



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

BRUNO MORAES DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS,
INFLAMATÓRIOS E DE ESTRESSE OXIDATIVO DE
PACIENTES COM COVID-19 LEVE, MODERADA E GRAVE**

Londrina
2023

BRUNO MORAES DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS,
INFLAMATÓRIOS E DE ESTRESSE OXIDATIVO DE
PACIENTES COM COVID-19 LEVE, MODERADA E GRAVE**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Fisiopatologia Clínica e Laboratorial do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Danielle Venturini

Londrina
2023

O48a Oliveira, Bruno Moraes de.
Avaliação de Parâmetros Bioquímicos, Inflamatórios e de Estresse Oxidativo de Pacientes com Covid-19 Leve, Moderada e Grave / Bruno Moraes de Oliveira. - Londrina, 2023.

71 f. : il.

Orientador: Danielle Venturini.

Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial, 2023.

Inclui bibliografia.

1. COVID-19 - Tese. 2. Severidade da Doença - Tese. 3. Estresse Oxidativo - Tese. 4. Inflamação - Tese. I. Venturini, Danielle. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial. III. Título.

CDU 616-092

BRUNO MORAES DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS, INFLAMATÓRIOS
E DE ESTRESSE OXIDATIVO DE PACIENTES COM COVID-19 LEVE,
MODERADA E GRAVE**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Fisiopatologia Clínica e Laboratorial do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Danielle Venturini
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Marla Karine Amarante
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Marcell Alysson Batisti Lozovoy
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 25 de agosto de 2023.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus, pela vida e pelas oportunidades vividas até aqui.

Agradeço aos meus pais Jair e Dora, pelo apoio inabalável, pela orientação e compreensão, pelo amor incondicional e por me acompanharem em todos os momentos, nas conquistas e nos desafios. Ao meu irmão Eduardo, pelo carinho, pelo respeito e pelo companheirismo no decorrer dessa jornada.

Agradeço minha namorada Rita pelo amor, pela compreensão, apoio, orgulho e carinho demonstrados em cada etapa desse mestrado, vivendo e compartilhando comigo as frustrações e comemorando as conquistas.

Agradeço minha orientadora, profa. Dra. Danielle Venturini, pela confiança em meu trabalho, pelo respeito e pela amizade demonstrados e cultivados desde minha graduação em farmácia, passando pela residência em análises clínicas e chegando ao mestrado. Agradeço a oportunidade de fazer pesquisa e desenvolver um trabalho sobre uma temática que foi a realidade dos profissionais de saúde, especialmente no âmbito hospitalar, nos últimos três anos.

Agradeço a equipe e alunos do Laboratório de Pós-Graduação por me receberem de volta, agora como pós-graduando. Faço um agradecimento em especial àqueles que auxiliaram na execução desse trabalho, Amanda e Tawane, e nos treinamentos para a execução das técnicas de estresse oxidativo, João Pedrão, Laura e Ana Paula.

Agradeço aos membros da Banca Examinadora por aceitarem o convite e participarem dessa etapa tão importante, contribuindo não apenas para a entrega desse trabalho, mas também para o seguimento de minha formação acadêmica.

Agradeço aos pacientes que aceitaram participar desse trabalho, sem eles nada disso teria sentido ou seria possível.

Por fim, agradeço aos funcionários e alunos do Hospital Universitário de Londrina que tornaram esse trabalho possível: técnicos de coleta, de laboratório, plantonistas, pós-graduandos e estagiários. O trabalho de todos foi essencial para a obtenção dos dados utilizados nesse estudo.

“A ciência e a vida cotidiana não podem e não
devem ser separadas”.
(Rosalind Franklin)

..

RESUMO

Oliveira, Bruno Moraes de. **Avaliação de Parâmetros Bioquímicos, Inflamatórios e de Estresse Oxidativo de Pacientes Com Covid-19 Leve, Moderada e Grave**. 2023. 70 folhas. Dissertação de mestrado (Centro de Ciências da Saúde) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2023.

Introdução: Entre os diversos processos fisiopatológicos da doença Covid-19, um dos fatores que contribuem para o desenvolvimento dos casos graves é a tempestade de citocinas, caracterizada pela liberação de mediadores pró-inflamatórios, com consequente ocorrência de lesão tecidual e morte celular, fatores que contribuem para um desequilíbrio no sistema redox e levam ao estresse oxidativo (EO). A presença do EO pode estar ligada ao desenvolvimento das formas mais graves da doença em questão, sendo refletida também nos marcadores laboratoriais e desfechos dos pacientes, portanto a compreensão dos mecanismos fisiopatológicos da Covid-19 pode contribuir para identificação de possíveis marcadores e alvos terapêuticos para a doença. **Objetivo:** Avaliar a influência dos parâmetros clínicos, bioquímicos, inflamatórios e do estado redox em pacientes com Covid-19 de acordo com a gravidade (leve, moderada e grave). **Metodologia:** Foi conduzido um estudo de coorte em pacientes com Covid-19 leve (n=38), moderada (n=39) e grave (n=48), realizando análises bioquímicas e inflamatórias (ureia, creatinina, creatino quinase (CK), lactato desidrogenase, troponina ultrasensível, aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase, Proteína C Reativa, gasometria arterial, ferritina, transferrina, ferro sérico, capacidade total de ligação do ferro, capacidade latente de ligação, saturação da transferrina, leucócitos totais, plaquetas, neutrófilos) e de estresse oxidativo (EO) (Produtos Avançados de Oxidação Proteica (AOPP), Metabólitos do Óxido Nítrico (Nox), Atividade das enzimas Superóxido Dismutase (SOD) e Glutathione Peroxidase) em amostras de soro e hemácias lavadas, além da avaliação dos dados clínicos dos prontuários dos pacientes para determinação de correlações e parâmetros relevantes na severidade da doença. As análises estatísticas dos dados obtidos foram conduzidas utilizando o software SPSS versão 20.0, considerando um nível de significância de $p < 0.05$. **Resultados:** O estudo constatou níveis elevados de glutathione reduzida (GSH) ($p = 0.027$) e níveis reduzidos de glutathione oxidada (GSSG) ($p < 0.001$) nos grupos de Covid-19 moderada e grave quando comparados ao grupo de Covid-19 leve. Idade e índice de massa corporal (IMC) foram identificados como comorbidades significativas no grupo grave. Níveis mais elevados de glicose ($p = 0.007$) e IMC ($p = 0.016$) foram observados no grupo de pacientes que necessitaram de internação em unidade de terapia intensiva (UTI), além dos níveis séricos de sódio ($p = 0.020$) se mostrarem aumentados e a saturação de oxigênio ($p < 0.001$) reduzida em pacientes graves. Correlações foram encontradas entre os parâmetros de GSH e ferritina ($p = 0.047$); NOx e leucócitos totais ($p = 0.038$), ureia ($p < 0.001$), creatinina ($p = 0.003$), troponina ($p = 0.033$); AOPP e leucócitos totais ($p = 0.020$); SOD e CK ($p = 0.049$). **Conclusão:** Pacientes com Covid-19 nos estágios moderado e grave podem apresentar alterações nos marcadores de EO com aumento de glutathione reduzida e redução da glutathione oxidada em relação aos pacientes no estágio leve, assim, a manutenção da integridade do sistema redox, juntamente à avaliação dos parâmetros de sódio, glicose, saturação de oxigênio e IMC se apresentam como uma hipótese para auxiliar no prognóstico e tratamento das manifestações mais graves da doença.

Palavras-chave: COVID-19, Severidade da Doença, Covid-19 Grave, Covid-19 Moderada, Inflamação, Estresse Oxidativo

ABSTRACT

OLIVEIRA, Bruno Moraes de. **Evaluation of Biochemical, Inflammatory, and Oxidative Stress Parameters of Patients with Mild, Moderate, and Severe Covid-19.** 2023. 70 pages. Dissertação de Mestrado (Centro de Ciências da Saúde) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2023.

Introduction: Among the various pathophysiological processes of Covid-19, one of the factors contributing to the development of severe cases is the cytokine storm, characterized by the release of pro-inflammatory mediators, leading to tissue damage and cell death. These factors contribute to an imbalance in the body's redox system and result in oxidative stress (OS). The presence of OS has been associated with the development of more severe forms of the disease, which is reflected in the laboratory markers and outcomes of patients. Therefore, understanding the pathophysiological mechanisms of Covid-19 can contribute to the identification of potential markers and therapeutic targets for the disease. **Objective:** To evaluate the influence of biochemical, inflammatory, and redox state biomarkers in patients with Covid-19 across mild, moderate, and severe forms of the disease. **Methodology:** A cohort study was conducted in patients with mild (n=38), moderate (n=39), and severe (n=48) Covid-19, performing biochemical and inflammatory analyses (urea, creatinine, creatine kinase (CK), lactate dehydrogenase, high-sensitivity troponin, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, C-reactive protein, arterial blood gas analysis, ferritin, transferrin, serum iron, total iron-binding capacity, latent iron-binding capacity, transferrin saturation, total leukocytes, platelets, neutrophils) and oxidative stress (OS) markers (Advanced Oxidation Protein Products (AOPP), Nitric Oxide Metabolites (Nox), Superoxide Dismutase (SOD) activity, and Glutathione Peroxidase) in serum and washed red blood cell samples. Clinical data from patient records were also assessed to determine correlations and relevant parameters for disease severity. Statistical analysis of the data was performed using SPSS software version 20.0, considering a significance level of $p < 0.05$. **Results** The study found elevated levels of reduced glutathione (GSH) ($p = 0.027$) and reduced levels of oxidized glutathione (GSSG) ($p < 0.001$) in the moderate and severe Covid-19 groups when compared to the mild Covid-19 group. Age and body mass index (BMI) were identified as significant comorbidities in the severe group. Higher levels of glucose ($p = 0.007$) and BMI ($p = 0.016$) were observed in the group of patients requiring intensive care unit (ICU) admission, along with increased serum sodium levels ($p = 0.020$) and reduced oxygen saturation ($p < 0.001$) in severe patients. Correlations were found between GSH and ferritin levels ($p = 0.047$); NOx and total leukocytes ($p = 0.038$), urea ($p < 0.001$), creatinine ($p = 0.003$), troponin ($p = 0.033$); AOPP and total leukocytes ($p = 0.020$); SOD and CK ($p = 0.049$). **Conclusion:** Patients with moderate and severe Covid-19 may show alterations in oxidative stress (OS) markers, with an increase in reduced glutathione and a reduction in oxidized glutathione compared to patients in the mild stage. Therefore, maintaining the integrity of the redox system, along with evaluating parameters such as sodium, glucose, oxygen saturation, and BMI, emerges as a hypothesis to aid in the prognosis and treatment of the more severe manifestations of the disease.

Key-words: COVID-19, Severity of Illness, Severe Covid-19, Moderate Covid-19, Inflammation, Oxidative Stress

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Difusão da Covid-19 no estado do Paraná de 12/03/2020 a 12/04/2020	19
Figura 2 – Estrutura do SARS-CoV-2	20
Figura 3 – Entrada do SARS-CoV-2 através de receptores da ECA2	22
Figura 4 – Resposta Inflamatória na Covid-19	24
Figura 5 – Vias de formação de Espécies Reativas de Oxigênio/Nitrogênio e atuação do Sistema Antioxidante.....	27
Figura 6 – Ativação das defesas antioxidantes via Fator Nuclear Eritróide 2 Relacionado ao Fator 2 (NRF2).....	30

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2019n-CoV	Novo Coronavírus 2019
ALT	Alanina Aminotransferase
AOPP	Produtos Avançados de Oxidação Protéica
AST	Aspartato Aminotransferase
BR	Brasil
CCCPD	Centro Chinês de Controle e Prevenção de Doenças
CK	Creatino Quinase
COE-nCoV	Centro de Operações de Emergência em Saúde Pública para o novo Coronavírus
Covid-19	Doença do Coronavírus 2019
Cu	Cobre
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dsRNA	RNA de fita dupla
ECA2	Enzima Conversora de Angiotensina 2
EO	Estresse Oxidativo
ERNs	Espécies Reativas de Nitrogênio
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
ESPII	Emergência de Saúde Pública de Importância Internacional
Fe	Ferro
GPx	Glutathione Peroxidase
GSH	Glutathione reduzida
GSSG	Glutathione oxidada
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
IFN	Inteferon
IL-10	Interleucina-10
ISG	Interferon- <i>stimulating</i> Genes
Keap-1	Proteína 1 kelch- <i>like</i> associada ao ECH
LAC	Laboratório de Análises Clínicas
LACEN/PR	Laboratório Central do Estado do Paraná
LDH	Lactato Desidrogenase
Ln	Logaritmo Neperiano
MDA5	Proteína 5 Associada Diferenciação de Melanoma

MERS-CoV	<i>Middle-East Respiratory Syndrome Coronavirus</i>
mRNA	RNA mensageiro
MS	Ministério da Saúde
MTV	Meio de Transporte Viral
NK	Célula <i>Natural-Killer</i>
NO	Óxido Nítrico
NO ₂ -	Nitritos
NO ₃ -	Nitratos
NOx	Metabólitos do Óxido Nítrico
NRF2	Fator Nuclear Eritróide 2 Relacionado ao Fator 2
Nsp	Proteínas virais não estruturais
O ₂ -	Ânion Superóxido
OH	Hidróxido
OMS	Organização Mundial da Saúde
ONOO-	Peróxinitrito
ORFs	<i>Open Reading Frames</i>
PCR	Proteína C Reativa
RIG-I	Gene I Induzível pelo Ácido Retinóico
RLR	Receptores Semelhantes ao RIG-I
RNA	Ácido Ribonucleico
RRP	Receptores de Reconhecimento de Padrão
RT-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase – Transcriptase Reversa
SARS-CoV	<i>Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus</i>
SARS-CoV-2	<i>Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2</i>
Se	Selênio
SG	Síndrome Gripal
SOD	Superóxido Dismutase
SRAA	Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona
SRAG	Síndrome Respiratório Aguda Grave
ssRNA	RNA de fita simples
SUS	Sistema Único de Saúde
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TIBC	Capacidade Total de Ligação do Ferro

TLR	Receptores <i>Toll-Like</i>
Trxr	Tiorredoxina Redutase
UEL	Universidade Estadual de Londrina
US	Ultrasensível
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
UV	Ultravioleta
Zn	Zinco

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	DESENVOLVIMENTO	17
2.1	CORONAVÍRUS (Covid-19)	17
2.1.1	Início da Covid-19 no estado do Paraná e na cidade de Londrina	18
2.1.2	SARS-CoV-2.....	20
2.1.3	Fisiopatologia da Covid-19	21
2.1.4	Marcadores Inflamatórios e Covid-19.....	24
2.2	ESTRESSE OXIDATIVO	25
2.2.1	Estresse Oxidativo e Covid-19	29
3	JUSTIFICATIVA	32
4	OBJETIVOS	33
5	METODOLOGIA	34
6	RESULTADOS	38
7	CONCLUSÃO	61
8	CONSIDERAÇÕES FINAIS	62
	REFERÊNCIAS	63
	ANEXOS	70
	ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa.....	71

1 INTRODUÇÃO

Os primeiros relatos sobre uma síndrome respiratória aguda de etiologia desconhecida na cidade de Wuhan, localizada na província de Hubei (China), ocorreram em dezembro de 2019. O patógeno identificado pelas autoridades sanitárias do país como um novo coronavírus, *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2* (SARS-CoV-2), é o causador da Doença do Coronavírus 2019 (Covid-19) (AHN et al., 2020), declarada como Emergência de Saúde Pública de Importância Internacional (ESPII) em 30 de janeiro de 2020 e como pandemia pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em 11 de março de 2020. O número de infecções aumentou rápida e exponencialmente, com mais de 1 milhão de casos em 02/04/2020 e, uma semana depois, superando 1.5 milhão de casos em 184 países (DONG; DU; GARDNER, 2020; JOHNS HOPKINS CENTER FOR COMMUNICATION PROGRAMS, 2020).

Os sintomas típicos da fase inicial da Covid-19 são inespecíficos: febre, tosse, mialgia e fadiga, enquanto dores de cabeça, expectoração e diarreia são menos comuns. Casos severos são transferidos para Unidades de Terapia Intensiva (UTI) e frequentemente necessitam de ventilação artificial, sendo a taxa de mortalidade mundial da doença estimada entre 3.4% e 11%, variando conforme a disponibilidade de testes diagnósticos disponíveis e a taxa de ocupação do sistema de saúde local (RAJGOR et al., 2020). Para o diagnóstico da infecção, foi desenvolvido como padrão ouro o método de Reação em Cadeia da Polimerase – Transcriptase Reversa (RT-PCR) em tempo real a partir de amostras da nasofaringe e das tonsilas coletadas por swab, além dos dados sintomatológicos e epidemiológicos (XU et al., 2020). No Brasil, para vigilância do SARS-CoV-2, foi estabelecida como protocolo a coleta de duas amostras dos pacientes atendidos pela rede pública desde que enquadrados na definição de caso, abrangendo quadro sintomático característico, histórico de viagem em regiões com transmissão direta e histórico de contato com caso suspeito ou confirmado (SAÚDE, 2020).

Doenças respiratórias de origem viral estão, de forma geral, associadas com produção de citocinas, inflamação, morte celular e outros processos fisiopatológicos que podem ser ligados à perda do balanço redox, aumento de produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (EROs/ERNs), radicais livres e consumo dos mecanismos antioxidantes do sistema biológico. Esse estado de desequilíbrio é denominado Estresse Oxidativo (EO) e proporciona condições favoráveis para a replicação viral e evolução desse tipo de doenças (ADAMS; FRANCO; ESTEVEZ, 2015; DELGADO-ROCHE; MESTA, 2020; SCHIEBER; CHANDEL, 2014).

As condições relacionadas ao sistema redox e EO podem ser demonstradas por diversos marcadores, geralmente produtos das reações de oxidação, como produtos avançados de oxidação protéica (AOPP) e metabólitos do óxido nítrico (NOx), assim como pode-se avaliar a atividade de enzimas antioxidantes, como Superóxido Dismutase (SOD) e o sistema Glutationa Peroxidase (GPx). A utilização de diferentes biomarcadores é importante para a compreensão dos impactos do EO como um todo: tanto da extensão das lesões por oxidação quanto da integridade das defesas antioxidantes. Os AOPP, por exemplo, são derivados da oxidação de moléculas como albumina, fibrinogênio e lipoproteínas (PIWOWAR, 2010), já os NOx estão ligados principalmente à distúrbios e ocorrências vasculares (PITOCCO, 2010). O sistema GPx juntamente com a SOD faz parte da primeira linha de defesa antioxidante do organismo, sendo composto basicamente pela glutathione reduzida (GSH) e pela glutathione oxidada (GSSG), atuando principalmente nos casos de EO agudo (Yang 2015), metabolizando espécies reativas importantes como o ânion superóxido (O_2^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A família das enzimas SOD é a única que consegue reduzir especificamente a circulação de O_2^- (LEI, 2015).

