



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

LIARA FREITAS CAVALCANTI

**DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DE UM MÉTODO
QUILUMINESCENTE PARA QUANTIFICAÇÃO DE GSH E
PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO EM AMOSTRAS DE
PACIENTES COM COVID-19 ADMITIDOS NA UTI.**

LIARA FREITAS CAVALCANTI

**DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DE UM MÉTODO
QUIMILUMINESCENTE PARA QUANTIFICAÇÃO DE GSH E
PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO EM AMOSTRAS DE
PACIENTES COM COVID-19 ADMITIDOS NA UTI.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Patologia Experimental.

Orientador: Prof. Dr. Rubens Cecchini

Londrina
2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

C376d Cavalcanti, Liara Freitas.
Desenvolvimento e aplicação de um método quimiluminescente para quantificação de GSH e peróxido de hidrogênio em amostras de pacientes com COVID-19 admitidos na UTI / Liara Freitas Cavalcanti. - Londrina, 2021. 63 f. : il.

Orientador: Rubens Cecchini.
Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2021.
Inclui bibliografia.

1. Estresse oxidativo - Tese. 2. Patologia experimental - Tese. 3. Covid-19 - Tese. 4. Método quimiluminescente - Tese. I. Cecchini, Rubens . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. III. Título.

CDU 616

LIARA FREITAS CAVALCANTI

**DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DE UM MÉTODO
QUIMILUMINESCENTE PARA QUANTIFICAÇÃO DE GSH E
PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO EM AMOSTRAS DE
PACIENTES COM COVID-19 ADMITIDOS NA UTI.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Patologia Experimental.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Rubens Cecchini
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof^a. Dr^a. Alessandra Lourenço Cecchini
Armani
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof^a Dr^a. Poliana Camila Marinello
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof^a. Dr^a. Flávia Alessandra Guarnier
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof^a. Dr^a. Larissa Juliani Sanches
Universidade Filadélfia – UniFil

Londrina, 19 de julho de 2021.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho será primeiramente dedicado ao meu pai, que infelizmente foi vítima da COVID-19 em 2020. Ele fez tudo se tornar possível: a minha educação, a oportunidade de fazer uma faculdade fora da minha cidade e continuar estudando depois de formada para finalizar o meu mestrado. Infelizmente ele não está aqui hoje pra ver de perto esse capítulo da minha vida sendo concluído, mas sei que ele sempre teve muito orgulho de mim e agora não seria diferente. Obrigada por tudo, pai!

Gostaria de dedicar também à minha mãe Adriana e meu irmão Murilo que sempre me apoiaram e acreditaram no meu sonho de ser docente.

Ao meu namorado João Victor, pela paciência, por ser tão parceiro, por sempre apoiar minhas decisões, acreditar em mim mesmo quando eu mesma não acreditava e por não me deixar desistir.

Às minhas amigas Débora e Larissa que mesmo de longe me incentivaram e me ajudaram de alguma forma nos momentos de dificuldade.

Aos meus amigos Isabela, Maria Isabel, Rachel e Fabrício, que estiveram muitos próximos a mim nesses dois anos e fizeram meus dias no mestrado mais felizes.

Ao meu orientador Prof. Dr. Rubens Cecchini pelos dois anos de orientação. Conheci um pesquisador e um professor incrível e aprendi muito com o senhor.

Aos meus colegas de laboratório Thiago e Josi que contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao técnico Jesus por toda a ajuda e prestatividade na realização de todos os experimentos.

À CAPES e ao CNPq pela bolsa concedida.

CAVALCANTI, Liara Freitas. **Desenvolvimento e aplicação de um método quimiluminescente para quantificação de GSH e peróxido de hidrogênio em amostras de pacientes com COVID-19 admitidos na UTI.** 2021. 61 f. Dissertação de mestrado (Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021.

