrected for creatinine clearance, in the second group the unfractionated heparin adjusted by the APTT will be used (maintaining a ratio between 1.5 to 2.0 times) and the third group prophylactic heparinization through unfractionated heparin 5000 IU SC 8/8 hs in patients with infection confirmed by SARS-CoV-2 through RT-PCR and with severe clinical presentation of respiratory failure requiring mechanical ventilation or refractory to oxygen therapy (maintenance of respiratory rate > 24 ipm and saturation <90% with oxygen catheter at 4 liters / min). The following tests will be collected: blood gas, lactate, D-dimer, PCR, biomarkers of endothelial glycocalyx lesion (syndecan-1, heparin sulfate, hyalurane, thrombomodulin, CD44s, chondroitin sulfate) at the time of inclusion (D0) and after 72-96 hours after heparinization (D3). The primary outcomes will be: comparison between before and after the PO₂ / FIO₂ ratio, organ dysfunction assessed using the SOFA score (Sequential Organ Failure Assessment), D-dimer variation, days without mechanical ventilation, mortality at 28 days. The secondary endpoint will be a combined endpoint of general mortality within 28 days, need for hemodialysis, refractory hypoxemia. Full heparinization will be maintained for a minimum of 72-96 hours and may be suspended if bleeding or platelet reduction <30,000 mm³ occurs. The safety outcome will be assessed: major bleeding, minor bleeding and bleeding that require medical attention according to the TIMI bleeding risk criteria. Considering a paired sample, a significance level of 5% and a power of 85% and an improvement in the PO₂ / FIO₂ ratio from 150 ± 50 to 200 ± 50, we consider it necessary to include 10 patients in each group. The full heparinization group will be evaluated aggregated (enoxaparin + unfractionated heparin) and separately versus prophylactic heparin.

Keywords: SARS-CoV-2; COVID-19; endothelial glycocalyx; microcirculation thrombosis; full heparinization

1. Introdução

Projeto de pesquisa

Os vírus respiratórios são conhecidos antigos do homem, e circulam há milênios de maneira endêmica em todo o mundo (1). Ocasionalmente, causam surtos epidêmicos, de periodicidade e gravidade imprevisíveis. O material genético simples e a alta capacidade de mutação destes vírus, associada à circulação em diversas espécies, principalmente, em aves e mamíferos, contribuem para o risco potencial de mutação altamente virulenta para a espécie humana. Atualmente, mais de 20 subtipos de vírus já foram descritos como agentes causadores de infecção respiratória aguda, com potencial de evolução para quadros pulmonares graves (2).

Nas duas últimas décadas, a emergência de cepas virais altamente patogênicas despertou ainda mais a atenção mundial para o problema de saúde pública que representam (3). Em 2003, uma nova cepa de coronavírus foi identificada no sudeste asiático, causador de um quadro gripal, em que muitos dos infectados evoluíram rapidamente com complicações pulmonares, ficando conhecida pela sigla SARS-CoV, Síndrome Respiratória Aguda Grave (*Severe Acute Respiratory Syndrome-Coronavirus*), que em poucos meses atingiu 37 países, parando de circular desde 2004 (4). Nesse mesmo ano, um surto de influenza A(H5N1), ocorreu na Ásia Central, levando 483 dos 903 infectados a óbito por insuficiência respiratória (5).

Em abril de 2009, foi identificada a circulação de uma nova cepa viral, a influenza A(H1N1), em uma criança mexicana que surgiu, provavelmente, de mutações adquiridas da circulação viral em porcos e aves (6). Em junho de 2009, o vírus já tinha atingido mais de 207 países, inaugurando a primeira pandemia do século XXI, conhecida como gripe suína (6). Em 2012, o Oriente Médio passou por uma epidemia de outro coronavírus, chamado MERS-CoV, Síndrome Respiratória do Oriente Médio (*Meaddle East Respiratory Syndrome-Coronavirus*), que provavelmente, saltou a barreira interespecies vindo de camelos (7). A Arábia Saudita, por exemplo, relatou 833 casos confirmados, com uma mortalidade de 43% dos infectados (7).

Em 31 de dezembro de 2019, a emergência de um novo subtipo de coronavírus capaz de causar formas graves de pneumonia foi relatada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (8). Em menos de três meses, o chamado SARS-CoV-2 atingiu níveis pandêmicos, e hoje, é estimado que tenha infectado cerca de 600 mil pessoas pelo mundo, levando ao desenvolvimento da doença COVID-19 (8). Diversas sociedades científicas e iniciativas estão sendo incentivadas a fim de aprofundar o conhecimento sobre a COVID-19, cuja gravidade e mortalidade ainda estão a ser analisados, conforme dados em diversas localidades do mundo são gerados (9).

Projeto de pesquisa

Todos esses episódios compartilham de uma característica marcante em comum: a evolução dramática de uma síndrome gripal para um quadro grave de lesão pulmonar aguda, chamada de Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA).