No contexto da Covid-19, um dos principais fatores para o desenvolvimento da forma grave da doença é a ocorrência da tempestade de citocinas, processo que pode levar à disfunção de múltiplos órgãos. Um elemento importante é a ativação do inflamassoma, que tem as EROs como ligantes e mediadoras, podendo fazer a função de gatilho e estimulação pró-inflamatória (MEHTA et al., 2020; MURALIDHARAN; MANDREKAR, 2013). Apesar das possibilidades de complicação, a maioria dos pacientes progride com bom prognóstico, considerando que fatores como idade e presença ou não de comorbidades são importantes para o desenvolvimento da forma grave da Covid-19. Para esses casos, especialmente em ambiente hospitalar, exames laboratoriais são ferramentas essenciais para diagnóstico, monitoramento e prognóstico da doença. Alguns biomarcadores são avaliados tipicamente nos pacientes com Covid-19, como nos exames de Proteína C Reativa (PCR), Alanina Aminotransferase (ALT), Aspartato Aminotransferase (AST), Lactato Desidrogenase (LDH), Creatina Quinase (CK), Ureia, Creatinina, Troponina e Gasometria Arterial (CHAPMAN; BULARGA; MILLS, 2020; GUO et al., 2020a, 2020b; HENRY et al., 2020; POGGIALI et al., 2020). Alterações nesses exames laboratoriais são relevantes no acompanhamento da evolução da infecção e refletem a severidade do quadro dos pacientes, podendo ajudar na classificação entre o estado leve, moderado ou grave, além de orientar possíveis intervenções (WANG et al., 2020).

Portanto, esse estudo é justificado pela necessidade de compreensão dos mecanismos fisiopatológicos da Covid-19, que podem servir como marcadores e alvos

terapêuticos para controle dos variados graus de severidade da doença, além da ausência de estudos que avaliem a influência da associação do EO com outros fatores clínicos e laboratoriais na gravidade da Covid-19.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 DOENÇA DO CORONAVÍRUS 2019 (COVID-19)

Os coronavírus compõem um grupo viral que infecta diversos tipos de animais, incluindo seres humanos, podendo causar infecções respiratórias de grau variável. Em 2002 e 2012, *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus* (SARS-CoV) e *Middle-East Respiratory Syndrome Coronavirus* (MERS-CoV), respectivamente, causaram síndromes respiratórias agudas fatais, sendo tratadas como problemas de saúde pública do século XXI (CUI; LI; SHI, 2019). Em 2019, a partir de investigações epidemiológicas e etiológicas, em 3 de janeiro uma equipe do Centro Chinês de Controle e Prevenção de Doenças (CCCPD) conseguiu sequenciar pela primeira vez o genoma de um novo betacoronavírus, sendo batizado como novo coronavírus 2019 (2019n-CoV), e posteriormente de SARS-CoV-2, que apresenta características típicas da família dos betacoronavírus, sendo um ácido ribonucléico (RNA) vírus envelopado de fita simples com sentido positivo (TAN et al., 2020; NASAB et al., 2023).

O patógeno propagou-se rapidamente pela China e, ao final do mês de janeiro de 2020, havia o registro de 7,7 mil casos confirmados e 170 óbitos no país, além de 98 casos em outros 18 países (SAÚDE, 2020). Graças à sua grande capacidade de transmissão, a doença do coronavírus 2019 (Covid-19), rapidamente superou as antecessoras SARS e MERS em número de pessoas infectadas e área de epidemia, recebendo o *status* de pandemia pela Organização Mundial da Saúde (OMS) no dia 11 de março de 2020, representando um grande desafio aos sistemas de saúde pública ao redor do mundo (HU, 2020; WHO, 2020).

Com a notificação do primeiro possível caso (com posterior resultado negativo) no Brasil em 22 de janeiro de 2020, foi ativado o Centro de Operações de Emergências em Saúde Pública para o novo Coronavírus (COE-nCoV), responsável por desenvolver dentro do Ministério da Saúde (MS) o Plano de Contingência Nacional para Infecção Humana pelo novo Coronavírus para controlar a infecção e reduzir o surgimento de casos graves e óbitos causados Covid-19. Devido à falta de informações sobre a nova doença, as primeiras orientações de vigilância epidemiológica e manejo dos pacientes se basearam nas ações já existentes e padronizadas para Síndrome Respiratória Aguda Grave (SRAG) e Síndrome Gripal (SG), bem como nos conhecimentos acumulados sobre o SARS-CoV, MERS-CoV e SARS-CoV-2, ainda que nenhum caso houvesse ocorrido em território nacional (SAÚDE, 2020). O primeiro caso no Brasil confirmado pelo MS deu-se no dia 25 de fevereiro de 2020, na cidade de São Paulo, principal ponto de conexão do Brasil com o exterior. Esse

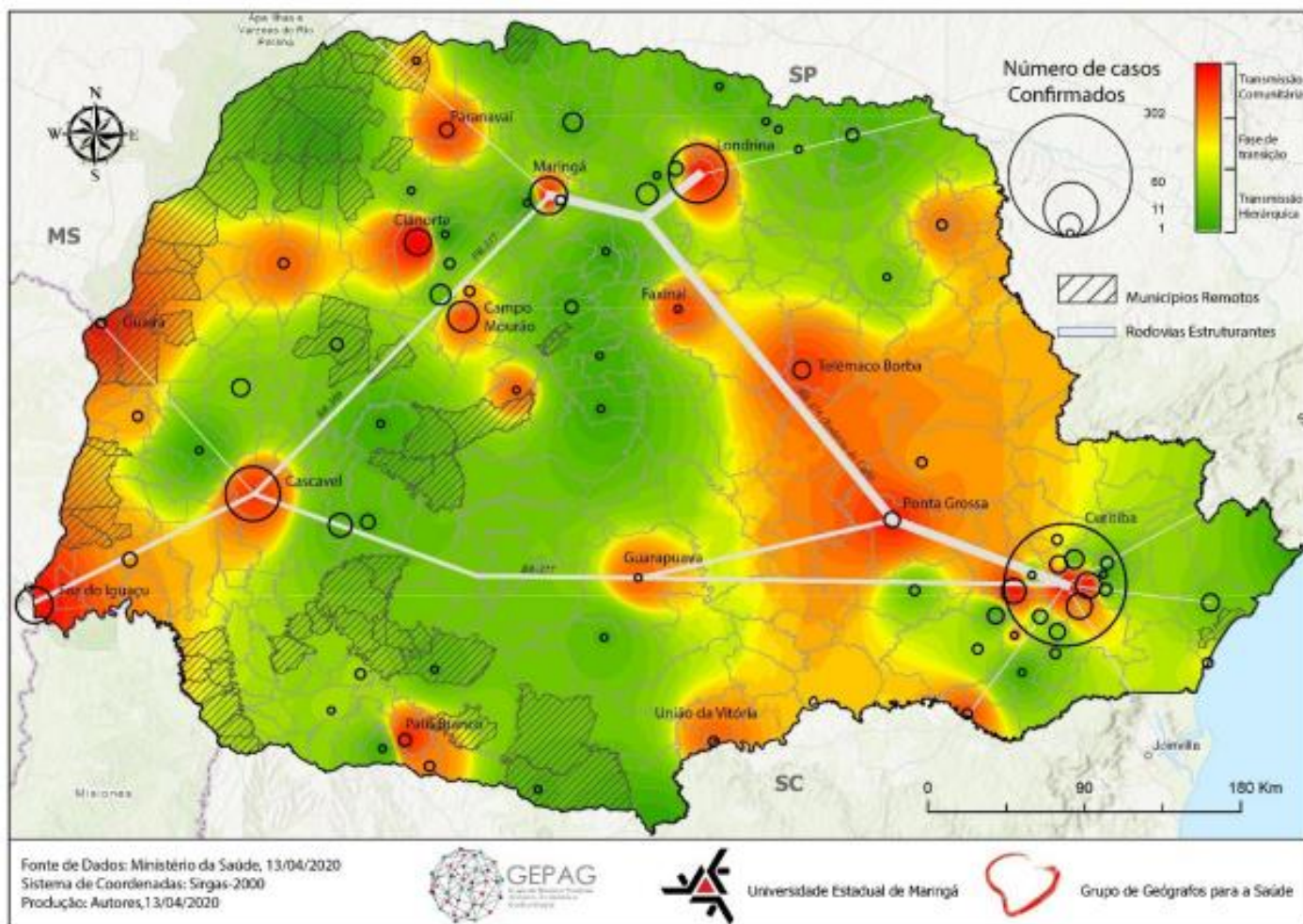
também foi o primeiro caso de Covid-19 na América do Sul com uma população superior a 640 milhões de habitantes (MARTINUCI et al., 2020).

2.1.1 Início da Covid-19 no estado do Paraná e na cidade de Londrina

Dezessete dias depois do primeiro caso registrado no Brasil, o estado do Paraná registrou seus primeiros casos simultaneamente nas cidades de Curitiba e Cianorte com origem da infecção também no exterior, uma vez que os aeroportos fizeram com que as cidades de grande e médio porte fossem a porta de entrada para o vírus nas cidades do interior, antecipando a chegada da transmissão comunitária do vírus. Conforme observado na Figura 1, no primeiro mês o maior foco de casos ocorreu na cidade de Curitiba, indicando transmissão comunitária do vírus inclusive em sua região metropolitana, ou seja, já não havia apenas transmissão hierárquica (importação de outros países ou estados). Também foi possível verificar altas taxas de contaminação comunitária ao longo da rodovia BR-376, a “Rodovia do Café”, que liga a Região Metropolitana de Curitiba ao norte do Paraná, especificamente à Londrina e Maringá, as duas maiores cidades do interior do estado, com 570 mil e 423 mil habitantes, respectivamente (MARTINUCI et al., 2020).

Por fim, no primeiro mês foi possível indicar três áreas de importante interesse epidemiológico, sendo elas: 1) áreas de “transmissão hierárquica” (tons de verde), onde havia pouco registro de casos, ou estes ainda eram muito recentes, podendo importar novas infecções de outras localidades; 2) áreas de “transmissão comunitária” (vermelhas), onde o vírus circulava entre a população local, e; 3) áreas em “fase de transição” (amarelas e laranjas), correspondentes às áreas com municípios que registraram o primeiro caso recentemente, ou que eram vizinhas a outros municípios em estágios mais avançados de contaminação (MARTINUCI et al., 2020).

Figura 1 – Difusão da Covid-19 no estado do Paraná de 12/03/2020 a 12/04/2020



Fonte: MARTINUCI (2020 p.256)

O primeiro caso da doença na cidade de Londrina foi confirmado no dia 18 de março de 2020 em paciente vindo de viagem internacional, sendo ponto de partida para algumas medidas conjuntas de enfrentamento instituídas pela Prefeitura Municipal de Londrina e pelo Governo do Estado do Paraná, com o objetivo de conter a propagação do vírus ainda no estágio inicial. Uma das medidas foi a suspensão de atividades não essenciais e manutenção apenas de serviços essenciais (tais como serviços de saúde, saneamento e mercado), que vigorou entre 22 de março a 19 de abril do mesmo ano. Outras duas medidas que se destacam foram o fechamento dos espaços públicos (3 de abril de 2020) e a obrigatoriedade do uso de máscaras fora de casa (9 de abril de 2020), entrando em vigor no momento em que a cidade atingiu a marca de 76 pessoas infectadas (SUSUKI et al., 2021).

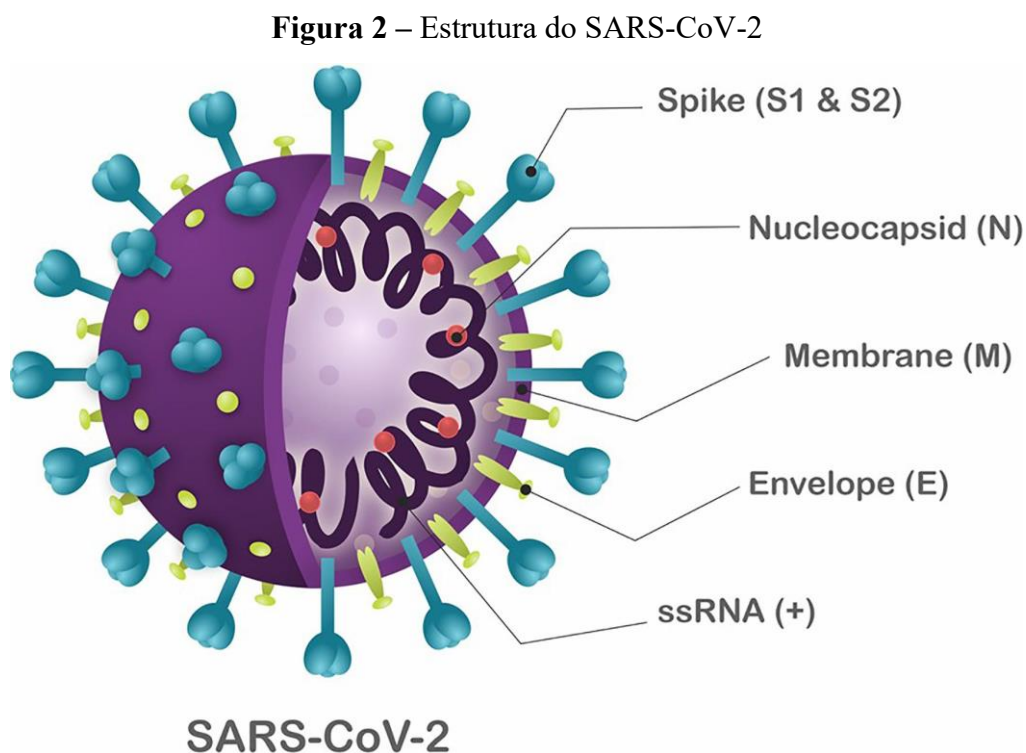
Com a evolução da pandemia na cidade, em junho foi realizada a ampliação do atendimento via Sistema Único de Saúde (SUS): de 38 leitos de Unidades de Terapia

Intensiva (UTI) adultos disponíveis, a capacidade total passou para 116, por meio de recursos estaduais, contratos com o setor privado e remanejamento de estruturas, como foi o caso do prédio da nova Maternidade do Hospital da Universidade Estadual de Londrina, que estava construído, mas não inaugurado (SUSUKI et al., 2021).

2.1.2 SARS-CoV-2

O SARS-CoV-2 é o vírus responsável por causar a doença Covid-19, pertence à família dos beta-Coronavírus e tem como característica estrutural ser um RNA vírus envelopado, de fita única e sentido positivo (NASAB, et al. 2023). Até o momento possui algumas variantes, que se diferenciam entre si principalmente em relação à patogenicidade e à gravidade do desenvolvimento da doença, sendo essas cepas denominadas: beta, gama e ômicron (MERAD et al. 2022).

Apesar dessas cepas conseguirem escapar do sistema imune de forma variável, principalmente com o uso de proteínas não estruturais, algumas estruturas comuns entre elas são preservadas, conforme pode ser observado na Figura 2.



Fonte: SANTOS et al. (2020).

Apesar das variações, o genoma completo do vírus possui 29.9 kb, com

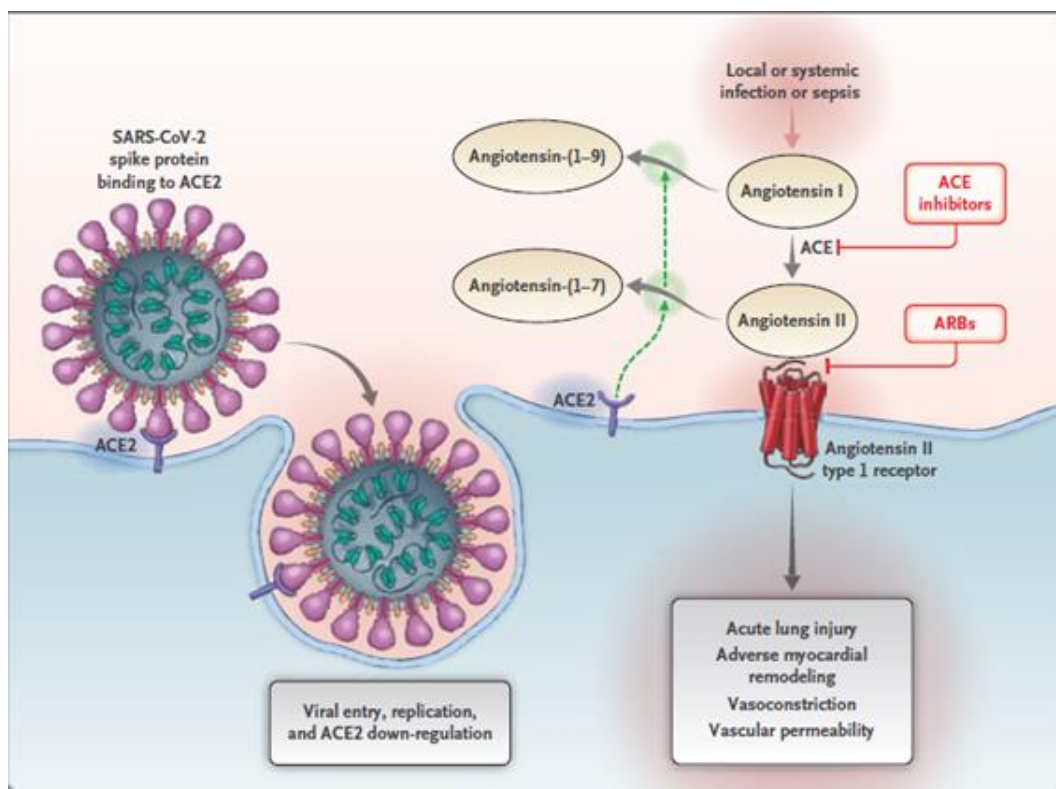
quantidades variáveis de *Open Reading Frames* (ORFs) que podem codificar proteínas estruturais e acessórias, incluindo os 16 tipos de proteínas não estruturais que executam funções diversas, inclusive de escape do sistema imunológico. O restante do genoma codifica as quatro proteínas estruturais essenciais do vírus: espículas (S), envelope (E), matriz (M) e nucleocapsídeo (N), onde cada qual desempenha sua função para a transmissão, proteção e patogenicidade do agente (GUO et al., 2020).

Para a produção de vacinas, por exemplo, a utilização de proteínas estruturais resulta em melhor abrangência para as várias cepas virais, uma vez que são estruturas que se repetem entre as gerações do patógeno. As estruturas mais utilizadas na vacina para prevenção da Covid-19 são as proteínas S e M, além da utilização de frações do ácido ribonucleico mensageiro (mRNA) que codificam a proteína S (CREECH; WALKER; SAMUELS, 2021).

2.1.3 Fisiopatologia da Covid-19

A transmissão do vírus da Covid-19 entre humanos é primariamente mediada por gotículas ou aerossóis gerados a partir da tosse e espirros de pessoas infectadas. Nas fases iniciais da infecção, a entrada do patógeno acontece por meio da inalação dessas partículas, facilitada pela alta expressão da Enzima Conversora de Angiotensina 2 (ECA2) na mucosa da boca e na língua (XU et al., 2020). O SARS-CoV-2 utiliza, assim como seu antecessor SARS-CoV, o receptor da ECA2 para entrada em diversos hospedeiros, como morcegos, porcos, ratos e humanos. Apesar da utilização comum desse receptor, a suscetibilidade à infecção em cada animal depende da eficiência do uso do receptor da ECA2 mediada pelas espículas virais (*spike* ou S) (ZHOU et al., 2020; SHANG et al., 2020). As células secretoras presentes na mucosa nasal humana apresentam significativa expressão do receptor ECA2, sugerindo um tropismo potencial do vírus pelas mesmas e, a partir da ligação do SARS-CoV-2 com as células epiteliais do trato respiratório, inicia-se sua replicação e migração para o epitélio alveolar, tendo um período de incubação em torno de 5 a 6 dias (SUNGNAK et al., 2020; HU, 2020; LI et al., 2020).