RESUMO

O estresse oxidativo (EO) está possivelmente envolvido na patogênese da COVID-19, doença declarada como pandemia pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em março de 2020. As concentrações de glutathiona (GSH) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) são importantes indicativos de estresse oxidativo, e a dosagem dos mesmos pode elucidar os mecanismos pelos quais o SARS-CoV-2 (corona vírus) causa danos aos tecidos. A quantificação dessas moléculas é realizada por técnicas pouco sensíveis ou de alto custo e complexidade de execução. Desta forma, este trabalho teve como objetivo demonstrar o possível envolvimento do EO na COVID-19 através da quantificação de GSH em eritrócitos e H_2O_2 no plasma sanguíneo utilizando um método quimiluminescente altamente sensível e de baixo custo desenvolvido em nosso laboratório. O sistema luminol-ferricianeto foi escolhido para a reação quimiluminescente devido ao custo mínimo, fácil armazenamento dos reagentes e sua utilização de forma consistente para quantificação de dopamina na urina e ferro em amostras de água. A temperatura da reação, o pH e concentração dos reagentes, a precipitação de proteínas e diluição das amostras foram padronizados previamente para obtenção de resultados satisfatórios. As amostras foram obtidas de pacientes com COVID-19 admitidos na UTI do Hospital Universitário de Londrina. De forma geral, apenas uma amostra foi coletada de cada pacientes, mas, em alguns casos, uma segunda amostra foi coletada. Após as coletas, as amostras de ambas as coletas foram agrupadas, formando o grupo COVID, e as amostras da primeira coleta foram também analisadas de acordo com o desfecho clínico do paciente. O grupo controle foi formado por voluntários saudáveis recrutados no campus da Universidade Estadual de Londrina ou provenientes de um banco de dados. As concentrações de GSH no grupo COVID, no grupo óbito e alta foram similares a do grupo controle. Em contrapartida, os níveis de H_2O_2 apresentaram uma redução significativa de 10 vezes no grupo COVID, 3.7 vezes no grupo alta e 23 vezes no grupo óbito em relação ao controle. Além disso, a concentração de H_2O_2 foi 6 vezes menor no grupo óbito comparado ao grupo alta. Por fim, houve uma redução da atividade da catalase de 1.4 vezes em ambos os grupos: COVID e óbito, comparados ao controle. Conclui-se que houve uma boa linearidade do método proposto utilizando o luminol (10 μ M) preparado em tampão carbonato de sódio (pH 9,5), e o ferricianeto de potássio (4,5 mM) a 21 – 24°C e pode-se supor que o estresse oxidativo está envolvido na patogênese da COVID-19.

Palavras-chaves: SARS-CoV-2; estresse oxidativo; hemácia; luminol; plasma sanguíneo.

CAVALCANTI, Liara Freitas. **Development and application of a chemiluminescent method to quantify GSH and hydrogen peroxide in COVID-19 patients' samples admitted to the ICU.** 61 p. Masters' dissertation (Postgraduate Program in Experimental Pathology) – State University of Londrina, Londrina, 2021.