1.1. A Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo

A SDRA é uma lesão pulmonar grave, caracterizada por dano inflamatório agudo e difuso (10). Comprometendo as trocas gasosas e a mecânica pulmonar, a SDRA ocasiona hipoxemia, redução da complacência e da dimensão do tecido pulmonar aerado (10). Uma miríade de insultos pode desencadear este quadro, caracterizado pelo aumento expressivo da permeabilidade vascular (11).

O estudo pioneiro de Ashbaugh *et al* (12), publicado na Lancet em 1967, definiu as bases para o estudo da SDRA, caracterizada por desconforto respiratório, hipoxemia e presença de infiltrado bilateral na imagem de tórax, com relação temporal dentro de uma semana do insulto causador. Na década seguinte, Katzentin *et al* (13) associou este quadro aos achados histológicos que descreveu como Dano Alveolar Difuso (DAD), caracterizado por dano endotelial e alveolar, com exsudato de fluido e células inflamatórias, acarretando grande prejuízo às trocas gasosas. O preenchimento dos alvéolos com fluido proteico compromete a estabilização do surfactante, propiciando colapso alveolar e formação de membrana hialina, um material amorfo composto por debris celulares e componentes proteicos do plasma e do surfactante alveolar, agravando ainda mais a oxigenação (14). Desde então, o achado de DAD é considerado a marca histopatológica da SDRA.

Apesar dos avanços na compreensão da fisiologia pulmonar e dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos na lesão pulmonar aguda, na prática clínica, a abordagem da SDRA continua um desafio. Não existe um teste diagnóstico padrão-ouro e, assim a definição e os critérios diagnósticos de SDRA vêm passando por discussões e evolução de conceitos. Em 2011, por uma iniciativa da Sociedade Europeia de Medicina Intensiva (*European Society of Intensive Care Medicine*), numa reunião internacional para revisar os critérios de SDRA, foi criada a Definição de Berlim (15). Nela, os novos critérios são: 1) início agudo do quadro respiratório, dentro de sete dias de um insulto conhecido; 2) presença de infiltrado bilateral ao exame de imagem do tórax, em que o edema pulmonar não pode ser totalmente explicado por cardiopatia ou sobrecarga hídrica; e 3) hipoxemia, classificada em três categorias de gravidade, de acordo com a relação da pressão parcial de oxigênio (PaO_2) / fração inspirada de oxigênio (FiO_2), em uso de uma

Projeto de pesquisa

PEEP de pelo menos 5 cmH₂O; sendo grave uma relação PaO₂/FiO₂ < 100, moderada uma relação PaO₂/FiO₂ entre 100-200 e leve uma relação PaO₂/FiO₂ entre 200-300 (15).

Até hoje não há uma terapia específica e as recomendações são fundamentalmente medidas de suporte, como estratégias de ventilação protetora e restrição à sobrecarga hídrica (17). Com isso, as taxas de mortalidade mantêm-se elevadas há décadas, com lenta redução ao longo dos anos. O estudo multicêntrico mais recente de Bellani G *et al* (10), realizado em mais de 50 países com 3.022 pacientes com SDRA, encontrou uma mortalidade de 40,3% e 46,1% para SDRA moderada e grave, respectivamente. A estimativa é de que, no mundo, um a cada três pacientes com SDRA não sobreviva em 60 dias (18). No Brasil, a mortalidade parece ser ainda maior, estimada em 52% por Azevedo *et al* (19) em uma coorte multicêntrica prospectiva, que incluiu 242 pacientes com SDRA Os mecanismos fisiopatológicos responsáveis pelo desencadeamento de SDRA após uma infecção por um vírus respiratório, até hoje não são inteiramente compreendidos.

Diversos fatores podem contribuir para a instalação dessa complexa entidade clínica (14, 17, 20-22), como o endotélio pulmonar. Antes visto como uma estrutura inerte, o endotélio pulmonar tem sido atualmente, reconhecido como uma estrutura dinâmica e metabolicamente ativa (23). Mais recentemente, o glicocálix endotelial tem ganhado destaque nas pesquisas clínicas. Definido como uma camada gelatinosa, negativamente carregada, de material proteináceo altamente hidratado, reveste internamente toda a superfície endotelial dos vasos sanguíneos, estabelecendo uma constante intercomunicação entre os componentes do sangue circulante e do endotélio subjacente (24, 25). O glicocálix é formado por um suporte de glicoproteínas de membrana, sendo a principal o sindecano-1, e receptores do hialurano (CD44). Nestas moléculas se ligam várias glicosaminoglicanas sulfatadas e não sulfatadas. A glicosaminoglicana sulfatada mais encontrada é o heparan sulfato que se liga ao sindecano-1 e a principal glicosaminoglicana não sulfatada é o hialurano que se liga ao receptor CD44.