Figura 3 – Entrada do SARS-CoV-2 através de receptores da ECA2



Fonte: MENG et al. (2020)

Após a endocitose do vírus, ocorre uma redução da expressão dos receptores da ECA2 na superfície celular e consequente acúmulo de Angiotensina II, um importante vasoconstritor que será responsável pela ativação local do Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (SRAA), causando alterações vasculares, vasoconstrição, lesão aguda local e inflamação (MENG et al., 2020; SUNGNAK et al., 2020; LETELIER et al., 2021). A detecção do SARS-CoV-2 pelo sistema imunológico no meio intracelular acontecerá via receptores de reconhecimento de padrão (RRP) em duas vias de sinalização: A primeira ocorre por receptores *Toll-like* (TLR), como TLR7 no endossomo de células dendríticas, TLR3 em diversas células e TLR8 em células mielóides, que podem reconhecer RNAs endocitados de fita dupla (dsRNA) ou de fita simples (ssRNA) (MERAD et al., 2022; MADDEN; DIAMOND, 2021); A segunda via de sinalização intracelular envolve o reconhecimento viral dentro de células infectadas, sendo o dsRNA reconhecido durante a replicação viral por meio sensores citosólicos de RNA como o Gene I Induzível pelo Ácido Retinóico (RIG-I) e a proteína 5 associada à diferenciação de melanoma (MDA5) (MERAD et al., 2022).

O SARS-CoV-2 tem a habilidade de escapar do reconhecimento do sistema imune e da resposta antiviral por meio do bloqueio das vias de sinalização utilizando proteínas virais não estruturais (Nsp). A Nsp1, por exemplo, realiza o bloqueio da transcrição de proteínas

antivirais atuando sobre a subunidade 40S dos ribossomos e realizando a clivagem de uma fração do mRNA, enquanto a Nsp3 realiza a função de degradar proteínas que sofrem ação de *interferon-stimulating genes* (ISG), suprimindo as vias de sinalização de interferon (IFN) (KASUGA et al., 2021). Por consequência, níveis mais baixos de IFN-I e IFN-III (IFN-11 e 13) são detectados nos pulmões e sangue periférico de pacientes infectados pelo novo coronavírus em relação aos níveis das citocinas em infecções por outros vírus respiratórios (SPOSITO et al., 2021). Apesar disso, a resposta imune inata tem um papel importante na sinalização para as células efetoras mediarem a eliminação do vírus, por exemplo, por meio das células *Natural Killer* (NK) e macrófagos alveolares (MERAD et al., 2022).

Uma das formas da imunidade adaptativa neutralizar o SARS-CoV-2 é através da ligação de anticorpos às espículas virais, impedindo a ligação entre vírus e ECA2, além da ativação de moléculas do Sistema Complemento pelas proteínas virais (PICOLLI et al., 2020). A quantidade e a qualidade da resposta mediada pelos anticorpos estão ligadas à quantidade de antígenos e à duração da reação no centro germinativo onde a resposta sofre maturação. Essa resposta pode ser maior em indivíduos que já foram infectados, pré-imunizados e vacinados (WANG et al., 2021). O pico de viremia ocorre 2 a 5 dias após o início dos sintomas, sendo comum em 80% dos pacientes com sintomas leves e restritos ao trato respiratório superior, similares a um resfriado comum, com febre e tosse seca. O quadro geralmente se resolve espontaneamente em um período de 6 a 10 dias (LI et al., 2020; PERICO et al., 2021).

Pela similaridade com o SARS-CoV, a patogênese da pneumonia induzida por SARS-CoV-2 tem duas etapas: a fase viral (onde ocorre a replicação e lesão tecidual mediada pelos vírus) e a fase secundária, que é determinada pela extensão da primeira, onde ocorre o recrutamento de células do sistema imune, causando inflamação local e sistêmica, que pode persistir mesmo após a resolução da infecção (MERAD et al., 2022). O desenvolvimento da doença pulmonar está associado ao aumento da permeabilidade vascular, levando à deposição de microtrombos no local, somado a uma variedade de sintomas sistêmicos que incluem: disfunções olfativas (em metade dos pacientes infectados pelo SARS-CoV-2, mas não ocorre na SARS-CoV), sintomas gastrointestinais, disfunções cardíacas, hepatobiliares e renais (PERICO et al., 2021).

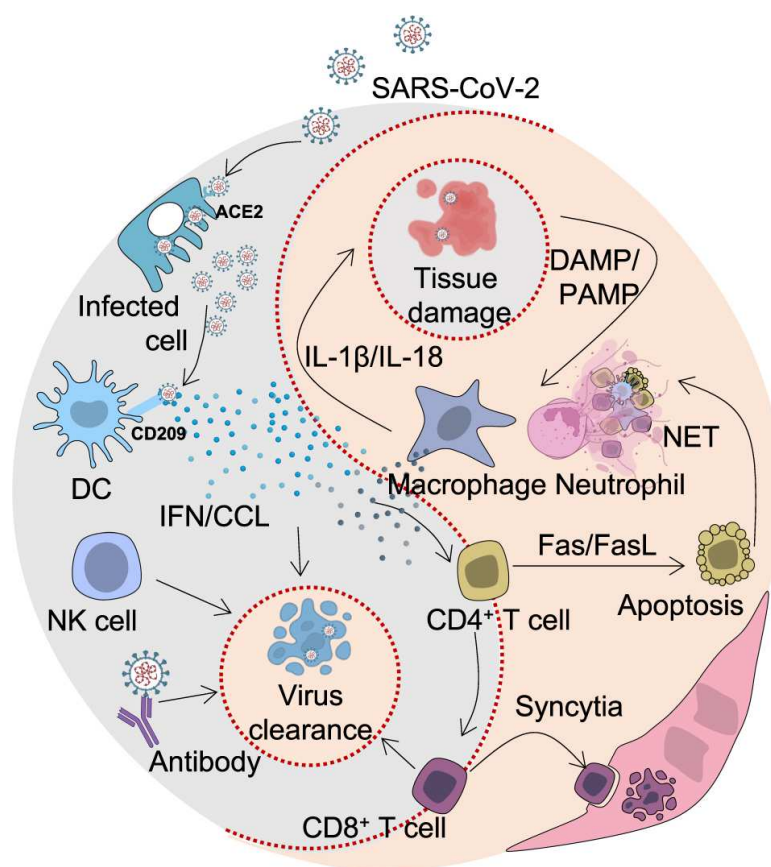
Por fim, as manifestações extra-pulmonares são multifatoriais, como resultado da lesão viral em tecidos, vasos e neurônios, assim como a liberação de citocinas, lesão por autoanticorpos induzidos e pela disbiose intestinal (MERAD et al., 2022). A severidade dessas manifestações, bem como o curso da doença, pode variar de acordo com a

pré-existência de comorbidades como diabetes, hipertensão e doença coronariana, além de doenças agudas hepáticas, renais e demais doenças crônicas. Em conjunto às pré-existentes, é necessário considerar também o desenvolvimento de novas comorbidades durante a infecção: distúrbios renais, cardíacos e hepáticos são os mais relatados (WOLFF et al., 2021).

2.1.4 Marcadores inflamatórios e Covid-19

Diversas evidências sugerem que a resposta inflamatória tem um papel crítico na progressão da Covid-19, a ativação de diversas vias de inflamação durante o período de infecção viral é relevante, uma vez que muitos pacientes possuem comorbidades e já apresentam condições de inflamação prévias, podendo apresentar maior severidade da doença a partir da formação da tempestade de citocinas. O acompanhamento dessas condições é importante para buscar o melhor manejo dos pacientes (MEHTA et al., 2020; XU et al. 2020b; LI, et al., 2022).

Figura 4 – Resposta Inflamatória na Covid-19



Fonte: LI, et al. (2022)

Nesse contexto, os exames laboratoriais são ferramentas úteis para a tomada

de decisão das equipes de saúde, uma vez que a doença pode variar em apresentação desde a forma assintomática, passando por sintomas leves, moderados e graves, até chegar nos casos de pneumonia (DONG et al., 2020b).

A ferritina é um marcador inflamatório de fase aguda importante no contexto laboratorial, possuindo o papel de limitar o fornecimento do ferro para patógenos e estimular a síntese de citocinas anti-inflamatórias e antivirais como interleucina-10 (IL-10) por células CD4⁺ e INF- γ por células T CD8⁺ (KERNAN; CARCILLO, 2017; GRAY et al., 2002). O marcador vem sendo relacionado com a severidade da Covid-19, uma vez que pode auxiliar na modulação da intensidade da resposta inflamatória (ZENG et al., 2020, YANG et al., 2020). Outro resultado comum nos pacientes infectados pelo SARS-CoV-2 são quadros de linfopenia acompanhados do aumento de citocinas pró-inflamatórias, como as IL-6 e IL-2, que são marcadores incomuns na rotina hospitalar (LIU et al., 2020, LETELIER et al., 2021).

A Proteína C Reativa (PCR) é uma proteína de fase aguda positiva sintetizada predominantemente pelo fígado, respondendo às situações de inflamação e infecção. É outro marcador comumente utilizado no ambiente hospitalar e que se mostrou promissor no acompanhamento da infecção por SARS-CoV-2. É um marcador inflamatório importante pelo seu comportamento já consolidado, apresentando níveis basais constantes em condições normais e aumentando subitamente sua concentração plasmática durante casos de inflamação aguda, sendo ainda mais preciso em casos de sepse. Também tem uma contribuição importante na ativação da resposta inflamatória via ativação de citocinas, como a interleucina-6 (IL-6) (ASGHAR et al., 2020). No contexto da Covid-19 apresenta correlação positiva com os estágios da infecção e com a extensão de lesão pulmonar (HANIF et al., 2020).

2.2 ESTRESSE OXIDATIVO

Estresse oxidativo é o resultado do desequilíbrio entre agentes oxidantes e antioxidantes no sistema biológico, com aumento excessivo de espécies reativas de oxigênio/nitrogênio (EROs/ERNs) e radicais livres em um cenário com defesas antioxidantes e mecanismos de tamponamento do organismo insuficientes, acarretando a falha da manutenção do equilíbrio redox (MUKHERJEE et al., 2015). EROs, ERNs e radicais livres são gerados naturalmente pelo organismo em quantidades controladas, sendo essenciais para diversas funções, como a manutenção da homeostase, expressão de genes, ativação de receptores, reconhecimento e eliminação de patógenos (ex. fagocitose realizada por macrófagos e neutrófilos), controle da viabilidade, proliferação, migração e diferenciação celular (HUSSAIN

et al., 2016; PISOSCHI et al., 2020; ADWAS et al., 2019).

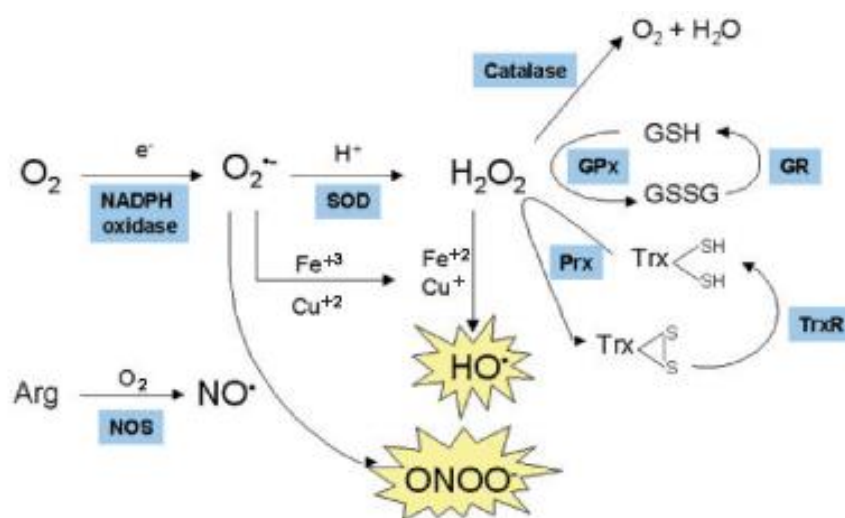
As EROs e ERNs mais prevalentes no organismo são o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ânion superóxido (O_2^-), hidróxido (OH), óxido nítrico (NO) e peroxinitrito (ONOO^-). Várias dessas espécies reativas têm produção natural dentro dos sistemas biológicos, como o O_2^- , formado pelo complexo enzimático NADPH oxidase, que atua como doador de elétrons para a redução da molécula O_2 em O_2^- através da reação $2\text{O}_2 + \text{NAD(P)H} \rightarrow 2\text{O}_2^- + \text{NAD(P)} + \text{H}^+$. Outras espécies reativas, assim como radicais livres, são geradas naturalmente no metabolismo mitocondrial, uma vez que o O_2 é utilizado como um receptor final de elétrons na cadeia transportadora de elétrons da respiração celular (RABELO et al., 2010, PISOSCHI et al., 2020, ADWAS et al., 2019). A geração de EROs e ERNs pode ocorrer por vias endógenas: mecanismos de inflamação, ativação de células do sistema imune, exercícios intensos, isquemia, estresse mental, neoplasias e o próprio envelhecimento; ou por vias exógenas, dentre elas a exposição à poluição presente em água e ar, doenças infecciosas, consumo de bebidas alcoólicas, tabagismo, drogas de abuso, metais pesados, medicamentos (como Tacrolimus e ciclosporinas), radiação e alguns solventes (como o benzeno) (VALKO et al., 2007, ADWAS et al., 2019).

De forma geral, a produção de EROs pode ocorrer por meio de reações enzimáticas (por macrófagos, por exemplo) e não-enzimáticas (nos processos intermediários de redução das moléculas de oxigênio na cadeia respiratória). A reação global é representada pela redução do O_2 em água ($\text{O}_2 + 4\text{e}^- + 4\text{H}^+ \rightarrow 2\text{H}_2\text{O}$), porém com reações intermediárias que geram essas espécies reativas (CHEIGNON et al., 2018). A redução parcial da molécula de O_2 resulta na produção de espécies como O_2^- , H_2O_2 e HO , que são espécies intermediárias perigosas, uma vez que são altamente reativas e de difícil controle, podendo ser precursoras de outras espécies reativas igualmente incontroláveis, como o O_2^- e NO , resultando em ONOO^- (PISOSCHI et al., 2020, CHEIGNON et al., 2018). Ataques contínuos por EROs acarretam danos à membrana celular, perda de função bioquímica de proteínas, mutações no ácido desoxirribonucleico (DNA), erros de replicação celular, alterações na estabilidade do genoma e, conseqüentemente, morte celular (MOLAYI-JABDARAGI; ESMAEILNEJAD; MOHAMMADI, 2020). As conseqüências dos danos oxidativos, como produtos de degradação de biomoléculas essenciais, representam marcadores reconhecidos de EO (MUKHERJEE et al., 2015).

Na Figura 5 podemos observar o esquema de algumas das reações de formação de EROs, ERNs e espécies radicalares mediadas por enzimas (em azul), ao mesmo tempo em que é representada a atuação de enzimas antioxidantes para formação de compostos

mais estáveis e, conseqüentemente, menos reativos. As principais enzimas envolvidas nos processos antioxidantes aqui representadas são a Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT), Glutathiona Peroxidase (GPx) e Tiorredoxina Redutase (TrxR). Em prol da formação de espécies reativas podemos citar a NADPH oxidase e a NO sintase, além da presença de metais como ferro (Fe) e cobre (Cu) (BARBOSA; MEDEIROS; AUGUSTO, 2006).

Figura 5 – Vias de formação de Espécies Reativas de Oxigênio/Nitrogênio e atuação do Sistema Antioxidante



Fonte: BARBOSA; MEDEIROS; AUGUSTO (2006)

De forma a proteger e manter a integridade do funcionamento das estruturas celulares, o organismo dispõe de sistemas enzimáticos e não-enzimáticos cuja função é a neutralização dos radicais livres. Uma molécula antioxidante tem a capacidade de impedir ou retardar a oxidação de macromoléculas, sendo muitas vezes agentes redutores como polifenóis e tióis (LUO et al., 2020, ADWAS et al., 2019). Os antioxidantes podem ser classificados em primários e secundários, de acordo com sua atuação: os interruptores de cadeia são chamados antioxidantes primários, uma vez que agem sequestrando espécies radicalares, convertendo-as em espécies mais estáveis ou não radicalares e retardando a iniciação ou propagação do dano oxidativo. Os antioxidantes secundários realizam essa função protetora decompondo peróxidos em espécies não radicalares, sequestrando oxigênios singlete, quelando íons metálicos oxidantes, inibindo enzimas pró-oxidantes e absorvendo a radiação ultravioleta (UV). Estes antioxidantes podem exibir efeito sinérgico ao auxiliar na regeneração dos antioxidantes primários por meio da doação de hidrogênios, quelação de metais e extinção do oxigênio molecular (PISOSCHI; POP, 2015).

Além dessa classificação, também podemos dividir os antioxidantes em

quatro linhas de defesa, conforme suas reações frente ao EO. A primeira linha de defesa é composta por antioxidantes que suprimem a formação de espécies radicalares. Nessa categoria temos as enzimas GPx, SOD e algumas proteínas com capacidade de ligarem-se à metais, como a ferritina e ceruloplasmina. O funcionamento dessas enzimas antioxidantes é dependente de metais como selênio (Se), Cu, Fe e zinco (Zn), de forma que a deficiência desses micronutrientes pode ser uma via para facilitar um desequilíbrio em favor do EO (PISOSCHI et al., 2020, LAURIDSEN, 2019, CHEIGNON et al., 2018).

Na segunda linha de defesa encontramos substâncias que impedem o início da cadeia de reação ou a propagação da reação já iniciada por meio da doação de elétrons, contando com antioxidantes hidrofílicos (ácido ascórbico, ácido úrico, albumina, glutathione) e lipofílicos (alfa-tocoferol). A terceira linha atua após a ocorrência de lesão, são enzimas que reparam os danos e auxiliam a decompor e remover lipídios, proteínas e DNA oxidados, retirando-os de circulação e evitando seu acúmulo. Os exemplos mais comuns desse grupo são as polimerases e proteases. Por fim, a última linha de defesa explora os mecanismos de adaptação, utilizando a sinalização que levaria à geração de radicais livres para prevenir ou responder à produção dos mesmos, induzindo a síntese e transporte de antioxidantes adequados para o local da sinalização (PISOSCHI et al., 2020).

No meio biológico as EROs, ERNs e radicais livres são moléculas muito reativas e de meia vida curta, o que dificulta o uso direto como biomarcadores. A técnica de AOPP, por exemplo, avalia a oxidação de proteínas, que acarreta a formação de produtos permanentes, com variação de estruturas, funções e propriedades físico-químicas (LIU et al., 2011). Esses produtos derivam da oxidação de proteínas como albumina, fibrinogênio, glicoproteínas, lipoproteínas e globulinas, também podendo refletir o estado inflamatório do paciente (ŚCISKALSKA et al., 2014, SELMECI, 2011). No caso dos NOx, importantes especialmente à nível endotelial, os metabólitos mais estáveis são nitritos (NO₂-) e nitratos (NO₃-), uma vez que o NO em si tem uma meia-vida curta e está em baixas concentrações nos fluidos biológicos, o que o torna difícil de ser medido por métodos diretos (PITOCCO et al., 2010, CHANG et al., 2021).