ABSTRACT

Oxidative stress (OS) is possibly involved in the pathogenesis of COVID-19, a disease declared as pandemic by World Health Organization (WHO) in march 2020. The concentrations of glutathione (GSH) and hydrogen peroxide (H_2O_2) are important indicators of oxidative stress, and its dosages could elucidate the mechanisms which SARS-Cov-2 (corona virus) causes damages to tissues. The quantification of these molecules is performed by low sensitive or high cost and complex techniques. Thus, this work aimed to demonstrate the possible involvement of OS in COVID-19 through quantification of GSH in erythrocytes H_2O_2 in blood plasma using a chemiluminescence method highly sensitive and low cost developed in our laboratory. The luminol-potassium ferricyanide system was chosen due to its low cost, easy storage of the reagents and its use consistently to quantify dopamine in urine and iron in water samples. Temperature of reaction, pH and concentration of reagents, protein precipitation and samples dilutions were standardized to obtained satisfactory results. The COVID-19 blood samples were obtained from patients admitted to the ICU from University Hospital of Londrina. In general, only one sample was obtained from each patient, however, in some cases, a second one was collected. After, the samples from both collections were grouped, forming the COVID group and the samples from first collection were also analyzed according to the clinical outcome of each patient. The control group consisted of healthy volunteers recruited in the Londrina State University campus or were from a database. GSH concentrations in COVID group, died and discharged groups were similar to control group. On the other hand, H_2O_2 levels showed a 10-fold reduction in COVID group, 3.7 in discharged group and 23 in died group compared to the control. Moreover, the concentration of H_2O_2 was 6 times lower in died group compared to discharged. Lastly, there was a 1.4-fold reduction in catalase activity in both COVID group and died group, compared to the control. We conclude that there was a good linearity of the proposed method using the luminol (10 μ M) prepare in sodium carbonate buffer (pH 9.5) and the potassium ferricyanide (4.5 mM) at 21–24 °C and we can assume that the OS is involved in the pathogenesis of COVID-19.

Key words: SARS-Cov-2; erythrocytes; luminol; oxidative stress; blood plasma.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Reações realizadas pelas enzimas superóxido dismutase (SOD) (1) e catalase (2)	15
Figura 2 – Ciclo catalítico da glutatona: conversão de GSH a GSSG pelas enzimas glutatona peroxidase (GSH-px) ou glutatona oxidase (GO) e redução de GSSG a GSH pela enzima glutatona redutase (GR)	16
Figura 3 – Redução da molécula de oxigênio	18
Figura 4 – Reação de Fenton.....	18
Figura 5 – Estrutura química da glutatona.....	21
Figura 6 – Síntese de GSH	22
Figura 7 – Reação do GSH com o DTNB.....	23
Figura 8 – Oxidação do luminol.....	27
Figura 9 – Reação do luminol com o peróxido de hidrogênio catalisada pelo ferricianeto	28
Figura 10 – Estrutura do SARS-Cov-2	29
Figura 11 – Ciclo de vida do SARS-Cov-2	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resumo dos principais métodos utilizados para a quantificação de H ₂ O ₂ , suas vantagens e desvantagens	20
Tabela 2 – Resumo dos principais métodos utilizados para a quantificação de GSH, suas vantagens e desvantagens	25

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α -HHP	α -hidroxi hidroperóxido
8-OHdG	8-hidroxi-2'-desoxiguanosina
AP-1	Proteína ativadora 1
APC	Célula apresentadora de antígenos
Cu^{2+}	Íon cobre
DTNB	Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico
ECA-2	Enzima conversora de angiotensina 2
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FIA	Análise em fluxo
GCL	γ -glutamilcisteína sintetase
GPx	Glutaciona peroxidase
GO	Glutaciona oxidase.
GR	Glutaciona redutase
GSH	Glutaciona reduzida
GSSG	Glutaciona oxidada
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
HE	Hemaglutinina esterase
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
Keap 1	Proteína 1 associada à ECH do tipo <i>Kelch</i>
MDA	Malondialdeído
N_2	Nitrogênio
NEM	N-etilmaleimida
NF-kB	Fator nuclear kappa B
Nrf2	Fator de transcrição nuclear associado ao E2
NO	Óxido nítrico
O_2	Oxigênio
$\text{O}_2^{\cdot-}$	Ânion radical superóxido
OH^{\cdot}	Radical hidroxil
OMS	Organização mundial da saúde
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinase.
QL	Quimiluminescência

SARS-CoV-2	Corona vírus
SOD	Superóxido dismutase
TNB	Ácido 2-nitro-5-tiobenzóico
TNF- α	Fator de necrose tumoral α
UTI	Unidade de terapia intensiva