Evidências crescentes apontam o papel-chave que o glicocálix endotelial pulmonar desempenha na manutenção da homeostasia e integridade da barreira alvéolo-capilar (27, 28). Estudos clínicos e experimentais mostram a participação central do glicocálix endotelial no controle da permeabilidade (29, 30) e do tônus vascular (31, 32), na regulação da adesão e migração de leucócitos (33, 34), na adesão e agregação

Projeto de pesquisa

plaquetária (35, 36); processos fisiopatológicos fundamentais na lesão pulmonar aguda e no desenvolvimento da SDRA

Nosso grupo, em estudo patrocinado pela FAPESP (processo número 22147-1), que esta em fase de revisão em um periódico internacional, mostrou evidências da participação da lesão do glicocálix endotelial, principalmente do hialurano, no processo fisiopatológico de instalação da SDRA após uma síndrome gripal durante uma epidemia de influenza.

Atualmente, nos casos de SDRA, desencadeada nos pacientes com SARS-Covid-19 alguns fatos chamam a atenção. Primeiro, apesar de importante comprometimento da oxigenação com importante redução da saturação arterial de oxigênio, estes pacientes mantem a complacência pulmonar normal ou discretamente reduzida. Outro aspecto que chama a atenção é a importante elevação dos produtos de degradação da fibrina como o D-dímero, sugerindo intensa ativação da coagulação, inclusive com demonstração em alguns estudos preliminares de necropsia a presença de microtrombos na circulação pulmonar. (37)

A trombose da microcirculação pulmonar poderia ser a responsável pela importante hipoxemia secundária ao efeito de espaço morto, com importantes áreas ventiladas, porém não perfundidas.

Projeto de pesquisa

2. Hipótese do Estudo

A infecção por SARS-CoV-2 leva ao desnudamento do glicocálix endotelial levando a trombose da microcirculação pulmonar e o tratamento precoce com heparinização plena pode diminuir a trombose neste território melhorando a oxigenação e a disfunção de órgãos associada.

3. Objetivos principais

Avaliar se a heparinização plena melhora as trocas gasosas e diminui a disfunção de múltiplos órgãos.

4. Objetivos secundários

Avaliar a participação do desnudamento do glicocálix endotelial na ativação da coagulação encontrada nestes pacientes.

5. Materiais e Métodos

5.1. Desenho do estudo

Estudo clínico, aberto, randomizado, controlado comparando a heparinização plena com enoxaparina/heparina não fracionada versus a heparinização profilática em pacientes com infecção confirmada pelo Sars-Covid-19 e apresentação clínica grave com insuficiência respiratória.

5.2. Local de estudo

O estudo será realizado nas seguintes localidades: 1) Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HC-FMRP-USP); 2) Unidade de Emergência do Hospital das Clínicas da FMRP-USP (UE-HCFMRP-USP); 3) Hospital Estadual de Serrana (HE-Serrana) 4) Hospital Estadual de Américo Brasiliense (HE-AB), 5) Santa Casa de Sertãozinho.

O HC-FMRP-USP forma um complexo acadêmico de saúde, sendo uma das instituições de atendimento à população, ensino e pesquisa mais importantes do país. Atualmente conta com mais de 800 leitos de internação, 105 leitos de terapia intensiva e com cerca de 700.000 atendimentos por ano.

Projeto de pesquisa

A UE-HCFMRP-USP é um hospital exclusivo para o atendimento de urgências e emergências, sendo referência terciária para 26 municípios da Divisão Regional de Saúde XIII (DRS XIII) do Estado de São Paulo que totaliza, aproximadamente, 1.200.000 habitantes e foi pactuado como a referência terciária para o tratamento dos pacientes com as formas graves da SARS-covid-19.

5.3. Pacientes – Critérios de inclusão

Serão incluídos os seguintes pacientes:

- 1) Idade superior ou igual a 18 anos
- 2) Infecção pelo SARS-covid-19 confirmada através de RT-PCR
- 3) Formas graves confirmadas pela presença de SDRA de acordo com a classificação de Berlim (início dos sintomas nos últimos 7 dias, infiltrado bilateral na radiografia de tórax, hipoxemia arterial com relação $\text{PaO}_2/\text{FIO}_2 < 300$, ausência de cardiopatia estrutural ou evidências de insuficiência cardíaca aguda.
- 4) Presença de apresentação clínica grave com insuficiência respiratória necessitando de intubação orotraqueal ou ventilação mecânica ou manutenção de $\text{FR} > 24$ ipm e saturação $< 90\%$ após a administração de oxigênio suplementar por cateter nasal a 4 litros/min.
- 5) Dosagem de D-dímero maior e igual a 1 pg/ml.
- 6) Presença de tempo de protrombina (TP/INR) $< 1,5$ e TTPA (Tempo de tromboplastina parcial ativado (TTPA) $< 1,5$.
- 7) Contagem de plaquetas maior que $100.000/\text{mm}^3$

5.4 Critérios de exclusão:

- 1) Paciente com idade acima de 85 anos.
- 2) Paciente com clearance de creatinina < 10 ml/min.
- 3) Paciente com choque circulatório grave com dose de noradrenalina maior que 1.0 pg/Kg/min
- 4) Pacientes renal crônico em hemodiálise
- 5) Paciente com hepatopatia crônica Child B e C
- 6) Pacientes com doenças avançadas (neoplasia em atividade, insuficiência cardíaca classe funcional III e IV, DPOC em uso crônico de oxigênio com mais

Projeto de pesquisa

de 2 exacerbações no último ano, demência avançada, paciente acamado com sequela importante de acidente vascular encefálico ou traumatismo cranioencefálico.