Para completar a avaliação do estado redox, parâmetros antioxidantes são fundamentais para entender a resposta do sistema aos desafios impostos pela geração de EROs e ERNs. É possível obter essas informações a partir da análise da presença de substâncias antioxidantes como a glutathione, que tem ação importante contra inflamação crônica e lesões oxidativas (BALLATORI et al., 2009, DEROUICHE, 2020) e da avaliação da atividade de enzimas como a GPx, que realizam a decomposição de peróxidos. Essas enzimas têm papel

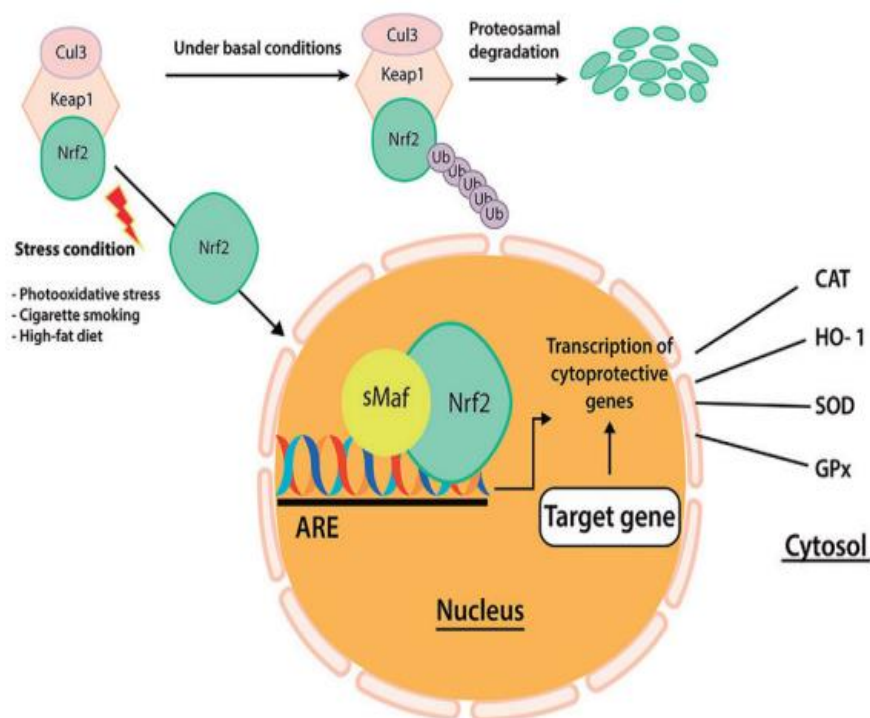
importante também para complementar a atuação da SOD, que diminui a quantidade de moléculas O_2^- circulantes a partir da transformação das mesmas em O_2 e H_2O_2 (LEI et al. 2015).

A relação entre a presença de EO e inflamação vem sendo um tópico abordado por diversos autores, uma vez que evidências apontam para um papel patogênico do EO em doenças inflamatórias crônicas, e que os produtos das lesões por oxidação, tais como proteínas oxidadas e hidroperóxidos lipídicos, podem ser reconhecidos como sinais inflamatórios sistêmicos, estimulando lesão, inflamação e morte celular em tecidos diversos (HUSSAIN et al., 2016; POPA-WAGNER et al., 2013). A inflamação é um mecanismo de defesa natural contra patógenos e está associada com diversas patologias, como infecções virais e bacterianas, exposição à alérgenos, radiação ou agentes químicos tóxicos, além de doenças autoimunes e crônicas, como obesidade, etilismo, tabagismo e dietas hipercalóricas. Assim, diversas doenças ligadas ao aumento de produção de EROs resultam no desequilíbrio redox (HUSSAIN et al., 2016).

2.2.1 Estresse Oxidativo e Covid-19

Vias metabólicas, imunológicas e de EO são ativadas durante a infecção pelo SARS-CoV-2 em diversos graus, sendo a inflamação exacerbada um quadro típico e considerado como um preditor de mortalidade intra-hospitalar (FU et al., 2020). A interação viral com a ECA2 ocasiona o comprometimento do sistema renina-angiotensina, que atua sobre o funcionamento de órgãos vitais, como os pulmões (GOYAL et al., 2020). Com as condições da infecção, observa-se um aumento dos neutrófilos nos capilares pulmonares, além da liberação de citocinas inflamatórias e de formação de EROs. A exposição a essas espécies causa a translocação do Fator Nuclear Eritróide 2 Relacionado ao Fator 2 (NRF2), que ativa as defesas endógenas antioxidantes com o intuito de restaurar o equilíbrio redox (MCCORD et al., 2020, ZATTI; FERLITO; BRANCO, 2022). A ativação do NRF2 no contexto da Covid-19, tem como objetivo também reduzir a expressão de enzimas de ligação utilizadas pelo vírus, como a ECA2, porém a proteína viral N inibe essa ativação, o que resulta em um aumento da inflamação e do dano oxidativo (MENDONÇA; SOLIMAN, 2020; LAFORGE et al., 2020).

Figura 6 – Ativação das defesas antioxidantes via Fator Nuclear Eritróide 2 Relacionado ao Fator 2 (NRF2)



Fonte: TORRES et al. (2020)

Conforme demonstrado na Figura 6 podemos observar que a NRF2 em condições normais é modulada de forma negativa pela proteína 1 *kelch-like* associada ao ECH (Keap1), que promove a degradação do NRF2 pela via ubiquitina-proteossoma. Em situação de lesão oxidativa associada à uma doença, ocorre a dissociação do complexo Keap1-NRF2, onde o NRF2 é translocado para o núcleo celular e realiza a ligação em regiões promotoras, onde ocorrerá a transcrição de genes citoprotetores, os quais inclui a produção de defesas antioxidantes como SOD, GPx e CAT (TORRES et al., 2020).

A severidade da infecção por SARS-CoV-2 está diretamente ligada à idade do paciente e à intensidade da resposta inflamatória, sendo inversamente proporcional à expressão do NRF2. Em indivíduos jovens e saudáveis a ativação do sistema antioxidante é mais robusta e evita danos irreversíveis nas células do organismo, diferente do observado em pacientes idosos ou com comorbidades que ocasionam um quadro de inflamação crônica, uma vez que nestes a resposta via NRF2 pode não ser suficiente para interromper os eventos do EO, além de não ter eficiência na recuperação e reparo dos tecidos após o processo inflamatório (LIU et al., 2020, MCCORD et al., 2020). A diminuição da expressão do gene *Nrf2* induz a ocorrência de EO no contexto da Covid-19, além de estimular a atividade de proteases, o que

leva à clivagem de hemaglutininas e, por consequência, uma maior facilidade de entrada do patógeno (MCCORD et al., 2020, KESIC et al., 2011).

Além da entrada viral, a ECA2 tem papel importante na regulação do balanço redox, catalisando a conversão do peptídeo vasoconstritor angiotensina II em angiotensina 1-7, um potente vasodilatador. A diminuição da expressão dessa enzima, que ocorre pelo novo coronavírus, permite a ligação sem regulação da angiotensina II aos receptores de angiotensina II tipo 1, levando à ativação da NADPH oxidase e consequente aumento da produção de EROs (VERDECCHIA et al., 2020). Apesar da contribuição do EO ser explorada em diversas doenças virais, no caso da Covid-19 é importante uma maior atenção, uma vez que pode estar relacionado ao desarranjo da resposta imunológica que leva ao ciclo letal de EO, inflamação e lesão tecidual pulmonar (SHARIF-ASKARI et al., 2021).

3 JUSTIFICATIVA

Levando-se em conta a amplitude de severidade da Covid-19, é necessária uma melhor compreensão de seus mecanismos fisiopatológicos, de forma a identificar e consolidar marcadores e alvos terapêuticos para atender as demandas da população e dos sistemas de saúde ao redor do mundo. A presença de EO é uma condição constatada em diversas doenças virais e tem sido valorizada na infecção pelo SARS-CoV-2, uma vez que pode estar ligada ao desenvolvimento de casos graves e à mortalidade da doença, bem como marcadores bioquímicos e inflamatórios podem ser ferramentas importantes para o diagnóstico, prognóstico e manejo de pacientes com Covid-19 em diversos graus.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Analisar os níveis de biomarcadores bioquímicos, inflamatórios e do estado redox em pacientes com Covid-19 em suas formas leve, moderada e grave.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Realizar a determinação dos parâmetros bioquímicos e inflamatórios: ureia, creatinina, CK, LDH, troponina US, AST, ALT, PCR, gasometria arterial, ferritina, transferrina e parâmetros associados (ferro sérico, TIBC, capacidade latente de ligação e saturação da transferrina), leucócitos totais, plaquetas e neutrófilos nos pacientes com Covid-19 moderada e graves.

Determinar a atividade das enzimas antioxidantes SOD e GPx nos pacientes com Covid-19 leve, moderada e grave;

Determinar os níveis séricos de metabólitos do NOx e AOPP nos pacientes com Covid-19 leve, moderada e grave;

Correlacionar parâmetros bioquímicos e inflamatórios com parâmetros de EO em pacientes com Covid-19 moderada e grave;

Avaliar a influência da presença de comorbidades e uso de medicamentos na severidade da Covid-19;

Comparar parâmetros bioquímicos, inflamatórios e de EO de pacientes com Covid-19 que precisaram e que não precisaram de internação em UTI.

5 METODOLOGIA

5.1 DELINEAMENTO E AMOSTRAGEM

O estudo realizado foi do tipo coorte, onde foram coletadas amostras por conveniência de 125 participantes, organizados em três grupos: 1) Covid-19 leve (n=38), 2) Covid-19 moderada (n=39) e 3) Covid-19 grave (n=48) que deram entrada no hospital durante o período de 27/03/2020 a 07/12/2021, classificados conforme preconizado pela OMS (WHO, 2023). Foram incluídos no estudo pacientes de ambos os sexos, com idade superior a 18 anos. Foram excluídos pacientes com outras síndromes gripais (que não apresentaram infecção pelo vírus da Covid-19), doenças infecciosas agudas e ou crônicas e doenças autoimunes. Todos os participantes foram avaliados no início do estudo para obtenção dos dados clínicos, coleta de amostra biológica (respiratória e sangue) e determinação dos indicadores de prognóstico a partir dos dados clínicos. Também foram acessados os prontuários pelo sistema de prontuários digitais *Medview* para determinação dos desfechos de internação.

Após receberem informações detalhadas sobre a finalidade do estudo e procedimentos aos quais seriam submetidos, os participantes selecionados ou os familiares responsáveis assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). O projeto que deu origem a este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina (UEL), CAAE: 31656420.0.0000.5231, sendo executados conforme o parecer do comitê (Anexo 1).

5.2 COLETA DE MATERIAIS BIOLÓGICOS

Foram coletados 16mL de sangue por punção venosa e arterial de todos os voluntários: 6 mL de sangue em tubos com vácuo (VACUETTE®) contendo EDTA para a realização dos parâmetros ligados ao hemograma (leucócitos totais, neutrófilos e plaquetas), determinação das atividades enzimáticas da SOD e GPx; 3mL de sangue arterial em tubos com vácuo (VACUETTE®) contendo heparina para a realização do exame de gasometria e 7mL de sangue em tubos com vácuo (VACUETTE®) sem anticoagulante para a realização dos marcadores bioquímicos e inflamatórios (ureia, creatinina, CK, LDH, troponina US, AST, ALT, PCR, ferritina, transferrina, ferro sérico, TIBC, capacidade latente de ligação, saturação da transferrina) e de EO (AOPP e NOx).

As amostras de material respiratório foram coletadas utilizando três *swab* de Rayon

estéreis, seguindo procedimento padronizado: introduzido o *swab* na cavidade nasal (cerca de 5cm, direcionado para cima, na direção dos olhos) foram realizados movimentos circulares, pressionando-o contra a parede lateral do nariz (em direção à orelha do paciente). Em seguida foi armazenado em tubo contendo Meio de Transporte Viral (MTV – rosa), conforme preconizado pelo Laboratório Central do Estado do Paraná (LACEN/PR). Foi coletado um *swab* para cada narina. A coleta do *swab* de orofaringe foi realizada com a introdução do *swab* na região posterior da faringe e tonsilas, evitando tocar na língua e posterior armazenamento no mesmo tubo dos outros dois.

5.3 DIAGNÓSTICO DA COVID-19

O diagnóstico da Covid-19 foi feito por meio de RT-PCR multiplex em tempo real, utilizando o RNA viral extraído dos *swabs* coletados como amostra, realizado no Laboratório de Análises Clínicas (LAC) do Hospital Universitário. Para a extração do RNA viral foi utilizado o *Extracta Kit Fast - Viral RNA* (Loccus), para a RT-PCR multiplex em tempo real o *TaqPath™ COVID-19 CE-IVD RT-PCR Kit* (ThermoFisher) e para a extensão e detecção de fluorescência um *QuantStudio™ 6 Flex real-time PCR system* (ThermoFisher). Os dados foram analisados e interpretados via *Applied Biosystems™ COVID-19 Interpretative Software* v. 2.3.

5.4 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E INFLAMATÓRIOS

Os biomarcadores laboratoriais de ureia, creatinina, CK, LDH, troponina US, transferrina, AST, ALT foram realizados no Sistema de Química Clínica *Dimension® EXL 200* (Siemens), utilizando os cartuchos de reagentes Flex®. A PCR foi realizada no equipamento *Architect® c8000* (Abbott), utilizando o reagente *MULTIGENT CRP Vario*. Ferritina foi realizada no *Alinity i analyzer* (Abbott), utilizando o *Alinity i Ferritin Reagent*. A gasometria arterial e parâmetros relacionados (sódio, potássio, lactato, glicose, cálcio iônico) foram realizados no equipamento GEM Premier 3500 (Instrumentation Laboratory), utilizando os reagentes fornecidos pelo fabricante. Os parâmetros hematológicos (leucócitos, neutrófilos e plaquetas) foram realizados no analisador *Yumizen HI500* (Horiba). Todos os procedimentos foram realizados conforme as recomendações dos fabricantes.

5.5 PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO E NITROSATIVO

5.4.1 DETERMINAÇÃO DE METABÓLITOS DO ÓXIDO NÍTRICO (NO_x):

A quantificação de subprodutos de óxido nítrico (NO_x) foi medida através da determinação da concentração de nitritos no soro utilizando o método de Navarro-Gonzales et al. (1998), adaptada para microplaca. O óxido nítrico é um gás muito instável e rapidamente se degrada nos subprodutos nitratos e nitritos que podem ser detectados no soro. O método de detecção baseia-se na redução de nitrato a nitrito, mediada por reações de óxido-redução ocorridas entre o nitrato presente na amostra e o sistema cádmio-cobre dos reagentes, com posterior diazotação e detecção colorimétrica do azocomposto formado pela adição do reagente de Griess. A quantificação de NO_x foi feita em leitora de microplaca marca Perkin Elmer®, modelo EnSpire (Waltham, MA, EUA) sendo as leituras feitas em 540 nm. A concentração de óxido nítrico foi expressa em µM.

5.4.2 DETERMINAÇÃO DOS PRODUTOS AVANÇADOS DE OXIDAÇÃO PROTEICA (AOPP):

As concentrações plasmáticas de AOPP foram determinadas utilizando método colorimétrico segundo Hanasand et al (2012). A reação foi realizada em meio ácido (ácido acético - Labsynth®), e na presença de proteínas oxidadas na amostra ocorre a reação com o iodeto de potássio dos reagentes que absorvem em 340 nm. A leitura da reação foi feita em uma leitora de microplaca marca Perkin Elmer®, modelo EnSpire (Waltham, MA, EUA) no comprimento de onda de 340 nm. A concentração de AOPP foi expressa em µmol/L de equivalente de cloramina T.

5.4.3 DETERMINAÇÃO DA SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD):

A atividade da SOD nos eritrócitos foi determinada usando o método do pirogalol descrita por Marklund e Marklund (1974). A leitura da reação foi realizada em uma leitora de microplacas, marca Perkin Elmer®, modelo EnSpire (Waltham, MA, EUA) no comprimento de onda de 420 nm.

Para o cálculo do resultado foi realizada a dosagem da hemoglobina intraeritrocitária em amostras de sangue total por reação colorimétrica de ponto final, o Fe(II) do grupo heme da hemoglobina, oxihemoglobina e carboxihemoglobina foi oxidado ao estado férrico pelo

ferricianeto, formando hemiglobina, que se combinou com cianeto ionizado para produzir cianeto de hemiglobina, o qual foi medido em 540nm. O resultado da dosagem de hemoglobina foi expresso em g/dL.

Ao final, todos os resultados de SOD foram expressos em U/mgHb.

5.4.4 DETERMINAÇÃO DA GLUTATIONA PEROXIDASE (GPx):

A atividade da GPx foi determinada segundo o método descrito por Tietze (1969) e Anderson (1985). Este baseia-se na medida do decréscimo de absorbância promovido durante a oxidação do NADPH, na leitora de microplaca marca Perkin Elmer®, modelo EnSpire (Waltham, MA, EUA) no comprimento de onda de 412 nm a 25°C durante a redução da glutathiona oxidada catalisada pela glutathiona redutase. O cálculo da Glutathiona Oxidada (GSSG) foi realizado pela fórmula $GSSG = (GT - GSH) / 2$.

Para o cálculo do resultado foi realizada a dosagem da hemoglobina intraeritrocitária em amostras de sangue total por reação colorimétrica de ponto final, o Fe(II) do grupo heme da hemoglobina, oxihemoglobina e carboxihemoglobina foi oxidado ao estado férrico pelo ferricianeto, formando hemiglobina, que se combinou com cianeto ionizado para produzir cianeto de hemiglobina, o qual foi medido em 540nm. O resultado da dosagem de hemoglobina foi expresso em g/dL.

Ao final, todos os resultados de glutathiona foram expressos em miliMolar/gHb

5.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados categóricos foram avaliados pelo teste de Qui-quadrado, a homogeneidade dos dados contínuos foi determinada pelo método de Shapiro-Wilk. Dados com distribuição não paramétrica foram transformados em logaritmo natural (Ln). Os grupos de dados paramétricos foram comparados pelo teste de ANOVA com pós-teste de Tukey ou pelo teste T de Student, conforme adequado. Os grupos de dados não paramétricos foram comparados pelo teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn ou pelo teste de Mann-Whitney, conforme adequado. Para estabelecimento de correlações entre dados foi empregado o teste de correlação de Spearman. Foram considerados estatisticamente significativos os dados que apresentaram $p < 0,05$.

As análises foram realizadas utilizando o programa estatístico SPSS versão 20.0.

6 RESULTADOS

Lower Levels of Oxidized Glutathione is Related to Moderate and Severe SARS-CoV-2 Infection

Bruno Moraes de Oliveira^a; Amanda Macena de Lara^b; Tawane Dancini Arduan^b; Andrea Name Colado Simão^c; Danielle Venturini^{a, c}

^a Postgraduate Program in Clinical and Laboratory Pathophysiology, State University of Londrina, Brazil

^b Undergraduate student in Pharmacy, State University of Londrina, Brazil

^c Clinical Analysis Laboratory, State University of Londrina, Brazil

Corresponding author: Bruno Moraes de Oliveira

Address: Avenida Robert Koch, 60.

Telephone: (43) 996850154

Email: br.moraesoliveira@uel.br

ABSTRACT

Aims: Among the various pathophysiological processes of Covid-19, one of the contributing factors to severe cases is the cytokine storm, characterized by the release of pro-inflammatory mediators, factor that contribute to an imbalance in the body's redox system and consequently leading to oxidative stress (OS). This study aimed to evaluate the association of laboratory parameters and OS markers with the development of mild, moderate, and severe degrees of Covid-19, as well as the need of intensive care unit (ICU) admission. **Materials and Methods:** Laboratory tests (total leukocytes, neutrophils, platelets, urea, creatinine, CK, LDH, high-sensitivity troponin, AST, ALT, CRP, arterial blood gas analysis, ferritin, transferrin, serum iron, TIBC, latent iron-binding capacity, transferrin saturation) and oxidative stress (OS) assays (AOPP, NOx and enzymatic activities of SOD and GPx) were performed in the University Hospital in Londrina on properly prepared serum and red blood cell samples from patients with mild (n=38), moderate (n=39), and severe (n=48) Covid-19. Statistical analyses of the obtained data were conducted using SPSS software version 20.0, with a significance level considering $p < 0.05$. **Results:** The study found increased levels of reduced glutathione (GSH) ($p = .027$) and reduced levels of oxidized glutathione (GSSG) ($p < .001$) in the moderate and severe Covid-19 groups. Age and higher Body Mass Index (BMI) were identified as notable risk factors in the severe group. Higher glucose levels ($p = .007$) and BMI ($p = .016$) were observed in the Intensive Care Unit (ICU) group, sodium (Na) and oxygen saturation levels appears to be altered in patients with higher disease severity. **Conclusions:** This study provides

evidence that oxidative stress plays a significant role in Covid-19 infection, highlighting the importance of maintaining redox balance for the prevention and recovery from conditions associated with SARS-CoV-2 infection.