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	14
1.1	ESTRESSE OXIDATIVO	14
1.2	PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO	17
1.3	GLUTATIONA	20
1.4	SISTEMA LUMINOL FERRICIANETO DE POTÁSSIO	25
1.6	COVID-19	29
2	JUSTIFICATIVA	33
3	OBJETIVOS	34
3.1	OBJETIVOS GERAIS	34
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
4	RESULTADOS	35
5	ARTIGO – Reduced H₂O₂ levels in blood of COVID-19 patients at admission to the ICU	37
6	CONCLUSÃO	56
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

1. INTRODUÇÃO

1.1. ESTRESSE OXIDATIVO

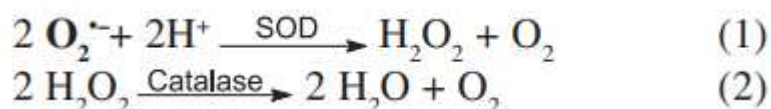
O estresse oxidativo é definido como um distúrbio no equilíbrio pró-oxidante – antioxidante em favor do primeiro (SIES, 1985) ou como uma interrupção da sinalização e controle redox (JONES, 2006). O controle redox corresponde a um equilíbrio entre a produção de espécies reativas e a neutralização das mesmas pelas moléculas antioxidantes (MISHRA *et al.*, 2018; MOLONEY, COTTER, 2018). As moléculas pró-oxidantes são classificadas como radicalares e não radicalares (MAGDER, 2006) e os antioxidantes como enzimáticos e não enzimáticos, e encontram-se quase que totalmente no citoplasma das células (PATLEVIC *et al.*, 2016).

De forma geral, os oxidantes são formados a partir da redução parcial do oxigênio na cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria, durante a fagocitose, e pela atividade de enzimas como a NADPH oxidase, xantina oxidase e as do citocromo P450 (MAGDER, 2006; QIANG, 2013; MOLONEY, COTTER, 2018). Os radicais livres apresentam um número ímpar de elétrons na sua camada de valência, que corresponde ao último orbital atômico (FERREIRA & MATSUBARA, 1997). Esse desemparelhamento torna-o altamente reativo, fazendo com que ele reaja com outras moléculas das nossas células, afim de doar o elétron excedente (se reduzindo) ou receber um elétron (se oxidando) (MCCORD, 2000). Nessa classe de moléculas estão o radical hidroxil (o mais reativo e com maior potencial danoso), radical peroxil, radical hidroperoxil, radical superóxido (produzido durante a ativação de leucócitos) e radical alcóxil (BARRY HALLIWELL & JOHN GUTTERIDGE, 1999). As espécies reativas podem ser de oxigênio ou nitrogênio, possuindo a capacidade de reagir com outras moléculas, como o ferro, gerando radicais livres (FERREIRA & MATSUBARA, 1997). Entre as espécies de oxigênio estão o peróxido de hidrogênio, ácido hipocloroso, oxigênio *singlet* e peroxinitrito (BARRY HALLIWELL & JOHN GUTTERIDGE, 1999). Em quantidades moderadas, as espécies reativas são importantes para o funcionamento normal do organismo e de vias de sinalização como a via do fator de necrose tumoral α (TNF- α), via da angiotensina, via do fator nuclear kappa B (NF κ B), além de regularem a

1 proliferação e a sobrevivência celular (MAGDER, 2006; REUTER *et al.*, 2010;
2 SOSA *et al.*, 2013).

3 Em situações em que o equilíbrio redox é rompido, as moléculas pró-
4 oxidantes podem provocar modificações bioquímicas devido a reação das
5 mesmas com proteínas, lipídeos e DNA das nossas células (REUTER *et al.*,
6 2010). Reagindo com o DNA celular ou mitocondrial, ocorre a formação do
7 produto 8-hidroxi,2-deoxiguanosina (8OHdG), proveniente da oxidação do
8 material genético (AITKEN *et al.*, 2014) além de quebras na sua estrutura,
9 gerando mutações (SANTOS, 2008). A oxidação de lipídeos de membrana forma
10 o malondialdeído (MDA), prejudicando a integridade e a permeabilidade da
11 membrana plasmática; e a oxidação de lipoproteínas do sangue pode contribuir
12 para a formação de placas ateroscleróticas (REUTER *et al.*, 2010; MOLONEY,
13 COTTER, 2018; SANTOS, 2008).