- 7) Parada cardiorrespiratória.
- 8) Grávidas.
- 9) Cirurgia recente de grande porte nas últimas 3 semanas.
- 10) Acidente vascular encefálico recente nos últimos 3 meses.
- 11) Presença de sangramento em atividade.
- 12) Presença de discrasia sanguínea como: hemofilia, deficiência de fator de Von Willebrand, etc.
- 13) Participação em outra investigação clínica com intervenção associada
- 14) Indicação formal de anticoagulação oral por outros motivos tais como: embolia pulmonar, síndrome coronariana aguda, etc.

5.5 Randomização

Os pacientes serão randomizados na proporção 1:1:1 entre três grupos através de aplicativo digital.

Grupo 1) Heparinização plena com enoxaparina: A heparinização plena será realizada com enoxaparina ajustada para o clearance de creatinina conforme o esquema abaixo):

Clearance de creatinina	< 75 anos	> 75 anos
> 50 ml/min	1 mg/Kg SC 12/12 hs	0,75 mg/Kg SC 12/12 hs
30-50 ml/min	0.75 mg/Kg SC 12/12 hs	1 mg/Kg SC 1 x ao dia
10-30 ml/min	1 mg/Kg SC 1x ao dia	0.75 mg/Kg SC 1x ao dia
< 10 ml/h	Não será incluído	Não será incluído

Como a função renal pode modificar durante o estudo, consideramos necessária a dosagem diária de creatinina e o ajuste da dose de enoxaparina deverá ser realizado diariamente conforme a evolução da função renal. Duração da heparinização: 96 horas. A enoxaparina poderá ser estendida até 7-10 dias a critério da equipe médica para aqueles pacientes que apresentarem importante melhora clínica. A enoxaparina poderá ser suspensa há qualquer momento se for observado algum sangramento maior ou

Projeto de pesquisa

menor de acordo com os critérios de segurança incluído neste estudo ou contagem de plaquetas inferior a 30.000 mm³.

Grupo 2) Heparinização plena com heparina não fracionada

Bolus inicial: 60UI/Kg (máximo: 4000 UI)				
Infusão inicial: 12 UI/Kg/hora (máximo: 1000U/h)				
Meta terapêutica: manter TTPA entre 50-70 segundos (ratio entre 1,5 e 2,0)				
Solução padrão: 25.000 UI de heparina em 250 ml de SF0,9% (100 UI/ml)				
TTPA (segundos)	<i>Bolus</i>	Suspensão	Alteração na velocidade infusão	Repetir TTPA
<36	Repetir <i>bolus</i>	0 min	+ 1ml/h	6 horas
36-49	0	0 min	+ 1ml/h	6 horas
50-70	0	0 min	0	12 horas
71-89	0	0 min	- 2ml/h	12 horas
81-100	0	30 min	- 4ml/h	6 horas
101-130	0	60 min	- 6ml/h	6 horas
>130	0	60 min	-12 ml/h	6 horas
Exemplo: paciente 70 Kg bolus = (70x60=4.200)= máximo= 4000 UI				
Infusão contínua: 12x70 (12 UI/Kg/h)= 840 UI/h= 840/100= 8,4 ml/h				

Não é necessário ajuste para a função renal. A intensidade da heparinização será controlada através do tempo de trombloplastina parcial ativado (TTPA). Duração da heparinização: 96 horas. A heparina poderá ser estendida a critério da equipe médica até 7-10 dias para aqueles pacientes que apresentarem importante melhora clínica. A heparina poderá ser suspensa há qualquer momento se for observado algum sangramento maior ou menor de acordo com os critérios de segurança incluído neste estudo ou contagem de plaquetas inferior a 30.000 mm³.

Grupo 3) Heparinização profilática

Projeto de pesquisa

O grupo controle receberá heparinização profilática com heparina não fracionada SC na dose de 5000 UI 8/8 h.

5.6. Informações clínicas e demográficas

As informações clínicas e demográficas serão adquiridas através da consulta do prontuário médico dos pacientes. Serão avaliados dados clínicos como sintomas, duração dos sintomas, doenças prévias, peso, altura, parâmetros respiratórios e hemodinâmicos, exames bioquímicos gerais, achados de radiografia de tórax.

6. Coleta do material

As coletas de amostras sanguíneas dos indivíduos incluídos serão realizadas em dois momentos: 1) na inclusão no estudo (D0); 2) após 96 horas (D4). A coleta será em tubo sem anticoagulante (tubo de tampa amarela ou vermelha), centrifugado a 1000 x g por 15 minutos e o soro será coletado e armazenado em freezer a -70° celsius.