Key-words: Severe Covid-19, Moderate Covid-19, Inflammation, Oxidative Stress, Covid-19

1. Introduction

The first reports about an acute respiratory syndrome of unknown etiology in Wuhan city, located in the Hubei province of China, occurred in December 2019. The pathogen identified by the authorities of the country as a novel coronavirus, baptized as Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2), is the causative agent of the disease Covid-19, declared a pandemic by the World Health Organization (WHO) in March 2020 [1]. Typical symptoms of the early phase of Covid-19 include fever, cough, myalgia, and fatigue, while headache, expectoration, and diarrhea are less common. Severe cases are transferred to Intensive Care Units (ICU) and often require mechanical ventilation, with the global mortality rate of the disease estimated to be between 3.4% and 11%, varying depending on the availability of diagnostic tests and the local healthcare system's occupancy rate [2].

One of the main factors contributing to the development of severe forms of the Covid-19 is the occurrence of the cytokine storm, a process that can lead to multi-organ dysfunction. An important element in this process is the activation of the inflammasome, which has reactive oxygen species (ROS) as important ligands and mediators that can serve as triggers and stimulate pro-inflammatory activity, leading to the condition of the oxidative stress (OS) [3,4]. To complete the assessment of the redox state, antioxidant parameters are essential to understand the system's response to the challenges posed by the generation of ROS and reactive nitrogen species (RNS). This information can be obtained through the evaluation of enzyme activities such as Glutathione Peroxidase (GPx), which decompose peroxides. These enzymes also play an important role in complementing the action of Superoxide Dismutase (SOD), which reduces the amount of circulating $O_2^{\bullet-}$ molecules by transforming them into O_2 and H_2O_2 [5].

In the hospital setting, laboratory tests are essential tools for the diagnosis, monitoring, and prognosis of the disease, with alterations observed in tests such as C-reactive protein (CRP), ferritin, alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), lactate dehydrogenase (LDH), creatine phosphokinase (CPK), urea, creatinine, troponin, and arterial blood gas analysis [6,7,8,9,10]. These alterations are relevant in the progression of the infection

and reflect the severity of the patients' condition, potentially aiding in the classification between mild, moderate or severe states and guiding possible interventions [11].

This study aim to investigating the pathophysiological mechanisms of Covid-19, which can potentially serve as markers and therapeutic targets for the various degrees of disease severity. Our hypothesis is that OS may be associated with the development of severe forms of the pathology, as reflected in laboratory markers, the need for ICU admission, and patient outcomes.

2. Material and methods

2.1 Design and sampling

The study conducted was a cohort type, where samples were collected conveniently from 125 participants, organized into three groups: 1) Mild Covid-19 (n=38), 2) Moderate Covid-19 (n=39), and 3) Severe Covid-19 (n=48) during the period from 27/03/2020 to 07/12/2021, classified according to the guidelines recommended by the World Health Organization (WHO, 2023). The study included patients of both sexes, aged above 18 years. Patients with other influenza-like syndromes (not infected with the Covid-19 virus), acute or chronic infectious diseases and autoimmune diseases were excluded from the study. All participants were assessed at the study's outset to obtain clinical data, collect biological samples (respiratory and blood), and determine prognostic indicators from the clinical data. Patient records were also accessed through the Medview digital medical records system to determine hospitalization outcomes.

After receiving detailed information about the study's purpose and the procedures they would undergo, the selected participants or their responsible family members signed an Informed Consent Form (ICF). The project that led to this study was approved by the Human Research Ethics Committee at the Universidade Estadual de Londrina (UEL) (CAAE: 31656420.0.0000.5231).

2.2 Biological sample collection

A total of 16 mL of blood was collected from all volunteers through venous and arterial puncture: 6 mL of blood was collected in vacuum tubes (VACUETTE®) containing EDTA for performing hemogram-related parameters (total leukocytes, neutrophils, and platelets), and determining the enzymatic activities of SOD and GPx; 3 mL of arterial blood was collected in

vacuum tubes (VACUETTE®) containing heparin for conducting the gasometry test, and 7 mL of blood was collected in vacuum tubes (VACUETTE®) without anticoagulant for analyzing biochemical and inflammatory markers (urea, creatinine, CK, LDH, high-sensitivity troponin, AST, ALT, CRP, ferritin, transferrin, serum iron, total iron binding capacity (TIBC), latent iron-binding capacity, transferrin saturation), as well as oxidative stress markers (AOPP and NOx).

Respiratory material samples were collected using three sterile Rayon swabs, following a standardized procedure: the swab was inserted into the nasal cavity (approximately 5 cm, directed upwards, towards the eyes), and gentle circular movements were performed, pressing it against the lateral wall of the nose (towards the patient's ear). Subsequently, it was stored in a tube containing Viral Transport Medium (VTM - pink medium), as recommended by the Central Laboratory of the State of Paraná (LACEN/PR). One swab was collected for each nostril. The oropharyngeal swab was collected by inserting the swab into the posterior region of the throat and tonsils, avoiding contact with the tongue, and then storing it in the same tube as the other two swabs.

2.3 Covid-19 diagnosis

The diagnosis of Covid-19 was performed using real-time multiplex RT-PCR, using viral RNA extracted from nasopharyngeal swab as the sample, conducted at the Clinical Analysis Laboratory of the University Hospital in Londrina. For viral RNA extraction, the Extracta Kit Fast - Viral RNA (Loccus) was used, for real-time multiplex RT-PCR the TaqPath™ COVID-19 CE-IVD RT-PCR Kit (ThermoFisher) was used, and for extension and fluorescence detection, a QuantStudio™ 6 Flex real-time PCR system (ThermoFisher) was used. The data were analyzed and interpreted using Applied Biosystems™ COVID-19 Interpretative Software v. 2.3.

2.4 Biochemical and inflammatory parameters

The laboratory biomarkers urea, creatinine, CPK, LDH, ultrasensitive troponin, transferrin, AST, and ALT were performed in the Dimension® EXL 200 Clinical Chemistry System (Siemens), using Flex® reagent cartridges. CRP was conducted on the Architect® c8000 analyzer (Abbott), using the MULTIGENT CRP Vario reagent. Ferritin was measured on the Alinity i analyzer (Abbott), using the Alinity i Ferritin Reagent Kit. Arterial blood gas analysis and related parameters (sodium, potassium, lactate, glucose, ionized calcium, and

oxygen saturation) were carried out on the GEM Premier 3500 analyzer (Instrumentation Laboratory), using the manufacturer-provided reagents. Hematological parameters (white blood cells, neutrophils, and platelets) were determined using the Yumizen H1500 analyzer (Horiba). All procedures were performed according to the recommendations of the respective companies.

2.5 Oxidative and nitrosative stress parameters

2.5.1 Determination of Nitric Oxide metabolites (NO_x)

The quantification of nitric oxide (NO_x) byproducts was measured by determining the concentration of nitrites in serum using the method described by Navarro-Gonzales et al. (1998) [13], adapted for microplate analysis. Nitric oxide is a highly unstable gas that rapidly degrades into nitrate and nitrite byproducts, which can be detected in the serum. The detection method is based on the reduction of nitrate to nitrite, mediated by redox reactions between the nitrate in the sample and the cadmium-copper reagent system, followed by diazotization and colorimetric detection of the azo compound formed by the addition of the Griess reagent. The quantification of NO_x was performed using a Perkin Elmer® EnSpire microplate reader (Waltham, MA, USA), with readings taken at 540 nm. The concentration of nitric oxide was expressed in μM.

2.5.2 Determination of Advanced Oxidation Protein Products (AOPP)

Serum concentrations of advanced oxidation protein products (AOPP) were determined using a colorimetric method according to Hanasand et al. (2012) [14]. The reaction was carried out in an acidic medium (acetic acid), and in the presence of oxidized proteins in the sample, a reaction occurred with the potassium iodide in the reagents that absorb at 340 nm. The reaction reading was performed using a Perkin Elmer® EnSpire microplate reader (Waltham, MA, USA) at a wavelength of 340 nm. The concentration of AOPP was expressed in μmol/L of chloramine T equivalent.

2.5.3 Determination of Superoxide Dismutase (SOD)

The activity of SOD in erythrocytes was determined using the pyrogallol method described by Marklund and Marklund (1974) [15]. The reaction reading was performed using a Perkin Elmer® EnSpire microplate reader (Waltham, MA, USA) at a wavelength of 420 nm.

For the result calculation, intracellular hemoglobin levels were measured in whole blood samples using a colorimetric endpoint reaction. The Fe(II) of the heme group in hemoglobin,

oxyhemoglobin, and carboxyhemoglobin was oxidized to the ferric state by ferricyanide, resulting in the formation of hemoglobin. Hemoglobin then combined with ionized cyanide to produce cyanohemoglobin, which was measured at 540nm. The hemoglobin measurement result was expressed in g/dL.

At the end, all superoxide dismutase (SOD) results were expressed in U/mgHb.

2.5.4 Determination of Glutathione Peroxidase (GPx)

The activity of GPx was determined using the method described by Tietze (1969) [16] and Anderson (1985) [17]. The method for determining the activity of this enzyme is based on measuring the decrease in absorbance during the oxidation of NADPH. The reaction was performed in a Perkin Elmer® EnSpire microplate reader (Waltham, MA, USA) at a wavelength of 412 nm and at 25°C, while catalyzing the reduction of oxidized glutathione by glutathione reductase. The calculation of oxidized glutathione (GSSG) was performed using the formula $GSSG = (GT - GSH) / 2$.

For the results calculation, the measurement of intracellular hemoglobin was performed in whole blood samples using a colorimetric endpoint reaction. The Fe(II) of the heme group in hemoglobin, oxyhemoglobin, and carboxyhemoglobin was oxidized to the ferric state by ferricyanide, forming hemoglobin, which combined with ionized cyanide to produce cyanohemoglobin, measured at 540nm. The hemoglobin measurement result was expressed in g/dL.

Ultimately, all glutathione results were expressed in millimoles per gram of hemoglobin (mM/gHb).

2.6 Statistical Analysis

Categorical data were evaluated using the chi-square test, and the homogeneity of continuous data was determined using the Shapiro-Wilk method. Categorical variables were compared between groups using multinomial logistic regression. Data with non-parametric distribution were transformed using natural logarithm (Ln). Parametric data groups were compared using ANOVA with Tukey's post-test or Student's t-test, as appropriate. Non-parametric data groups were compared using the Kruskal-Wallis test with Dunn's post-test or the Mann-Whitney test, as appropriate. Spearman's correlation test was employed to establish correlations between data. Data with a p-value <0.05 were considered statistically significant. The statistical analyses were performed using SPSS version 28.0 software.

3. Results

Table 1, 2 and 3 presents the sociodemographic data, anthropometric measurements, clinical events, outcomes observed during hospitalization, continuous medication use of the study population and comorbidities, divided by the severity of Covid-19. We observed that the moderate group had a higher age ($p < 0.001$) compared to the mild group, the moderate and severe groups had higher body mass index (BMI) values ($p = 0.001$). The significant clinical events were the need for ICU admission ($p < 0.001$) and orotracheal intubation ($p < 0.001$), with these events occurring more frequently as the severity of the disease increases. The outcomes (death) were significant between mild and severe groups, as well as between moderate and severe groups ($p < 0.001$).

Table 1
Baseline characteristics, clinical events and outcomes of Covid-19 patients

Parameter	Covid-19 Patients Severity			P
	Mild (N=38)	Moderate (N=39)	Severe (N=48)	
Age (IQR)	42 (31-53)	57 (45-70)	49 (36-61)	<0.001^a
BMI (IQR)	25.51 (22.27-27.97)	29.24 (24.22-33.95)	29.07 (25.95-35.92)	0.001^{ab}
Sex – N (%)	F	21 (55.3)	15 (38.5)	0.316
	M	17 (44.7)	24 (61.5)	
Ethnicity – N (%)	C	32 (84.2)	30 (76.9)	0.456
	NC	6 (15.8)	9 (23.1)	
ICU – N (%)*	0 (0)	5 (12.8)	22 (45.8)	<0.001^c
Orotracheal Intubation – N (%)*	0 (0)	2 (5.1)	16 (33.3)	<0.001^c
Outcome of Hospitalization – Discharge/Death (%)*	38/0 (100/0)	38/1 (97.4/2.6)	33/15 (68.8/31.3)	<0.001^{bc}

Values expressed in N (numbers) and percentage (%) or in median (Interquartile Range - IQR). Abbreviation: BMI: Body Mass Index; ICU: Intensive Care Unit. a: p -value is different between mild and moderate group; b: p -value is different between mild and severe group; c: p -value is different between moderate and severe group. *The mild group was not included in the statistical analysis due to the absence of cases.

Table 2
Medications used by Covid-19 patients.

Parameter	Covid-19 Patients Severity		
	Mild (N=38)	Moderate (N=39)	Severe (N=48)
Steroidal Anti-Inflammatory – N (%)	0 (0)	1 (2.6)	0 (0)
Non-steroidal Anti-Inflammatory – N (%)	0 (0)	3 (7.7)	2 (4.2)
ACE II Inhibitor – N (%)	0 (0)	2 (5.1)	3 (6.3)
Angiotensin II Receptor Blocker – N (%)	0 (0)	8 (20.5)	9 (18.8)
Beta 1, Alfa 1 and Calcium Channel Blockers – N (%)	0 (0)	6 (15.4)	5 (10.4)
Hypocholesterolemic Agent – N (%)	0 (0)	3 (7.7)	4 (8.3)
Hypoglycemic Drugs – N (%)	0 (0)	6 (15.4)	8 (16.7)
Antiplatelets Drugs – N (%)	0 (0)	0 (0)	1 (2.1)
Vasodilators Drugs – N (%)	0 (0)	2 (5.1)	1 (2.1)
Diuretics Drugs – N (%)	0 (0)	8 (20.5)	5 (10.4)

Values expressed in N (numbers) and percentage (%).

Table 3
Comorbidities of Covid-19 patients

Parameter	Covid-19 Patients Severity		
	Mild (N=38)	Moderate (N=39)	Severe (N=48)
Heart Diseases – N (%)	0 (0)	2 (5.1)	6 (12.5)
Hipercholesterolemia – N (%)	0 (0)	1 (2.6)	5 (10.4)
DM 2 (Oral Hipoglycemiant) – N (%)	2 (5.3)	11 (28.2)	17 (35.4)
DM 2 (Insulin) – N (%)	0 (0)	0 (0)	1 (2.1)
Dialysis CKD – N (%)	0 (0)	3 (7.7)	2 (4.2)

Non-dialysis CKD – N (%)	0 (0)	2 (5.1)	0 (0)
Hypertension – N (%)	3 (7.9)	18 (46.2)	26 (54.2)
Cardiac Insufficiency – N (%)	3 (7.9)	1 (2.6)	2 (4.2)
Cancer – N (%)	1 (2.6)	0 (0)	1 (2.1)
Obesity – N (%)	5 (13.2)	11 (28.2)	17 (35.4)
Smoking – N (%)	0 (0)	1 (2.6)	1 (2.1)

Values expressed in N (numbers) and percentage (%). Abbreviations: DM2: type 2 diabetes mellitus; CKD: Chronic Kidney Disease.

Table 4 presents the biochemical and inflammatory biomarkers for moderate and severe group of Covid-19. Serum levels of sodium were increased in severe group when compared to moderate group ($p=0.020$), whereas oxygen saturation were decreased in the severe group when compared to moderate group ($p<0.001$).

Table 4
Biochemical and inflammatory biomarkers of patients with moderate and severe Covid-19

Parameters	Covid-19 Patients Severity		
	Moderate (N=39)	Severe (N=48)	p
Serum Iron – $\mu\text{g/dL}$	25 (18-36)	26 (15-36)	0.946
TIBC – $\mu\text{g/dL}$	213 (173-239)	203 (164-253)	0.749
Latent Capacity – $\mu\text{g/dL}$	191 (145-210)	176 (138-219)	0.550
Transferrin Saturation – %	11.48 (8.8-14.95)	11.73 (8.01-22.82)	0.606
Ferritin* – ng/mL	671.48 (328.04-1966.16)	743.01 (432.56-1343.49)	0.747
CRP – mg/L	85 (48.6-170.1)	115.4 (54.2-189.3)	0.407
WBC – m/mm^3	6880 (5290-8390)	6590 (4600-9140)	0.963
Neutrophil – m/mm^3	5056 (3928-6989)	4949 (3480-7698)	0.905
Platelets* – m/mm^3	195 (159-265)	179 (144-224)	0.336
Urea* – mg/dL	33 (23-52)	31 (23-46)	0.531

Creatinine – mg/dL	0.96 (0.75-1.23)	0.98 (0.76-1.27)	0.834
Na – mEq/L	134 (132-136)	136 (133-138)	0.020
K – mEq/L	3.6 (3.2-4.1)	3.8 (3.45-4.15)	0.973
Ionic Calcium – mmol/L	1.02 (1.01-1.06)	1.03 (1-1.06)	0.909
Glucose* – mg/dL	130 (96-169)	143 (105.5-230)	0.618
Lactate* – mmol/L	1.5 (1.2-1.8)	1.7 (1.3-2.1)	0.056
Oxygen Saturation – %	91 (89-93)	88 (81-91)	<0.001
LDH – U/L	282 (227-381)	319 (257-402)	0.126
AST – U/L	48 (25-63)	42 (32-57)	0.688
ALT – U/L	54 (32-73)	50 (28-73)	0.625
CK* – U/L	128 (58-286)	105 (60-307)	0.969
US Troponin* – ng/L	5 (0-17)	8.5 (0-17)	0.587

Values expressed in median (Interquartile Range - IQR); *Ln converted data. Abbreviations: TIBC: Total Iron Binding Capacity; CRP: C Reactive Protein; WBC: White Blood Cells; Na: Sodium; K: Potassium; LDH: Lactic Dehydrogenase; AST: Aspartate Aminotransferase; ALT: Alanine Aminotransferase; CK: Creatine Phosphokinase; US Troponin: Ultrasensitive Troponin.

Table 5 presents the anthropometric, inflammatory and oxidative stress biomarkers for patients with Covid-19 who required or did not require ICU admission. Were observed that glucose levels and BMI were increased in the patients who required ICU when compared with the group who not require ICU ($p=0.007$ and $p=0.016$), respectively. The other parameters did not show difference between groups.

Table 5

Anthropometric, inflammatory and oxidative stress biomarkers in patients with moderate and severe Covid-19, with and without the need for intensive care unit treatment.

Parameter	Need of ICU		P
	No (N=60)	Yes (N=27)	
Ferritin – ng/mL	637.52 (421.86-1472.43)	916.52 (451.53-1662.15)	0.182
CRP – mg/L	85.7 (47.3-170.1)	136 (62.1-231.7)	0.147

Glucose – mg/dL	130 (97-166)	150 (124-264)	0.007
BMI	25.59 (23.77-30.32)	29.94 (26.04-36.48)	0.016
AOPP – $\mu\text{mol/L}$ Chloramine-T equivalent	161.21 (126.76-246.87)	176.32 (132.13-224.57)	0.899
TG – mMolar/gHb	6.01 (5.35-6.58)	5.91 (5.04-6.52)	0.495
GSH – mMolar/gHb	5.32 (4.58-5.84)	5.53 (4.67-6.09)	0.504
GSSG – mMolar/gHb	0.20 (0.08-0.51)	0.18 (0.05-0.34)	0.232
SOD – USOD/gHb/min	71.78 (48.79-108.08)	60.76 (50.32-82.72)	0.385
NOx – $\mu\text{mol/L}$	4.82 (3.86-6.71)	4.73 (3.86-6.29)	0.880

Values expressed in median (Interquartile Range - IQR). Abbreviations: ICU: Intensive Care Unit; CRP: C Reactive Protein; BMI: Body Mass Index; AOPP: Advanced Oxidation Protein Products; TG: Total Glutathione; GSH: Reduced Glutathione; GSSG: Oxidized Glutathione; SOD: Superoxide Dismutase; NOx: Nitric Oxide Metabolites.