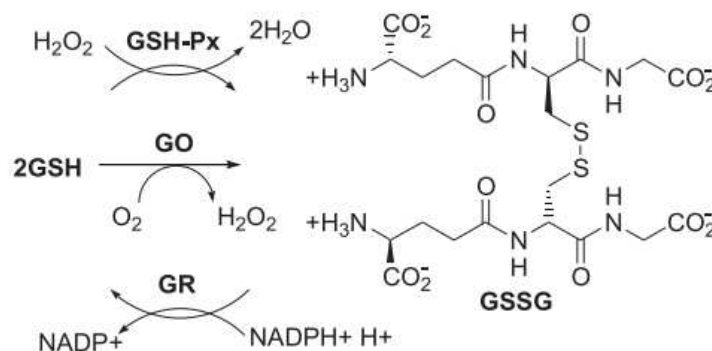
14 As moléculas antioxidantes são substâncias que atrasam, previnem ou
15 removem o dano oxidativo em baixas concentrações (BARRY HALLIWELL &
16 JOHN GUTTERIDGE, 1999). Dentre as defesas enzimáticas estão inclusas a
17 superóxido dismutase (SOD), catalase, glutathione redutase (GR) e glutathione
18 peroxidase (GPx) (BIRBEN *et al.*, 2012). A SOD é uma metaloenzima localizada
19 em diversos compartimentos celulares e que apresenta 3 isoformas: SOD1
20 (Cu/ZnSOD), presente no citosol, SOD2 (MnSOD), presente na mitocôndria e
21 SOD 3 (Cu/ZnSOD), presente no meio extracelular (FUKAI, USHIO-KUKAI,
22 2011; MOLONEY, COTTER, 2018). A principal função da SOD é converter o
23 ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) em H_2O_2 e O_2 , sendo a principal linha de defesa contra
24 esse radical (Figura 1) (MAGDER, 2006; MISHRA *et al.*, 2018). A catalase é uma
25 enzima presente no citosol e nos peroxissomos, que utiliza NADPH como
26 substrato para a conversão de H_2O_2 em água e oxigênio (Figura 1), podendo
27 atuar também na decomposição de hidroperóxidos e peroxinitrito e na oxidação
28 do óxido nítrico (KIRKMAN, GAETANI, 2007; GLORIEUX, CALDERON, 2017).



29

Figura 1 – Reações realizadas pelas enzimas superóxido dismutase (SOD) (1) e catalase (2).
Fonte: VASCONCELOS *et al.*, 2007.

1 A glutathiona peroxidase (GPx) é responsável por reduzir indiretamente o
 2 peróxido de hidrogênio durante o processo de oxidação da GSH (Figura 2)
 3 (HUBER, ALMEIDA, 2008). A glutathiona oxidase (GO) é uma enzima FAD
 4 dependente responsável pela oxidação do GSH a GSSG (Figura 2) (WU,
 5 BATIST, 2013; OESTREICHER, MORGAN, 2018). A glutathiona redutase (GR) é
 6 uma flavoproteína que utiliza a nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato
 7 reduzida (NADPH) como substrato para converter GSSG a GSH (Figura 2),
 8 processo fundamental para a manutenção das defesas antioxidantes, já que
 9 GSSG é formada após a exposição de GSH ao agente oxidante (BARREIROS,
 10 DAVID, DAVID, 2006, FERREIRA, MATSUBARA, 1997).