Serão dosados nos dois tempos D0 e D4:

No laboratório do hospital:

- D-dímeros
- Gasometria arterial com lactato
- Proteína C reativa
- A dosagem de creatinina e hemoglobina e plaquetas deverão ser realizadas diariamente para ajuste das doses de enxoparina/heparina não fracionada.

No laboratório de pesquisa:

- Marcadores de lesão do glicocálix endotelial (sindecano-1; heparan sulfato, hialurano, sulfato de condroitina, trombomodulina; C44 solúvel).

As dosagens desses marcadores serão realizadas por meio da técnica de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) através de kits comerciais disponíveis no mercado. (abcam®, Cambridge, UK e R&D, Minneapolis, USA).

7. Avaliação da microcirculação sublingual

A avaliação da microcirculação através do equipamento de videocapilaroscopia sublingual Glycocheck na inclusão no estudo e após 96 horas. Este equipamento consiste em uma câmera acoplada a uma lente de magnificação que é inserida de forma não-invasiva na região sublingual e permite visualização de toda a rede capilar local. As

Projeto de pesquisa

imagens serão adquiridas e salvas, e posteriormente, analisadas por software dedicado que permite estimar a espessura do glicocálix endotelial através da zona de exclusão de hemácias.

8. Desfechos clínicos e laboratoriais

Serão considerados os seguintes desfechos primários:

- 1) Dias livre de ventilação mecânica (dentro 28 dias de seguimento, quantos dias foram fora da ventilação mecânica, se o paciente for a óbito antes dos 28 dias de seguimento, considera-se que ele não ficou nenhum dia fora da ventilação mecânica).
- 2) Mortalidade geral em 28 dias.
- 3) Avaliação das trocas gasosas entre D0/D4 avaliado através da relação PO2/FIO2
- 4) Avaliação dos níveis de D-dímero entre os dias D0/D4.
- 5) Avaliação dos níveis circulantes dos biomarcadores de lesão do glicocálix endotelial entre o D0/D4.
- 6) Avaliação da espessura do glicocálix endotelial avaliada através da microscopia sublingual entre D0/D4.
- 7) Avaliação da disfunção orgânica avaliada através do escore SOFA (Sequential Organ Failure Assessment Score) entre D0/D4.

Será considerado o seguinte desfecho secundário composto por mortalidade geral, insuficiência renal com necessidade de hemodiálise, hipoxemia refratária com saturação arterial de oxigênio < 90% mesmo com FIO2>80%, presença de SOFA>20.

9. Desfechos clínicos de segurança:

Será avaliada a ocorrência de sangramentos maiores, sangramentos menores e sangramentos que requeiram atenção médica de acordo com a classificação do *Thrombolysis in Myocardial Infarction (TIMI) bleeding risk*. **Sangramento maior:** Qualquer sangramento intracraniano (excluindo microhemorragias <10 mm evidentes somente na ressonância magnética). Hemorragia associada a queda da hemoglobina $\geq$ 5g/dl, Hemorragia fatal que leva ao óbito dentro de sete dias. **Sangramento menores:** Sangramento clinicamente evidente (incluindo exames de imagem) causando uma queda da hemoglobina entre 3-5 g/dl ou redução maior que 10% do hematócrito. Perda

Projeto de pesquisa

sanguínea clinicamente não evidenciada, porém com queda do $Hb \geq 4 \text{ g/dl}$ ou do hematócrito $\geq 12\%$. Qualquer outra hemorragia que não se encaixe nos critérios maiores e que apresente pelo menos um dos critérios: necessidade de intervenção para controle da hemorragia, prolongamento da internação devido ao sangramento. **Sangramento que requer atenção médica:** Qualquer sangramento que não se encaixe nos critérios acima. Qualquer hemorragia que cause uma queda de $Hb < 3 \text{ g/dl}$ ou do hematócrito $< 9\%$.

10. Riscos, desconfortos e benefícios esperados na participação dos voluntários no estudo.

Os riscos relacionados à participação deste estudo estão relacionados à dor da picada da agulha, pequenos hematomas na região de punção venosa, perda de confidencialidade dos dados e o principal risco é a ocorrência de algum sangramento clínico que pode afetar qualquer órgão, inclusive o cérebro, para isto o paciente será monitorado diariamente, e na vigência de qualquer sangramento o anticoagulante do estudo poderá ser suspenso pela equipe médica. Também serão monitorados diariamente os níveis de plaquetas sanguíneas e o seu número reduzirem bastante ($< 30.000 \text{ mm}^3$) o anticoagulante também será descontinuado. Outro desconforto relacionado ao estudo é ficar com a boca aberta por cerca de cinco minutos para realização das imagens da microcirculação sublingual. O voluntário não obterá nenhum benefício direto com a participação desta pesquisa, mas ajudará no entendimento do processo de lesão pulmonar durante esta doença podendo contribuir com o desenvolvimento de um futuro tratamento.