Table 6 shows the results of Spearman's correlation analysis between the biochemical and inflammatory biomarkers and the oxidative stress in the moderate and severe groups. AOPP showed a positive correlation with white blood cells ($r=0.325$, $p=0.020$). Nitric Oxide Metabolites (NOx) levels showed a positive correlation with white blood cells ($r=0.291$, $p=0.038$), creatinine ($r=0.411$, $p=0.003$), urea ($r=0.519$, $p<0.001$) and ultrasensitive troponin ($r=0.300$, $p=0.033$). GSH showed a positive correlation with ferritin ($r=0.280$, $p=0.047$), whereas SOD showed a positive correlation with CPK ($r=0.277$, $p=0.049$).

Table 6

Correlation of biochemical and inflammatory biomarkers of patients with moderate and severe Covid-19 with Oxidative Stress Assays.

Biochemical/ Inflammatory Parameters	Oxidative Stress Parameters					
	AOPP	NOx	TG	GSH	GSSG	SOD
Ferritin	0.029 (0.837)	-0.004 (0.977)	0.247 (0.080)	0.280 (0.047)	-0.079 (0.582)	0.095 (0.506)
CRP	-0.052 (0.715)	0.096 (0.504)	0.018 (0.901)	-0.071 (0.619)	0.188 (0.188)	-0.119 (0.406)
WBC	0.325 (0.020)	0.291 (0.038)	-0.041 (0.775)	-0.151 (0.291)	0.233 (0.100)	0.127 (0.376)

Neutrophil	0.256 (0.070)	0.194 (0.173)	-0.025 (0.864)	-0.134 (0.348)	0.233 (0.101)	0.144 (0.313)
Platelets	0.243 (0.086)	0.038 (0.791)	0.236 (0.095)	0.225 (0.112)	0.014 (0.921)	0.008 (0.957)
Urea	0.231 (0.104)	0.519 (<0.001)	0.116 (0.417)	0.109 (0.447)	0.011 (0.939)	-0.065 (0.650)
Creatinine	0.089 (0.533)	0.411 (0.003)	0.178 (0.211)	0.163 (0.253)	0.025 (0.864)	-0.141 (0.324)
Ionic Calcium	-0.192 (0.176)	-0.010 (0.945)	0.022 (0.877)	0.006 (0.969)	0.034 (0.813)	-0.054 (0.708)
Glucose	-0.046 (0.746)	-0.068 (0.635)	-0.155 (0.278)	-0.201 (0.157)	0.104 (0.467)	-0.125 (0.380)
Lactate	0.099 (0.489)	0.013 (0.926)	-0.150 (0.294)	-0.108 (0.449)	-0.081 (0.571)	0.011 (0.941)
Oxygen Saturation	0.255 (0.070)	0.173 (0.224)	-0.111 (0.437)	-0.018 (0.902)	-0.193 (0.175)	-0.041 (0.775)
LDH	-0.075 (0.599)	-0.010 (0.942)	-0.092 (0.519)	-0.147 (0.303)	0.119 (0.405)	0.033 (0.820)
AST	0.088 (0.537)	0.011 (0.940)	0.221 (0.119)	0.252 (0.074)	-0.075 (0.603)	0.138 (0.333)
ALT	0.127 (0.374)	-0.013 (0.930)	-0.068 (0.635)	-0.085 (0.552)	0.039 (0.786)	0.019 (0.894)
CK	0.034 (0.814)	0.039 (0.788)	0.124 (0.384)	0.138 (0.335)	-0.033 (0.818)	0.277 (0.049)
US Troponin	0.144 (0.312)	0.300 (0.033)	-0.128 (0.372)	-0.158 (0.372)	0.070 (0.627)	-0.197 (0.167)

Values expressed by Spearman Correlation Coefficient r (p -value). Abbreviations: AOPP: Advanced Oxidation Protein Products; NOx: Nitric Oxide Metabolites; TG: Total Glutathione; GSH: Reduced Glutathione; GSSG: Oxidized Glutathione; SOD: Superoxide Dismutase; CRP: C Reactive Protein; WBC: White Blood Cells; LDH: Lactic Dehydrogenase; AST: Aspartate Aminotransferase; ALT: Alanine Aminotransferase; CK: Creatine Phosphokinase; US Troponin: Ultrasensitive Troponin.

The results of the OS tests between severity groups of Covid-19 are represented below in Table 7, Figure 1 and 2. Table 7: AOPP, TG, NOx and SOD did not show statistically significant differences between groups. Figure 1: The levels of GSH exhibited significant differences among the three groups, with the moderate group showing higher levels compared to both the mild and severe groups ($p=0.027$). Figure 2: GSSG levels displayed significant differences between the groups, with the moderate and severe groups showing lower levels

compared to the mild group ($p < 0.001$)

Table 7
Oxidative Stress biomarkers of patients with mild, moderate and severe Covid-19

Parameter	Covid-19 Patients Severity			p
	Mild (N=38)	Moderate (N=39)	Severe (N=48)	
AOPP ($\mu\text{mol/L}$ of chloramine T equivalent)	160.67 (116.81-276.83)	155.72 (135.77-216.36)	173.9 (137.93-224.57)	0.914
NOx ($\mu\text{mol/L}$)	4.5 (3.74-5.49)	4.84 (3.99-6.8)	5.36 (3.74-7.21)	0.284
TG (miliMolar/gHb)	6.31 (5.04-7.39)	5.77 (5.31-6.26)	6.06 (5.26-6.51)	0.195
SOD (USOD/gHb/minute)	71.31 (40.15-109.47)	67.18 (52.13-104.63)	69.42 (50.32-105.41)	0.901

Values expressed in median (Interquartile Range - IQR). Abbreviations: AOPP: Advanced Oxidation Protein Products; NOx: Nitric Oxide Metabolites; TG: Total Glutathione; SOD: Superoxide Dismutase.

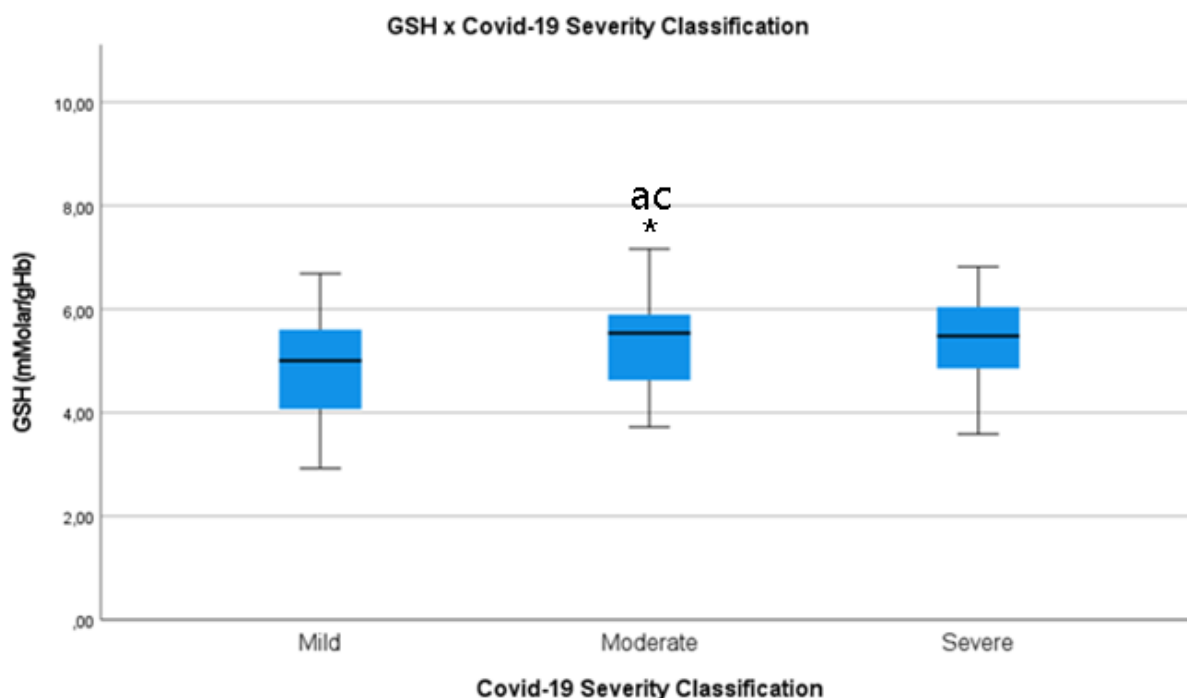


Fig. 1. GSH x Severity. Kruskal-Wallis p -value: **0.027^{ac}**. a: p -value is different between mild and moderate group; b: p -value is different between mild and severe group; c: p -value is different between moderate and severe group. Abbreviations: GSH: Reduced Glutathione.

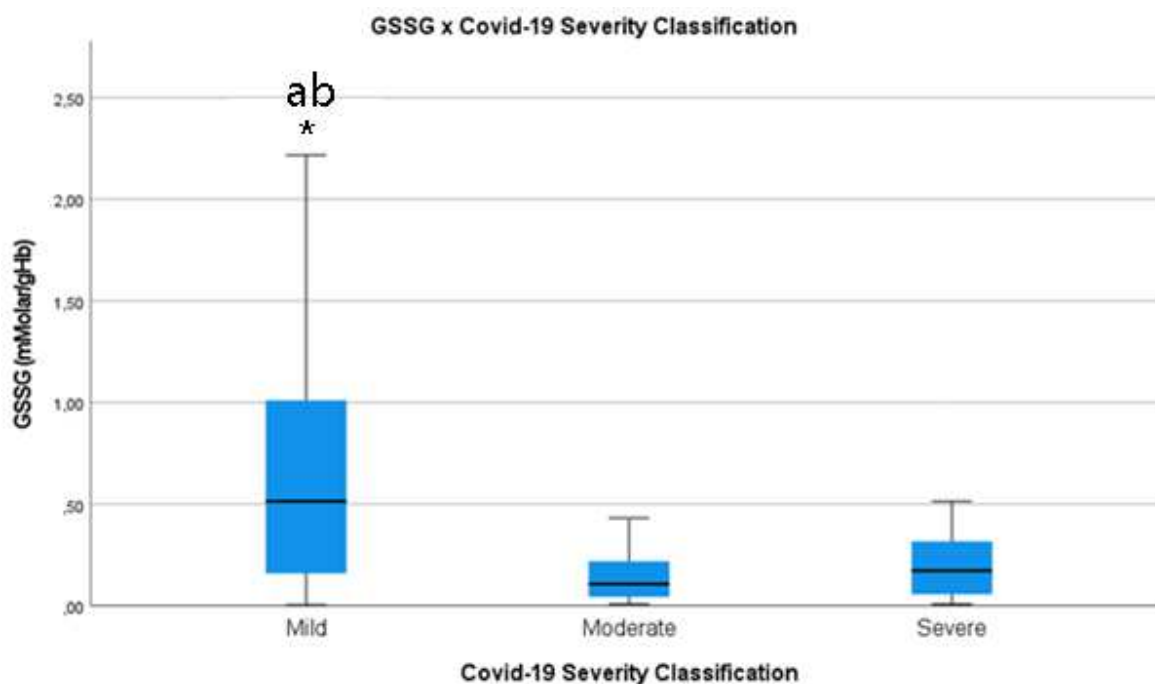


Fig. 2. GSSG x Severity. Kruskal-Wallis p -value: $<0.001^{ab}$. a: p -value is different between mild and moderate group; b: p -value is different between mild and severe group; c: p -value is different between moderate and severe group. Abbreviations: GSSG: Oxidized Glutathione.

4. Discussion

As one of the main antioxidants in the body, GSH is present in most tissues playing an important role in immune response and antiviral defenses [18,19], making it one of the first lines of defense against SARS-CoV-2 infection. It is important to note that the regulation of antioxidant levels and susceptibility to viral infections are linked to the activity of the transcription factor Nuclear Factor Erythroid 2 – Related Factor 2 (NRF2), which increases in response to infections and oxidative damage, modulating the antioxidant response and cells receptors expression in order to reduce viral replication and protect the host structures from oxidation [20,21]. This can explain the findings of this study, which observed an increase in GSH ($p=0.027$) at the onset of infection, as well as the decrease in GSSG ($p<0.001$) and the maintenance of TG levels ($p=0.195$) in the moderate and severe groups, once the activity of Glutathione Reductase could be increased, promoting the regeneration of GSH from its oxidized form to meet the antioxidant demand [18]. A hypothesis for the correlation we found with ferritin ($r=0.280$; $p=0.047$) is that it is induced as a response to oxidative agents, similar to GSH increasing mechanism, reducing the availability of free iron for oxidative reactions and protecting cells from the damage caused by H_2O_2 [22]. Also, it can stimulate anti-inflammatory and antiviral cytokines production (IL-10 and INF- γ) by CD4+ and CD8+ cells [23].

Several studies have highlighted the importance of OS, inflammation and their

associated factors in the pathophysiological process of Covid-19 [18,24,25]. The study conducted by Wybranowski et al. (2022) [25] detected an increase in albumin oxidation by the AOPP technique, although it did not corroborate our findings. However, the same study showed that this increase was more pronounced one week after the patients' hospitalization, which differs from our sample collection time, as we only used the moment of admission of the patients to the hospital. Elevated AOPP levels are common in patients with chronic diseases, causing effects of proinflammatory activity induction and being a marker of WBC activation, specially neutrophils, which can justify the correlation found with WBC in this study ($r=0.325$, $p=0.020$) [26].

The population in our study demonstrated that higher age, BMI, presence of hypertension and DM2 were found in moderate and severe patients, as well as the use of medications for blood pressure control, glycemic control, and diuretics, aligning with the profile of reported diseases in the study conducted by Guan et al. (2020) [27]. Since the beginning of the pandemic, comorbidities have been indicated as risk factors for severe forms and death from Covid-19, including age, obesity, cardiovascular disorders, type 2 diabetes (DM2) and hypertension, frequently coexisting and escalating the risk of poor prognosis [27,28,29,30,31,32].

Older patients shown a stronger host innate response to viral infection, with increased inflammation genes expression, reduced IFN- β type I levels and age-dependent defects in B-cells and T-cells that could lead to a difficult to control viral replication and maintaining a prolonged proinflammatory response [28]. Obesity is associated with a chronic inflammatory state that can be responsible for deleterious changes and can aggravate immune response against the viral infection, in addition to have an important impact on respiratory function and gas exchange that can contribute to developing diseases such as asthma, obesity-hypoventilation syndrome and pneumonia [30].

Comorbidities that impact on circulatory system, such as hypertension, can naturally lead to cardiovascular complications like myocardial injury, systemic inflammation, plaque rupture and coronary thrombosis, amplifying the fatality rate on Covid-19 [27,32]. Finally, patients with DM2 shown a higher risk of glycemic decompensation due to the combination of viral replication in pancreatic islets and systemic inflammation amplified by the Covid-1, which could lead to insulin resistance and disease decompensation [33].

We also observed in our data the different needs among the groups regarding ICU admission, orotracheal intubation and the occurrence of poor outcomes, with these events occurring more frequently as the severity of the disease increases, similar to the findings by

Kamyshnyi et al. (2020) [32] and Guan et al. (2020) [27], where disease severity and poor outcomes were associated with the presence of comorbidities like hypertension, obesity and DM. The reduction in oxygen saturation in the severe group was expected, as it is a key parameter for hospital admission and is part of the complications of the disease [34].

Blood glucose levels also proved to be an important parameter for patients with Covid-19, with higher values observed in the group that required intensive care services. This is in line with the data obtained on the need for ICU admission in severe patients and the development of severe disease in patients with DM2, especially those using oral hypoglycemic agents. It is important to observe that elevated glucose levels are found in several hospitalized patients, not exclusively on those with DM2, once it is considered a marker of increased stress [35] and of severity of illness, being associated with poor outcomes in patient with and without DM [36]. A higher number of patients with a higher BMI was also observed in the ICU group, corroborating the findings of Djaharuddin et al. (2021) [37] and Sanyaolu et al. (2020) [31].

The presence of alterations in serum Na levels is related to the severity of Covid-19 [38,39], particularly in cases of hypernatremia (serum Na > 145mEq/L). Patients with hypernatremia have a higher need for ICU admission and a longer ICU stay, with prolonged use of mechanical ventilation compared to patients with normal Na levels. Higher mortality rates have also been associated with this condition [40]. Although we cannot characterize our results as hypernatremia, the sodium levels in our severe patients are higher those observed in the moderate group ($p=0.020$). Small extracellular Na elevation has been associated with proinflammatory changes on endothelial cells, reducing NO release from them and impacting on cardiovascular system [41]. Critical hospitalized patients commonly present catabolism and high urea levels, which contribute to developing urea-induced osmotic diuresis and loss of electrolyte-free water, causing the elevation of serum Na [42].

Damiano et al. (2020) [43] describe the dysregulation of NOx pathways and the occurrence of oxidative stress as important factors for poor outcomes in SARS-CoV-2 infection, once the angiotensin II accumulation caused by the viral infection stimulates the angiotensin type 1 (AT1) receptors, leading to vasoconstriction and increase of blood pressure, activating NOx vials. The inflammatory response recruits WBC to inflamed tissues and producing more ROS and RNS [44], which justify the association between NOx and WBC ($r=0,291$, $p=0,038$). Violi et al. (2015) [45] have explored its correlation with troponin in other contexts of pneumonia and it is also related to cardiac complications in Covid-19, once cardiovascular disturbs can be observed on severe disease course, including myocardial damage [46]. Finally, urea and creatinine are nitrogenous end products of metabolism, specifically from

protein and muscle catabolism, common events in hospitalized patients, although their classical use is as renal markers [42; 47]. The metabolism of this compounds and the synthesis of inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) is made by the common substrate L-Arginine, with thus levels being correlated with the amino acid offer [48]. Despite that, the correlation between urea ($r=0.519$, $p<0.001$), creatinine ($r=0,411$, $p=0,003$) and NOx could be explained by the reduction of NOx excretion in renal diseases context [49].

The correlation found between SOD and CK ($r=0.277$, $p=0.49$) can be explained by the function of SOD in protecting and maintaining the activity of CK during oxidative damage. In situations where oxidative damage occurs, the levels of the antioxidant enzyme (SOD) increase proportionally to the extent of tissue damage and CK release. Thus, this correlation suggests that SOD plays a role in safeguarding CK activity under conditions of oxidative stress, reflecting a response to tissue damage and CK release. [50].

5. Conclusion

Based on the obtained results, we were able to observe that patients with moderate and severe stages of SARS-CoV-2 infection in the early phase may exhibit alterations in their OS markers, mainly in the GPx system, which was demonstrated an increase in GSH and decrease in GSSG levels in severe group. Comorbidities have proven to be important factors for the development of severe forms of the disease and subsequent need of ICU admission, with notable ones including DM2, hypertension and overweight/obesity. Additionally, sodium levels, glucose levels, lower oxygen saturation and higher BMI appear to be potential markers to evaluate disease severity and outcome.