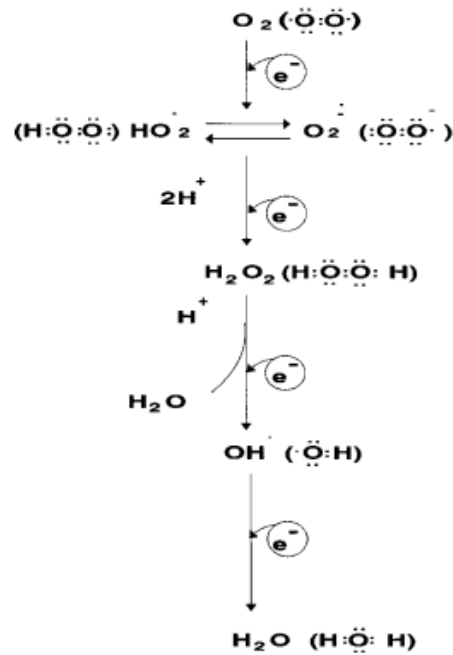
12 **Figura 2** – Ciclo catalítico da glutathiona: conversão de GSH a GSSG pelas enzimas glutathiona
 13 peroxidase (GSH-px) ou glutathiona oxidase (GO) e redução de GSH a GSGG pela enzima
 14 glutathiona redutase (GR). Fonte: HUBER e ALMEIDA, 2008.

15 A glutathiona, a vitamina C, a vitamina E são exemplos de antioxidantes
 16 não enzimáticos. A glutathiona, um tripeptídeo de baixo peso molecular, composto
 17 por cisteína, glicina e ácido glutâmico, está presente intracelularmente na forma
 18 oxidada (GSSG) e reduzida (GSH), participando da redução de espécies reativas
 19 (HUBER, ALMEIDA, 2008; OESTREICHER, MORGAN, 2018;). A vitamina C
 20 promove proteção contra danos oxidativos, neutralizando o radical hidroxil e o
 21 peróxido de hidrogênio e auxiliando na redução de GSSG a GSH (MIRONCZUK-
 22 CHODAKOWSKA, WITKOWSKA, ZUJKO, 2018). A vitamina E é um
 23 antioxidante localizado nas membranas celulares e possui a capacidade de
 24 reduzir os radicais peroxil formados durante lipoperoxidação de membranas
 25 (MOUSSA, JUDEH, AHMED, 2019).

1 Os níveis de antioxidantes intracelulares são regulados através de vias de
2 sinalização, como a via do fator nuclear relacionado ao eritróide 2 (Nrf2). A
3 ativação desta via aumenta a expressão e a atividade da SOD, catalase e GPx,
4 além de aumentar a produção de GSH e a conversão de GSSG a GSH (VYSAKH
5 *et al.*, 2016; MOLONEY, COTTER, 2018). No citoplasma, a associação da
6 proteína Nrf2 com duas proteínas Keap1, a encaminha para degradação
7 proteossomal (MÁRTON *et al.*, 2018). Quando há um aumento das espécies
8 reativas, as cisteínas presentes em Keap1 são oxidadas, fazendo com que se
9 dissociem do Nrf2 (QIANG, 2013; MÁRTON *et al.*, 2018). Uma vez livre, o Nrf2
10 se transloca para o núcleo da célula, onde se liga a promotores associados com
11 a transcrição de genes envolvidos nas defesas antioxidantes (QIANG, 2013;
12 HAHN, OLIVEIRA, BOCK, 2017; MÁRTON *et al.*, 2018).