11. Ventilação mecânica e tratamento associado

É sugerido que se utilize os parâmetros de ventilação protetora preconizados pelos *ARDSnet*. Contudo, cada UTI poderá utilizar o protocolo de ventilação definido em sua instituição. O tratamento associado com cloroquina, azitromicina ficará a critério de cada unidade de acordo com o protocolo definido de tratamento dos casos graves de SARS-covid-19.

12. Análise estatística

Projeto de pesquisa

A análise estatística dos dados será realizada através do programa Stata 13.0 v (Texas; USA). As variáveis categóricas serão expressas em frequência e porcentagem. As variáveis quantitativas com distribuição normal serão expressas em média+-desvio-padrão. As variáveis quantitativas sem distribuição normal serão expressas em mediana e intervalo interquartil. Para comparação entre os dias livres de ventilação mecânica, a comparação entre os níveis dos biomarcadores de lesão do glicocálix endotelial, os níveis de D-dímero e da relação PO₂/FIO₂ entre os dois momentos de observação (D0 e D3) será utilizado o teste t de *Student* pareado (distribuição normal) ou teste de Wilcoxon (distribuição não normal). Para comparação da mortalidade entre os dois grupos, do desfecho secundário combinado, assim como as taxas de sangramento será utilizado o teste do qui-quadrado. Será considerado como estatisticamente significativo um p-valor bicaudal menor que 0,05.

13. Determinação do tamanho amostral

Considerando uma amostra pareada com relação PO₂/FIO₂ de 150±50 na admissão com aumento para 200±50 no grupo heparinização plena, um nível de significância de 5% e um poder de 90% seria necessário a inclusão de 10 pacientes em cada grupo. O grupo enoxaparina e heparina não fracionada será analisado agrupado e também de forma isolada.

14. Confirmação da infecção pelo SARS-covid-19

A confirmação da infecção pelo SARS-covid-19 será realizada através de RT-PCR das amostras obtidas do *swab* nasofaríngeo e orofaríngeo nos pacientes não intubados e do aspirado traqueal dos pacientes intubados e realizado conforme a técnica descrita abaixo: **Teste molecular RT-PCR para a detecção de RNQ viral.**

Extração do RNA das amostras. Kit QIAamp® Viral RNA Mini Kit (Qiagen) seguindo as orientações do fabricante. PCR em tempo real. Trata-se de reação molecular *in house* no formato *one-step* (transcrição reversa + amplificação em uma única reação) utilizando os primers/sondas indicados pelo *Centers for Diseases Control* (CDC). Os primers e sondas encontram-se descritos na Tabela 1. As sondas TaqMan® são marcadas na extremidade 5' com a molécula repórter 6-carboxifluoresceína (FAM) e com o QSY como quencher. Para a reação de amplificação utiliza-se o kit GoTaq Probe 1-Step RT-qPCR (Promega). O protocolo de reação consiste em: GoTaq® Probe qPCR

Projeto de pesquisa

Master Mix (1X), GoScript™ RT Mix for 1-Step RT-qPCR (1X), Primer F (300 nM), Primer R (300 nM), Probe FAM-QSY (150 nm) e 8 uL da amostra de RNA extraída. O ciclo de amplificação, 45°C (transcrição reversa) - 30 min, 95°C - 2 min, 40x; 95°C - 15s, 60°C - 1 min. O equipamento de PCR em tempo real utilizado é o 7500 Real Time PCR System (Thermo Fisher Scientific).

Sequência dos primers e das sondas (CDC, 2020).

15. Resultados esperados e perspectiva

Espera-se observar uma melhora na oxigenação no grupo heparinização plena (enoxaparina+heparina não fracionada) em relação ao grupo de heparinização profilática manifestada através de um aumento na relação PO₂/FIO₂ neste primeiro grupo. Espera-se uma redução do escore de disfunção orgânica (SOFA) no grupo heparinização plena. Com a heparinização espera-se a melhora de desfechos clínicos como dias livres de ventilação mecânica. Espera-se correlacionar o distúrbio da coagulação observada, principalmente dos níveis de d-dímero, com os marcadores de lesão do glicocálix endotelial. Espera-se no desfecho de segurança um nível similar de sangramentos maiores e uma discreta elevação dos sangramentos menores no grupo de heparinização plena.

16. Aspectos éticos

Em observância a legislação que regulamenta a pesquisa com seres humanos, o protocolo de pesquisa será submetido e iniciará somente após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do HCFMRP-USP. Como parte da documentação prevista nesta legislação, elaboramos o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), o qual em linguagem simples, os participantes ou os seus representantes legais (em caso de incapacidade do participante) serão convidados a participar da pesquisa e informados sobre os objetivos, procedimentos, riscos, desconfortos, benefícios e garantia do anonimato. O estudo será conduzido em conformidade com as resoluções nacionais e internacionais como descritas nos seguintes documentos: Resolução CNS 466/12, Declaração de Helsinque e todas as suas revisões e alterações, Documento de Las Américas.