Maintaining the integrity of the redox system emerges as a preventive and therapeutic option for controlling the most severe manifestations of Covid-19, along with the proper monitoring of laboratory parameters associated with patients' comorbidities. Finally, our results are consistent with those obtained in different populations, although further studies are still needed to clarify the underlying pathophysiological mechanisms, identify potential therapeutic targets, and evaluate new treatments, while acknowledging that they do not replace the need for appropriate vaccination.

6. References

- [1] D.G. Ahn, H.J. Shin, M.H. Kim, S. Lee, H.S. Kim, J. Myoung, et al., Current Status of Epidemiology, Diagnosis, Therapeutics, and Vaccines for Novel Coronavirus Disease 2019 (COVID-19), *J. Microbiol. Biotechnol.* (2020), 30(3), 313–324, <https://doi.org/10.4014/jmb.2003.03011>
- [2] D.D. Rajgor, M.H. Lee, S. Archuleta, N. Bagdasarian, S.C. Quek., The many estimates of the COVID-19 case fatality rate, *Lancet Infect Dis* (2020), 20, 776-777, [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30226-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30226-7)
- [3] P. Mehta, D.F. McAuley, M. Brown, E. Sanchez, R.S. Tattersall, J.J. Manson., COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression, *Lancet Infect Dis* (2020), 395, 1033-1034, [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30630-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30630-9)
- [4] S. Muralidharan, P. Mandrekar., Cellular stress response and innate immune signaling: integrating pathways in host defense and inflammation, *Journal of Leukocyte Biology* (2013), 94, 1-18, <http://doi:10.1189/jlb.0313153>
- [5] X.G. Lei, J.H. Zhu, W.H. Cheng, Y. Bao, Y.S. Ho, A.R. Reddi, et al., Paradoxical Roles of Antioxidant Enzymes: Basic Mechanisms and Health Implications, *Physiol Rev* (2015), 96, 307–364, <http://doi:10.1152/physrev.00010.2014>.
- [6] A.R. Chapman, A. Bularga, N.L. Mills., High-Sensitivity Cardiac Troponin Can Be an Ally in the Fight Against COVID-19, *Circulation* (2020),141, 1733–1735, <http://doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.120.047008>
- [7] Y.R. Guo, Q.D. Cao, Z.S. Hong, Y.Y. Tan, S.D. Chen, H.J. Jin, et al., The origin, transmission and clinical therapies on coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak – an update on the status, *1. Military Medical Research* (2020), 7(11), 1-10, <https://doi.org/10.1186/s40779-020-00240-0>
- [8] T. Guo, Y. Fan, M. Chen, X. Wu, L. Zhang, T. He, et al., Cardiovascular Implications of Fatal Outcomes of Patients With Coronavirus Disease 2019 (COVID-19), *JAMA Cardiol.* (2020), 5(7), 811-818, [doi:10.1001/jamacardio.2020.1017](https://doi.org/10.1001/jamacardio.2020.1017)
- [9] B.M. Henry, M.H.S. Oliveira, S. Benoit, M. Plebania, G. Lippia., Hematologic, biochemical

and immune biomarker abnormalities associated with severe illness and mortality in coronavirus disease 2019 (COVID-19): a meta-analysis, *Clin Chem Lab Med* (2020), 1-8, <https://doi.org/10.1515/cclm-2020-0369>

[10] E. Poggialia, D. Zainob, P. Immovillib, L. Roveroa, G. Losia, A. Dacremaa, et al., Lactate dehydrogenase and C-reactive protein as predictors of respiratory failure in Covid-19 patients, *Clinica Chimica Acta* 509 (2020), 135–138, <https://doi.org/10.1016/j.cca.2020.06.012>

[11] Z. Wang, F. Muecksch, D. Schaefer-Babajew, S. Finkin, C. Viant, C. Gaebler, et al., Naturally enhanced neutralizing breadth against SARS-CoV-2 one year after infection, *Nature* (2021), 595, 426-431, <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03696-9>

[12] Clinical management of COVID-19: living guideline, 13 January 2023. Geneva: World Health Organization; 2023 (WHO/2019-nCoV/clinical/2023.1). Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO

[13] J.A. Navarro-González, C. García-Benayas, J. Arenas, Semiautomated Measurement of Nitrate in Biological Fluids. *Clin Chem.* (1998), 44, 679-681

[14] M. Hanasand, et al., Improved detection of advanced oxidation protein products in plasma. *Clinica Chimica Acta.* (2012), 413, 901-906

[15] S. Marklund, G. Marklund, Involvement of the Superoxide Anion Radical in the Autoxidation of Pyrogallol and a Convenient Assay for Superoxide Dismutase, *Eur. J. Biochem.* (1974), 47, 469-474

[16] F. Tietze, Enzymic Method for Quantitative Determination of Nanogram Amounts of Total and Oxidized Glutathione: Applications to Mammalian Blood and Other Tissues, *Analytical Biochemistry* (1969), 27, 502-522

[17] M.E. Anderson, Determination of Glutathione and Glutathione Disulfide in Biological Samples, *Methods in Enzymology* (1985), 113, 548-555

[18] F. Silvagno, A. Vernone, G.P. Pescarmona, The Role of Glutathione in Protecting against the Severe Inflammatory Response Triggered by COVID-19, *Antioxidants* (2020), 9(624), 1-16, <http://doi:10.3390/antiox9070624>

[19] S. Derouiche, Oxidative Stress Associated with SARS-Cov-2 (COVID-19) Increases the

Severity of the Lung Disease - A Systematic Review, *J Infect Dis Epidemiol* (2020), 6(121),1-6, <http://doi.org/10.23937/2474-3658/1510121>

[20] J.M. McCord, B.M. Hybertson, A. Cota-Gomez, K.P. Geraci, B. Gao, Nrf2 Activator PB125® as a Potential Therapeutic Agent against COVID-19, *Antioxidants* (2020), 9(518), 1-15, <http://doi.org/10.3390/antiox9060518>

[21] L. Zhou, H. Zhang, K.J.A. Davies, H.J. Forman, Aging-related decline in the induction of Nrf2-regulated antioxidant genes in human bronchial epithelial cells, *Redox Biology* (2018), 14, 35–40, <http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2017.08.014>

[22] K. Orino, L. Lehman, Y. Tsuji, H. Ayaki, S.V. Torti, F.M. Torti, Ferritin and the response to oxidative stress, *Biochem. J.* (2001), 357, 241–247

[23] C. P. Gray, P. Arosio, P. Hersey, Heavy chain ferritin activates regulatory T cells by induction of changes in dendritic cells, *Blood* (2002), 99, 9.

[24] V. Montiel, I. Lobysheva, L. Gerard, M. Vermeersch, D. Perez-Morga, T. Castelein, et al., Oxidative stress-induced endothelial dysfunction and decreased vascular nitric oxide in COVID-19 patients, *eBioMedicine* (2022), 77, 1-18, <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2022.103893>

[25] T. Wybranowski, M. Napiórkowska, M. Bosek, J. Pyskir, B. Ziomkowska, M. Cyrankiewicz, Study of Albumin Oxidation in COVID-19 Pneumonia Patients: Possible Mechanisms and Consequences, *Int. J. Mol. Sci.* (2022), 23(10103), 1-16, <https://doi.org/10.3390/ijms231710103>

[26] M. Kalousova, T. Zima, V. Tesar, S. Dusilova-Sulkova, J. Skrha, Advanced glycoxidation end products in chronic diseases—clinical chemistry and genetic background, *Mutation Research* (2005), 579, 37–46.

[27] W.J. Guan, W.H. Liang, Y. Zhao, et al., Comorbidity and its impact on 1590 patients with COVID-19 in China: a nationwide analysis, *Eur Respir J* (2020), 55, <https://doi.org/10.1183/13993003.00547-2020>

[28] F. Zhou, T. Yu, R. Du, G. Fan, Y. Liu, Z. Liu, Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study, *Lancet*

(2020), 395, 1054–1062, [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30566-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30566-3)

[29] A. Emami, F. Javanmardi, N. Pirbonyeh, A. Akbari, Prevalence of Underlying Diseases in Hospitalized Patients with COVID-19: a Systematic Review and Meta-Analysis, *Archives of Academic Emergency Medicine* (2020), 8(1), 1-14

[30] J. Moreno Fernandez, J. Ochoa, M.L. Ojeda, F. Nogales, O. Carreras, J. Díaz Castro, Inflammation and oxidative stress, the links between obesity and COVID 19: a narrative review, *Journal of Physiology and Biochemistry* (2022), 78, 581–591, <https://doi.org/10.1007/s13105-022-00887-4>

[31] A. Sanyaolu, C. Okorie, A. Marinkovic, R. Patidar, K. Younis, P. Desai, et al., Comorbidity and its Impact on Patients with COVID-19, *SN Comprehensive Clinical Medicine* (2020), 2, 1069–1076, <https://doi.org/10.1007/s42399-020-00363-4>

[32] A. Kamyshnyi, I. Krynytska, V. Matskevych, M. Marushchak, O. Lushchak, Arterial Hypertension as a Risk Comorbidity Associated with COVID-19 Pathology, *International Journal of Hypertension* (2020), <https://doi.org/10.1155/2020/8019360>

[33] R. Gómez-Huelgas, F. Gómez-Peralta, Perceptions about the Management of Patients with DM2 and COVID-19 in the Hospital Care Setting, *J. Clin. Med.* (2022), 11, 4507. <https://doi.org/10.3390/jcm11154507>

[34] Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de vigilância epidemiológica: emergência de saúde pública de importância nacional pela doença pelo coronavírus 2019 – Covid-19 / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. – Brasília: Ministério da Saúde, 2022.

[35] N. Scherz, D. Aujesky, J. Labarère, M. Méan, Elevated Admission Glucose and Mortality in Patients With Acute Pulmonary Embolism, *Diabetes Care* (2012), 35:25–31.

[36] B. K. Helfand, N. J. Maselli, D. M. Lessard, J. Yarzebski, J. M. Gore, D. D. McManus, J. S. Saczynski, R. J. Goldberg, Elevated serum glucose levels and survival after acute heart failure: A population-based perspective, *Diabetes & Vascular Disease Research* (2015), 12(2), 119–125. DOI: 10.1177/1479164114559024

[37] I. Djaharuddin, S. Munawwarah, A. Nurulita, M. Ilyas, N.A. Tabri, N. Lihawa,

Comorbidities and mortality in COVID-19 patients, *Gac Sanit.* (2021), 35(S2), S530–S532, <https://doi.org/10.1016/j.gaceta.2021.10.085>

[38] J.G. Ruiz-Sanchez, I.J. Nuñez-Gil, M. Cuesta, M.A. Rubio, C. Maroun-Eid, R. Arroyo-Espliguero, et al., Prognostic Impact of Hyponatremia and Hypernatremia in COVID-19 Pneumonia. A HOPE-COVID-19 (Health Outcome Predictive Evaluation for COVID-19) Registry Analysis, *Front. Endocrinol.* (2020), 11, <http://doi:10.3389/fendo.2020.599255>

[39] J.S. Hirsch, N.N. Uppal, P. Sharma, Y. Khanin, H.H. Shah, D.A. Malieckal, et al., Prevalence and outcomes of hyponatremia and hypernatremia in patients hospitalized with COVID-19, *Nephrol Dial Transplant* (2021), 36, 1135–1138, <http://doi:10.1093/ndt/gfab067>

[40] M.A. Zimmer, A.K. Zink, C.W. Weißer, U. Vogt, A. Michelsen, H.J. Priebe, et al., Hypernatremia—A Manifestation of COVID-19: A Case Series, *International Anesthesia Research Society.* (2020), 14(9), 1-5, <http://doi:10.1213/XAA.0000000000001295>

[41] N. I. Dmitrieva, M. B. Burg, Elevated Sodium and Dehydration Stimulate Inflammatory Signaling in Endothelial Cells and Promote Atherosclerosis, *PLoS ONE* (2015), 10(6): e0128870. <doi:10.1371/journal.pone.0128870>

[42] C. Rugg, M. Ströhle, B. Treml, M. Bachler, S. Schmid, J. Kreutziger, ICU-Acquired Hypernatremia Is Associated with Persistent Inflammation, Immunosuppression and Catabolism Syndrome, *J. Clin. Med.* (2020), 9, 3017. <doi:10.3390/jcm9093017>

[43] S. Damiano, C. Sozio, G.L. Rosa, M. Santillo, NOX-Dependent Signaling Dysregulation in Severe COVID-19: Clues to Effective Treatments, *Front. Cell. Infect. Microbiol.* (2020), 10, <http://doi:10.3389/fcimb.2020.608435>

[44] J. M. McCord, B. M. Hybertson, A. Cota-Gomez, K. P. Geraci, B. Gao, Nrf2 Activator PB125® as a Potential Therapeutic Agent against COVID-19, *Antioxidants* (2020), 9, 518. <doi:10.3390/antiox9060518>

[45] F. Violi, R. Carnevale, C. Calvieri, C. Nocella, M. Falcone, A. Farcomeni, et al., Nox2 up-regulation is associated with an enhanced risk of atrial fibrillation in patients with pneumonia, *Thorax* (2015), 70, 961–966, <http://doi:10.1136/thoraxjnl-2015-207178>

[46] L. Loffredo, F. Violi, COVID-19 and cardiovascular injury: A role for oxidative stress and

antioxidant treatment?, *International Journal of Cardiology* (2020), 312, 136, <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2020.04.066>

[47] J. H. Salazar, Overview of Urea and Creatinine, *Winter* (2014), 45, 1, 19-20. DOI: 10.1309/LM920SBNZPJRJGUT

[48] A. A. Reyes, I. E. Karl, S. Klahr, Role of arginine in health and in renal disease, *American Physiological Society* (1994).

[49] L. Koster-Kamphuis, E. A. van Straaten, W. A. Kors, J. E. A. R. De Schrijver, I. M. Y. Bovee-Oudenhoven, R. van der Meer, P-Ph. Forget, Urinary NOx:Creatinine Ratios During Gluten Challenge in Children With Celiac Disease, *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* (2003) 36:372–375.

[50] J. M. McCord, W. J. Russell, Inactivation of creatine phosphokinase by super oxide during reperfusion injury, *Oxygen Radicals in Biology and Medicine* (1988).

7 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos, pode-se concluir que existem diferenças entre os biomarcadores bioquímicos nas diferentes gravidades da doença, com alterações nos parâmetros de sódio e saturação de oxigênio nos pacientes graves, comparados aos moderados. Dentro dos parâmetros bioquímicos, a glicose também foi relevante, com um aumento significativo nos pacientes com necessidade de internação em UTI.

Em relação aos parâmetros de EO, foi verificada diferença significativa nos níveis de GSH e GSSG. A GSH foi correlacionada com a ferritina, enquanto o NOx foi correlacionado com leucócitos totais, ureia, creatinina e troponina. Também foi encontrada correlação entre AOPP e leucócitos totais, assim como SOD e CK.

Comorbidades como maior idade, maior IMC, DM2 e hipertensão arterial tiveram maior frequência nos grupos grave e moderado. Eventos clínicos como morte, admissão na UTI e intubação tiveram maior frequência conforme o aumento da gravidade da doença.

Com isso, podemos concluir que a avaliação dos parâmetros laboratoriais e de EO é uma etapa importante para o entendimento da gravidade e dos mecanismos que compreendem a fisiopatologia da Covid-19, podendo auxiliar no manejo dos pacientes e na avaliação de seu prognóstico.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Pacientes em estágios moderados e graves na fase inicial da infecção por SARS-CoV-2 podem apresentar alterações em seus marcadores de EO, seja pela ativação da resposta antioxidante ou pelo seu consumo. A presença de comorbidades é um fator importante para o desenvolvimento das formas graves da doença, devendo ser considerado no atendimento ao paciente e na seleção dos parâmetros laboratoriais para o acompanhamento adequado no período de internação.

A manutenção da integridade do sistema redox se apresenta como uma opção preventiva e terapêutica para o controle das manifestações mais graves da Covid-19, embora sejam necessários estudos adicionais para esclarecer e detalhar os mecanismos fisiopatológicos, identificar possíveis alvos terapêuticos e validar novas opções tratamento, ainda tendo em mente que eles não substituem a necessidade da vacinação adequada da população.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, Levi; FRANCO, Maria C.; ESTEVEZ, Alvaro G. Reactive nitrogen species in cellular signaling. **Experimental Biology and Medicine**, [S. l.], v. 240, n. 6, p. 711–717, 2015. ISSN: 15353699. ISBN: 1535370215581. DOI: 10.1177/1535370215581314.
- ADWAS, Almokhtar A et al. Oxidative stress and antioxidant mechanisms in human body. **Journal of Applied Biotechnology & Bioengineering**. v.6, p.43-47, 2019. <http://DOI:10.15406/jabb.2019.06.00173>
- AHN, Dae-Gyun et al. Current Status of Epidemiology, Diagnosis, Therapeutics, and Vaccines for Novel Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). **J. Microbiol. Biotechnol**, v.30, n.3, p.313-324, Março 2020. <https://doi.org/10.4014/jmb.2003.03011>
- ANDERSON, M. E. Determination of Glutathione and Glutathione Disulfide in Biological Samples. **Methods in Enzymology**. 113, 548-555, 1985.
- ASGHAR, Muhammad Sohaib et al. Poor Prognostic Biochemical Markers Predicting Fatalities Caused by COVID-19: A Retrospective Observational Study From a Developing Country. **Cureus**. v.12, n.8, Agosto 2020. DOI 10.7759/cureus.957
- BALLATORI, Nazzareno et al. Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. **Biol Chem**. v.390, n.3, p.191–214, Março 2009. <http://doi:10.1515/BC.2009.033>.
- BARBOSA, Lívea Fujita; MEDEIROS, Marisa H.G.; AUGUSTO, Ohara. Danos oxidativos e neurodegeneração: o quê aprendemos com animais transgênicos e nocautes? **Quim. Nova**, v. 29, n. 6, p. 1352-1360, 2006.
- CHANG, Ryan et al. SARS-CoV-2 Mediated Endothelial Dysfunction: The Potential Role of Chronic Oxidative Stress. **Front. Physiol**. v.11, 2021. <http://doi:10.3389/fphys.2020.605908>
- CHAPMAN, Andrew R.; BULARGA, Anda; MILLS, Nicholas L. High-Sensitivity Cardiac Troponin Can Be an Ally in the Fight against COVID-19. **Circulation**, [S. l.], v. 141, n. 22, p. 1733–1735, 2020. ISSN: 15244539. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.120.047008.
- CHEIGNON, C. et al. Oxidative stress and the amyloid beta peptide in Alzheimer’s disease. **Redox Biology**. v.14, p.450–464, 2018. <http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2017.10.014>
- Clinical management of COVID-19: living guideline, 13 January 2023. Geneva: World Health Organization; 2023 (WHO/2019-nCoV/clinical/2023.1). Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- CREECH, C. Buddy; WALKER, Shannon C.; SAMUELS, Robert J. SARS-CoV-2 Vaccines. **JAMA Insights**. v. 325, n. 13, Abril 2021.
- CUI, Jie; LI, Fang; SHI, Zheng-Li. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. **Nature Reviews | Microbiology**, v.17, p181-192, Março 2019. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0118-9>
- DELGADO-ROCHE, Livan; MESTA, Fernando. Oxidative Stress as Key Player in Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus (SARS-CoV) Infection. **Archives of Medical**

Research, [S. l.], v. 51, n. 5, p. 384–387, 2020. ISSN: 18735487. DOI: 10.1016/j.arcmed.2020.04.019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2020.04.019>.

DEROUICHE, Samir. Oxidative Stress Associated with SARS-Cov-2 (COVID-19) Increases the Severity of the Lung Disease - A Systematic Review. **J Infect Dis Epidemiol**. v.6, 2020. [http:// DOI: 10.23937/2474-3658/1510121](http://doi.org/10.23937/2474-3658/1510121)

DONG, Ensheng; DU, Hongru; GARDNER, Lauren. An interactive web-based dashboard to track COVID-19 in real time. **The Lancet Infectious Diseases**, [S. l.], v. 20, n. 5, p. 533–534, 2020. ISSN: 14744457. DOI: 10.1016/S1473-3099(20)30120-1. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30120-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30120-1).

DONG, Xiang et al. Eleven faces of coronavirus disease 2019. **Allergy**. v.75, p.1699–1709, Março 2020. [http://DOI: 10.1111/all.14289](http://doi.org/10.1111/all.14289)

FU, Jianhong et al. The clinical implication of dynamic neutrophil to lymphocyte ratio and D-dimer in COVID-19: A retrospective study in Suzhou China. **Thrombosis Research**. v.192, p.3–8, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2020.05.006>

GOYAL, Ramesh K. et al. Current targets and drug candidates for prevention and treatment of SARS-CoV-2 (COVID-19) infection. **Rev. Cardiovasc. Med**. v.21, n.3, p.365–384, 2020. [http://DOI:10.31083/j.rcm.2020.03.118](http://doi.org/10.31083/j.rcm.2020.03.118)

GRAY, Christian P; AROSIO, Paolo; HERSEY, Peter. Heavy chain ferritin activates regulatory T cells by induction of changes in dendritic cells. **BLOOD**. v. 99, n. 9, Maio 2002.

GUO, Tao et al. Cardiovascular Implications of Fatal Outcomes of Patients with Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). **JAMA Cardiology**, [S. l.], v. 5, n. 7, p. 811–818, 2020 a. ISSN: 23806591. DOI: 10.1001/jamacardio.2020.1017.

GUO, Yan-Rong; CAO, Qing-Dong; HONG, Zhong-Si; TAN, Yuan-Yang; CHEN, Shou-Deng; JIN, Hong-Jun; TAN, Kai-Sen; WANG, De-Yun; YAN, Yan. The origin, transmission and clinical therapies on coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak – an update on the status. **Military Medical Research**, [S. l.], v. 7, n. 11, p. 1–10, 2020 b. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40779-020-00240-0>.

HANASAND, M. et al. Improved detection of advance oxidation protein products in plasma. **Clinica Chimica Acta**. 413, 901-906, 2012.

HANIF, Waqas et al. Biochemical Markers in COVID-19 in Multan. **Journal of the College of Physicians and Surgeons Pakistan**. v.30, n.10, p.1026-1029, 2020. <https://doi.org/10.29271/jcpsp.2020.10.1026>

HENRY, Brandon Michael; DE OLIVEIRA, Maria Helena Santos; BENOIT, Stefanie; PLEBANI, Mario; LIPPI, Giuseppe. Hematologic, biochemical and immune biomarker abnormalities associated with severe illness and mortality. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, [S. l.], v. 58, n. 7, p. 1021–1028, 2020. ISSN: 14374331.

HU, Ben. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. **Nature Reviews | Microbiology**. v.19, p.141-154, Março 2023. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00459-7>

HUSSAIN, Tarique et al. Oxidative Stress and Inflammation: What Polyphenols Can Do for

Us? **Oxidative Medicine and Cellular Longevity** v.2016, 2016.
<http://dx.doi.org/10.1155/2016/7432797>

Johns Hopkins Center for Communication Programs, 2020. COVID-19 Dashboard by the Center for Systems Science and Engineering (CSSE) at Johns Hopkins University (JHU). Disponível em: <https://coronavirus.jhu.edu/map.html> Acesso em: 14 de abril de 2023

KASUGA, Yusuke et al. Innate immune sensing of coronavirus and viral evasion strategies. **Experimental & Molecular Medicine** v.53, p.723–736, 2021. <https://doi.org/10.1038/s12276-021-00602-1>

KERNAN, Kate F; CARCILLO, Joseph A. Hyperferritinemia and inflammation. **International Immunology**. v.29, n.9, p.401–409, Maio 2017. doi:10.1093/intimm/dxx031

KESIC, Matthew J. et al. Nrf2 expression modifies influenza A entry and replication in nasal epithelial cells. **Free Radical Biology & Medicine**. v.51, p.444–453, 2011. <http://doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.04.027>

LAFORGE, Mireille et al. Tissue damage from neutrophil-induced oxidative stress in COVID-19. **Nature Reviews | Immunology**. v.20, setembro 2020. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0407-1>

LAURIDSEN, Charlotte. From oxidative stress to inflammation: redox balance and immune system. **Poultry Science**. v.98, p.4240–4246, 2019. <http://dx.doi.org/10.3382/ps/pey407>

LEI, Xin Gen et al. Paradoxical Roles Of Antioxidant Enzymes: Basic Mechanisms And Health Implications. **Physiol Rev**, v.96, p.307–364, Dezembro 2015. <http://doi:10.1152/physrev.00010.2014>

LETELIER, Pablo et al. Role Of Biochemical Markers In The Monitoring Of Covid-19 Patients. **J Med Biochem**. v.40, n.2, p.115–128, 2021. <http://DOI:10.5937/jomb0-29341>

LI, Qing, et al. Immune response in COVID-19: what is next? **Cell Death & Differentiation**. v. 29, p. 1107 – 1122, Abril 2022. <https://doi.org/10.1038/s41418-022-01015-x>

LI, Qun et al. Early Transmission Dynamics in Wuhan, China, of Novel Coronavirus–Infected Pneumonia. **The new england journal of medicine**. v.382, n.13, p.1199–1207, Março 2020

LIU, Beiyi et al. Detection of advanced oxidation protein products in patients with chronic kidney disease by a novel monoclonal antibody. **Free Radical Research**. v.45, n.6, p.662–671, 2011. <http://dx.doi.org/10.3109/10715762.2011.564167>

LIU, Jing et al. Longitudinal characteristics of lymphocyte responses and cytokine profiles in the peripheral blood of SARS-CoV-2 infected patients. **EBioMedicine**. v.55, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.102763>

LUO, Jiao et al. Ageing, Age-related Diseases and Oxidative Stress: What to Do Next?, **Ageing Research Reviews**, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2019.100982>

MADDEN, Emily A.; DIAMOND, Michael S. Host cell-intrinsic innate immune recognition of SARSCoV-2. **Current Opinion in Virology**, v.52, p.30–38, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2021.11.002>

MARKLUND, S.; MARKLUND, G. Involvement of the Superoxide Anion Radical in the Autoxidation of Pyrogallol and a Convenient Assay for Superoxide Dismutase. **Eur. J. Biochem.** 47,469-474, 1974.

MARTINUCCI, Oseias da Silva et al. Dispersão Da Covid-19 No Estado Do Paraná. **Hygeia - Revista Brasileira de Geografia Médica e da Saúde**, [S. l.], p. 251–262, 2020. ISSN: 1980-1726. DOI: 10.14393/hygeia0054619.

MCCORD, Joe M. et al. Nrf2 Activator PB125® as a Potential Therapeutic Agent against COVID-19. **Antioxidants**. v.9, n.518, 2020. <http://doi:10.3390/antiox9060518>

MEHTA, Puja; MCAULEY, Daniel F.; BROWN, Michael; SANCHEZ, Emilie; TATTERSALL, Rachel S.; MANSON, Jessica J. COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. **The Lancet**, [S. l.], v. 395, n. 10229, p. 1033–1034, 2020. ISSN: 1474547X. ISBN: 0013402005. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30628-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30628-0).

MENDONÇA, Patricia; SOLIMAN, Karam F. A. Flavonoids Activation of the Transcription Factor Nrf2 as a Hypothesis Approach for the Prevention and Modulation of SARS-CoV-2 Infection Severity. **Antioxidants**. v.9, n.659, 2020. doi:10.3390/antiox9080659

MENG, J., et al. Renin-angiotensin system inhibitors improve the clinical outcomes of COVID-19 patients with hypertension. **Emerg Microbes Infect.** Dezembro de 2020;9(1):757–60.

MERAD, Miriam et al. The immunology and immunopathology of COVID-19. **Science**. v.375, p.1122–1127, Março 2022.

MOLAYI-JABDARAGI, Naeim; ESMAEILNEJAD, Bijan; MOHAMMADI, Vahid. Evaluation of oxidative/nitrosative stress biomarkers and DNA damage in buffaloes naturally infected with *Theileria annulata*. **Microbial Pathogenesis**. v.138, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103821>

MUKHERJEE, Kamalika et al. Detection of Oxidative Stress-Induced Carbonylation in Live Mammalian Cells. **Free Radic Biol Med**. v.84, p.11–21, julho 2015. <http://doi:10.1016/j.freeradbiomed.2015.03.011>

MURALIDHARAN, Sujatha; MANDREKAR, Pranoti. Cellular stress response and innate immune signaling: integrating pathways in host defense and inflammation. **Journal of Leukocyte Biology**, [S. l.], v. 94, n. 6, p. 1167–1184, 2013. ISSN: 0741-5400. DOI: 10.1189/jlb.0313153.

NASAB, Entezar Mehrabi et al. COVID-19's immuno-pathology and cardiovascular diseases. **Journal of Investigative Medicine**. v.71, n.2, p.71–80, [http:// DOI: 10.1177/10815589221141841](http://doi:10.1177/10815589221141841)

NAVARRO-GONZÁLVIZ, J. A.; GARCÍA-BENAYAS, C.; ARENAS, J. Semiautomated Measurement of Nitrate in Biological Fluids. **Clin Chem.**, v. 44, p. 679-681, 1998.

PERICO, Luca et al. Immunity, endothelial injury and complement-induced coagulopathy in COVID-19. **Nature Reviews | Nephrology**. v.17, p.46-64, Janeiro 2021. <https://doi.org/10.1038/s41581-020-00357-4>

PICOLLI, Luca et al. Mapping Neutralizing and Immunodominant Sites on the SARS-CoV-2

Spike Receptor-Binding Domain by Structure-Guided High-Resolution Serology. *Cell*. v.183, p.1024–1042, Novembro 2020. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.09.037>

PISOSCHI, Aurelia Magdalena et al. Oxidative stress mitigation by antioxidants - an overview on their chemistry and influences on health status. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2020. <http://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112891>

PISOSCHI, Aurelia Magdalena; POP, Aneta. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*. v.97, p.55-74, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.04.040>

PITOCOCCO, Dario et al. Oxidative Stress, Nitric Oxide, and Diabetes. *The Review of DIABETIC STUDIES*, v.7, n.1, p.15-25, Janeiro 2010. <https://doi.org/10.1900/RDS.2010.7.15>

PIWOWAR, Agnieszka. Advanced oxidation protein products. Part I. Mechanism of the formation, characteristics and property. *Pol. Merk. Lek.*, v.28, p.166-169, Fevereiro 2010.

POGGIALI, Erika et al. Lactate dehydrogenase and C-reactive protein as predictors of respiratory failure in Covid-19 patients. *Clinica Chimica Acta*, [S. l.], v. 509, n. June, p. 135–138, 2020. ISSN: 18733492. DOI: 10.1016/j.cca.2020.06.012.

POPA-WAGNER, Aurel et al. ROS and Brain Diseases: The Good, the Bad, and the Ugly. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2013. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/963520>

RABELO, Luiza A. et al. Desbalanço Redox: NADPH Oxidase como um Alvo Terapêutico no Manejo Cardiovascular. *Arq Bras Cardiol*. v.94, n.5, p.684-693, 2010.

RAJGOR, Dimple D.; LEE, Meng Har; ARCHULETA, Sophia; BAGDASARIAN, Natasha; QUEK, Swee Chye. The many estimates of the COVID-19 case fatality rate. *The Lancet Infectious Diseases*, [S. l.], v. 20, n. 7, p. 776–777, 2020. ISSN: 14744457. DOI: 10.1016/S1473-3099(20)30244-9. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30244-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30244-9).

SANTOS, Igor de Andrade, et al. Antivirals Against Coronaviruses: Candidate Drugs for SARS-CoV-2 Treatment? *Frontiers in Microbiology*. v.11, Agosto 2020. doi:10.3389/fmicb.2020.01818

SAÚDE, Secretaria de Vigilância em; Saúde. Ministério Da. Infecção Humana pelo Novo Coronavírus (2019-nCoV) Boletim Epidemiológico. *Centro de Operações de Emergências em Saúde Pública*. v.2, 1-23, Fevereiro 2020.

SCHIEBER, Michael; CHANDEL, Navdeep S. ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Current Biology*, [S. l.], v. 24, n. 10, p. R453–R462, 2014. ISSN: 09609822. DOI: 10.1016/j.cub.2014.03.034. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2014.03.034>.

ŚCISKALSKA, Milena et al. The Influence of the Occupational Exposure to Heavy Metals and Tobacco Smoke on the Selected Oxidative Stress Markers in Smelters. *Biol Trace Elem Res*. v.159, p.59–68, 2014. [http:// DOI 10.1007/s12011-014-9984-9](http://doi.org/10.1007/s12011-014-9984-9)

SELMENCI, László. Advanced oxidation protein products (AOPP): novel uremic toxins, or components of the non-enzymatic antioxidant system of the plasma proteome? *Free Radical Research*. v.45, n.10, p.1115–1123, Outubro 2011.

SHANG, Jian et al., Structural basis of receptor recognition by SARS-CoV-2. **Nature**. v.581, p.221-224, Maio 2020. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2179-y>

SHARIF-ASKARI, Narjes Saheb et al. Upregulation of oxidative stress gene markers during SARS-COV-2 viral infection. **Free Radical Biology and Medicine**. v.172, p.688–698, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2021.06.018>

SPOSITO, Benedeta et al. The interferon landscape along the respiratory tract impacts the severity of COVID-19. **Cell**. v.184, p.4953–4968, Setembro 2021. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.08.016>

SUNGNAK, Waradon et al. SARS-CoV-2 entry factors are highly expressed in nasal epithelial cells together with innate immune genes. **Nature medicine**. v.26, p.681-687, Maio 2020. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0868-6>

SUSUKI, Aline Midori et al., Evolução da COVID-19 em Londrina (Paraná – Brasil) entre Março e Agosto de 2020. **Semina: Ciênc. Ex. Tech.**, v. 42, n. 1Supl, p. 5-16, Jan./Dez. 2021. DOI: 10.5433/1679-0375.2021v42n1Suplp5

TAN, Wenjie et al. A Novel Coronavirus Genome Identified in a Cluster of Pneumonia Cases — Wuhan, China 2019–2020. **CCDC Weekly**, v.2, n.4, p.61-62.

TIETZE, F. Enzymic Method for Quantitative Determination of Nanogram Amounts of Total and Oxidized Glutathione: Applications to Mammalian Blood and Other Tissues. **Analytical Biochemistry**. 27, 502-522, 1969.

TORRES, Rogil José de Almeida et al. The nuclear factor E2-related factor 2 and age-related macular degeneration. **Arq Bras Oftalmol**. v.86, n.2, p.178-87, 2023. <http://dx.doi.org/10.5935/0004-2749.20230024>

VALKO, Marian et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. v.39, p.44–84, 2007. <http://doi:10.1016/j.biocel.2006.07.001>

VERDECCHIA, Paolo et al. The pivotal link between ACE2 deficiency and SARS-CoV-2 infection. **European Journal of Internal Medicine**. v.76, p.14–20, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ejim.2020.04.037>

WANG, Dan; LI, Ruifang; WANG, Juan; JIANG, Qunqun; GAO, Chang; YANG, Juan; GE, Lintong; HU, Qing. Correlation analysis between disease severity and clinical and biochemical characteristics of 143 cases of COVID-19 in Wuhan, China: A descriptive study. **BMC Infectious Diseases**, [S. l.], v. 20, n. 1, p. 1–9, 2020. ISSN: 14712334. DOI: 10.1186/s12879-020-05242-w.

WANG, Zijun et al. Naturally enhanced neutralizing breadth against SARS-CoV-2 one year after infection. **Nature**. v.595, p.426-431, Julho 2021. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03696-9>

WOLFF, Dominik et al. Risk factors for Covid-19 severity and fatality: a structured literature review. **Infection** v.49, p.15–28, 2021. <https://doi.org/10.1007/s15010-020-01509-1>

World Health Organization. Coronavirus disease 2019 (COVID-19). **Situation Report** v.51,

Março 2020.

XU, Hao et al. High expression of ACE2 receptor of 2019-nCoV on the epithelial cells of oral mucosa. **International Journal of Oral Science**. v.12, n.8, p.1-5, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41368-020-0074-x>

XU, Meng et al. COVID-19 diagnostic testing: Technology perspective. **Clinical and Translational Medicine**, [S. l.], v. 10, n. 4, p. 1–15, 2020. ISSN: 2001-1326. DOI: 10.1002/ctm2.158.

YANG, Hee-Young; LEE, Tae-Hoon. Antioxidant enzymes as redox-based biomarkers: a brief review. **BMB Rep.**, v.48, n.4, p.200-208, Outubro 2014. <http://dx.doi.org/10.5483/BMBRep.2015.48.4.274>

YANG, Xiaobo 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** v.8, p.475–81, Fevereiro 2020. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(20\)30079-5](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(20)30079-5)

ZATTI, Pedro Henrique; FERLITO, João Vitor; BRANCO, Cátia dos Santos. estudo do papel do estresse oxidativo e dos antioxidantes na infecção por SARS-CoV-2: uma revisão sistemática. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 8, 2022. <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i8.31346>

ZENG, Furong et al. Association of inflammatory markers with the severity of COVID-19: A meta-analysis. **International Journal of Infectious Diseases**. v.96, n.2020, p.467–474, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.05.055>

ZHOU, Peng et al., A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. **Nature**. v.549, p.270-273, Fevereiro 2020. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7>

ANEXOS

ANEXO A

Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



Comitê de Ética em
Pesquisa Envolvendo
Serres Humanos

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
LONDRINA - UEL



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Investigação de fatores genéticos e imunológicos na infecção por SARS-CoV-2: associação com o prognóstico, morbidade e mortalidade

Pesquisador: Andréa Name Colado Simão

Área Temática:

Versão: 5

CAAE: 31656420.0.0000.5231

Instituição Proponente: CCS - Departamento de Patologia, Análises Clínicas e Toxicologias

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.629.527

Apresentação do Projeto:

Trata-se de emenda de projeto já aprovado:

1. Inclusão de pesquisadores: serão inseridos novos pesquisadores ao grupo de pesquisa pois possuem experiência na realização específica das avaliações laboratoriais propostas:

- Profa Dra. Jeane Eliete Laguila Visentainer e Prof. Dr. Quirino Alves de Lima Neto docentes da Universidade Estadual de Maringá (UEM) serão responsáveis pela genotipagem do sistema HLA em seus respectivos laboratórios na UEM - Prof. Dr. David Livingstone A. Figueiredo: será responsável pelo sequenciamento viral e do exoma humano.

2. Inclusão de novos objetivos:

- Associar a análise microbiológica de amostras biológicas de pacientes com COVID-19 à sua evolução clínico-laboratorial e ao desfecho do período de internação.
- Comparar os marcadores de estresse oxidativo em pacientes de acordo com a gravidade da doença;
- Determinar polimorfismos de genes HLA classe I (A, B e C) e de classe II (DR e DQ)
- Investigar se as alterações genéticas do SARS-CoV-2 e de seus receptores estão correlacionadas com a evolução clínica dos paciente com COVID-19.
- Classificar, por meio de abordagem genômica, os subtipos de SARS-CoV-2 em uma amostragem de pacientes dos estados do Paraná e de São Paulo. - Caracterizar o perfil de expressão global de miRNAs e mRNAs de linfócitos de pacientes da coorte.

Endereço: LABESC - Sala 14

Bairro: Campus Universitário

UF: PR

Município: LONDRINA

CEP: 86.057-970

Telefone: (43)3371-5455

E-mail: cep268@uel.br