Projeto de pesquisa

16. Cronograma

	Abril/2020	Maio/2020	Junho/2020	Julho/2020	Agosto/2020	Setembro/2020
Aprovação ética	X					
Solicitação de Subsídio para Projeto	X					
Inclusão dos Pacientes no Estudo		X	X			
Coleta das amostras		X	X			
Dosagem dos biomarcadores e Perfil Molecular				X		
Análise dos dados				X	X	
Correlação com dados clínicos					X	X
Publicação						X

Projeto de pesquisa

17. Estimativas de custos

Item	Descrição	Quantidade	Valor Unitário	Valor Total
Reagem de sindecano-1	Kit ELISAx96	03	R\$5000,00	R\$15.000,00
Reagem de heparan sulfato	Kit ELISAx96	03	R\$5000,00	R\$15.000,00
Reagem de hialurano	Kit ELISAx96	03	R\$5000,00	R\$15.000,00
Reagem do CD44s	Kit ELISAx96	03	R\$5000,00	R\$15.000,00
Reagem de sulfato de condroitina	Kit ELISAx96	03	R\$5000,00	R\$15.000,00
Material de consumo para coleta sangue	Diversos	01	R\$1000,00	R\$1000,00
Hexaparina	medicamento	100 doses	R\$80,00	R\$8.000,00
Pararina não fracionada	medicamento	200 ampolas	R\$5,00	R\$1.000,00
Testes UPC		30	R\$36,00	R\$ 1080,00
Teste-PCR Sars-covid-19	Já é realizado na rotina do hospital			
Valor Total				R\$ 86.080,00

Apoio financeiro: Os custos do projeto serão oriundo através de recurso do CNPQ Nº 07/2020 - Pesquisas para enfrentamento da COVID-19

18. Referências

1. Kash JC, Taubenberger JK. The role of viral, host, and secondary bacterial factors in influenza pathogenesis. *Am J Pathol*. 2015;185(6):1528-36.
2. Dandachi D, Rodriguez-Barradas MC. Viral pneumonia: etiologies and treatment. *Journal of investigative medicine : the official publication of the American Federation for Clinical Research*. 2018;66(6):957-65.
3. Visseaux B, Burdet C, Voiriot G, Lescure FX, Chougar T, Brugiere O, et al. Prevalence of respiratory viruses among adults, by season, age, respiratory tract region and type of medical unit in Paris, France, from 2011 to 2016. *PLoS One*. 2017;12(7):e0180888.
4. Luyt CE, Combes A, Trouillet JL, Nieszkowska A, Chastre J. Virus-induced acute respiratory distress syndrome: epidemiology, management and outcome. *Presse Med*. 2011;40(12 Pt 2):e561-8.
5. Bresee J, Fitzner J, Campbell H, Cohen C, Cozza V, Jara J, et al. Progress and Remaining Gaps in Estimating the Global Disease Burden of Influenza. *Emerging infectious diseases*. 2018;24(7):1173-7.
6. Oliveira NAS, Iguti AM. O vírus Influenza H1N1 e os trabalhadores da suinocultura: uma revisão. *Revista Brasileira de Saúde Ocupacional*. 2010;35:353-61.
7. Al-Hazmi A. Challenges presented by MERS corona virus, and SARS corona virus to global health. *Saudi journal of biological sciences*. 2016;23(4):507-11.
8. Koo JR, Cook AR, Park M, Sun Y, Sun H, Lim JT, et al. Interventions to mitigate early spread of SARS-CoV-2 in Singapore: a modelling study. *The Lancet Infectious Diseases*. 2020.
9. Lai CC, Shih TP, Ko WC, Tang HJ, Hsueh PR. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and coronavirus disease-2019 (COVID-19): The epidemic and the challenges. *International journal of antimicrobial agents*. 2020;55(3):105924.
10. Bellani G, Laffey JG, Pham T, Fan E, Brochard L, Esteban A, et al. Epidemiology, Patterns of Care, and Mortality for Patients With Acute Respiratory Distress Syndrome in Intensive Care Units in 50 Countries. *Jama*. 2016;315(8):788-800.
11. Gattinoni L, Taccone P, Carlesso E, Marini JJ. Prone position in acute respiratory distress syndrome. Rationale, indications, and limits. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013;188(11):1286-93.

Projeto de pesquisa

12. Ashbaugh DG, Bigelow DB, Petty TL, Levine BE. Acute respiratory distress in adults. *Lancet*. 1967;2(7511):319-23.
13. Cardinal-Fernandez P, Lorente JA, Ballen-Barragan A, Matute-Bello G. Acute Respiratory Distress Syndrome and Diffuse Alveolar Damage. New Insights on a Complex Relationship. *Ann Am Thorac Soc*. 2017;14(6):844-50.
14. Pham T, Rubenfeld GD. Fifty Years of Research in ARDS. The Epidemiology of Acute Respiratory Distress Syndrome. A 50th Birthday Review. *Am J Respir Crit Care Med*. 2017;195(7):860-70.
15. Force ADT, Ranieri VM, Rubenfeld GD, Thompson BT, Ferguson ND, Caldwell E, et al. Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition. *JAMA*. 2012;307(23):2526-33.
16. Matthay MA, McAuley DF, Ware LB. Clinical trials in acute respiratory distress syndrome: challenges and opportunities. *Lancet Respir Med*. 2017;5(6):524-34.
17. Meyer NJ, Calfee CS. Novel translational approaches to the search for precision therapies for acute respiratory distress syndrome. *Lancet Respir Med*. 2017;5(6):512-23.
18. Sarma A, Calfee CS, Ware LB. Biomarkers and Precision Medicine: State of the Art. *Critical care clinics*. 2020;36(1):155-65.
19. Azevedo LC, Park M, Salluh JJ, Rea-Neto A, Souza-Dantas VC, Varaschin P, et al. Clinical outcomes of patients requiring ventilatory support in Brazilian intensive care units: a multicenter, prospective, cohort study. *Critical care*. 2013;17(2):R63.
20. Huppert LA, Matthay MA, Ware LB. Pathogenesis of Acute Respiratory Distress Syndrome. *Seminars in respiratory and critical care medicine*. 2019;40(1):31-9.
21. Short KR, Kasper J, van der Aa S, Andeweg AC, Zaaraoui-Boutahar F, Goeijenbier M, et al. Influenza virus damages the alveolar barrier by disrupting epithelial cell tight junctions. *Eur Respir J*. 2016;47(3):954-66.
22. Kollmus H, Pilzner C, Leist SR, Heise M, Geffers R, Schughart K. Of mice and men: the host response to influenza virus infection. *Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society*. 2018;29(7-8):446-70.
23. Millar FR, Summers C, Griffiths MJ, Toshner MR, Proudfoot AG. The pulmonary endothelium in acute respiratory distress syndrome: insights and therapeutic opportunities. *Thorax*. 2016;71(5):462-73.
24. Curry FE, Adamson RH. Endothelial glycocalyx: permeability barrier and mechanosensor. *Annals of biomedical engineering*. 2012;40(4):828-39.

Projeto de pesquisa

25. Reitsma S, Slaaf DW, Vink H, van Zandvoort MA, oude Egbrink MG. The endothelial glycocalyx: composition, functions, and visualization. *Pflügers Archiv : European journal of physiology*. 2007;454(3):345-59.
26. Dane MJ, van den Berg BM, Lee DH, Boels MG, Tiemeier GL, Avramut MC, et al. A microscopic view on the renal endothelial glycocalyx. *American journal of physiology Renal physiology*. 2015;308(9):F956-66.
27. Wang J, Wu A, Wu Y. Endothelial Glycocalyx Layer: A Possible Therapeutic Target for Acute Lung Injury during Lung Resection. *BioMed research international*. 2017;2017:5969657.
28. LaRiviere WB, Schmidt EP. The Pulmonary Endothelial Glycocalyx in ARDS: A Critical Role for Heparan Sulfate. *Current topics in membranes*. 2018;82:33-52.
29. Huxley VH, Williams DA. Role of a glycocalyx on coronary arteriole permeability to proteins: evidence from enzyme treatments. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2000;278(4):H1177-85.
30. Jacob M, Chappell D. Reappraising Starling: the physiology of the microcirculation. *Current opinion in critical care*. 2013;19(4):282-9.
31. Mochizuki S, Vink H, Hiramatsu O, Kajita T, Shigeto F, Spaan JA, et al. Role of hyaluronic acid glycosaminoglycans in shear-induced endothelium-derived nitric oxide release. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2003;285(2):H722-6.
32. Florian JA, Kosky JR, Ainslie K, Pang Z, Dull RO, Tarbell JM. Heparan sulfate proteoglycan is a mechanosensor on endothelial cells. *Circulation research*. 2003;93(10):e136-42.
33. Mulivor AW, Lipowsky HH. Role of glycocalyx in leukocyte-endothelial cell adhesion. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2002;283(4):H1282-91.
34. Lipowsky HH. Role of the Glycocalyx as a Barrier to Leukocyte-Endothelium Adhesion. *Advances in experimental medicine and biology*. 2018;1097:51-68.
35. Miranda CH, de Carvalho Borges M, Schmidt A, Marin-Neto JA, Pazin-Filho A. Evaluation of the endothelial glycocalyx damage in patients with acute coronary syndrome. *Atherosclerosis*. 2016;247:184-8.
36. Becker BF, Jacob M, Leipert S, Salmon AH, Chappell D. Degradation of the endothelial glycocalyx in clinical settings: searching for the sheddases. *British journal of clinical pharmacology*. 2015;80(3):389-402.

Projeto de pesquisa

37. Dolhnikoff M, Duarte-Neto NA, Monteiro RAA, et. al. Pathological evidence of pulmonary thrombotic phenomena in severe COVID-19. (In press-Accpeted Article)