13 1.2. PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO

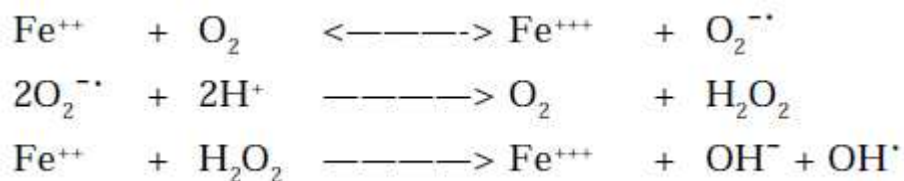
14 O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é uma espécie reativa, isolada pela
15 primeira vez em 1818 por Thénard, formada a partir da redução do oxigênio na
16 cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria (Figura 3) ou a partir da
17 dismutação do ânion superóxido pela SOD (GOUGH, COTTER, 2011; ROJKIND
18 *et al.*, 2002; HIRAKAWA, 2018). Desde a sua descoberta, ficou claro que em
19 altas concentrações, pode representar um risco para nossas células (GOUGH,
20 COTTER, 2011). Isso porque apesar de ser uma molécula estável e com uma
21 baixa constante de velocidade de reação, o peróxido pode participar ativamente
22 da geração de moléculas altamente reativas capazes de interagir com
23 membranas biológicas, inclusive membrana de eritrócitos, levando a
24 modificações oxidativas das mesmas (FERREIRA, MATSUBARA, 1997). Em
25 contato com o íon cobre (Cu^{2+}), o peróxido de hidrogênio é capaz de causar
26 modificações em bases nitrogenadas, com consequente dano ao DNA
27 (HIRAKAWA, 2018).



1

2 **Figura 3** – Redução da molécula de oxigênio. Fonte: FERREIRA, MATSUBARA, 1997

3 Um grande potencial oxidativo do peróxido está relacionado a sua
 4 capacidade de ser facilmente convertido em radical hidroxil na presença de ferro
 5 e outros metais de transição através da reação de Fenton (Figura 4). O radical
 6 hidroxil (OH•) é o radical livre mais reativo, capaz de reagir com proteínas,
 7 lipídeos de membrana e DNA (GUPTA, 2015). O peróxido de hidrogênio pode
 8 ser convertido também a ácido hipocloroso pela enzima mieloperoxidase
 9 produzida por células fagocíticas. Esse produto formado pode gerar lesão
 10 tecidual e resposta inflamatória (FORMAN, ZHANG, RINNA, 2009).



11

12 **Figura 4** – Reação de Fenton. Fonte: FERREIRA e MATSUBARA, 1997.

13 Em quantidades moderadas, o H₂O₂ participa da regulação de vias de
 14 transdução de sinais, oxidando proteínas como as fosfatases, quinases e
 15 tiorredoxinas, modificando suas atividades (ABO *et al.*, 2011). Pode também
 16 contribuir para a degradação proteossomal de algumas proteínas, oxidando os
 17 grupamentos cisteína e metionina (ROJKIND *et al.*, 2002). Outra forma do
 18 peróxido de hidrogênio participar da regulação da atividade de enzimas e das

1 funções de proteínas é através da indução da formação de óxido nítrico (NO),
2 responsável pela nitrosilação das mesmas (ROJKIND *et al.*, 2002). Além disso,
3 essa espécie reativa é capaz de ativar o fator de transcrição AP-1, responsável
4 por regular ciclo e morte celular (ROJKIND *et al.*, 2002).

5 Independentemente do local de geração (intra ou extracelularmente), o
6 peróxido de hidrogênio é removido dentro das células. O principal *scavenger*
7 dessa espécie reativa é a glutathione, graças a seu grupamento cisteína, sendo
8 utilizada pelas enzimas antioxidantes durante a degradação do peróxido
9 (FORMAN, BERNARDO, DAVIES, 2016). As enzimas que participam desse
10 processo de detoxificação são a catalase, que decompõe o peróxido em $H_2O +$
11 O_2 e a GPx (ROJKIND *et al.*, 2002). Graças a essas defesas, as concentrações
12 intracelulares de H_2O_2 se mantêm muito baixas, a níveis de nanomolar
13 (FORMAN, BERNARDO, DAVIES, 2016).

14 A quantificação de H_2O_2 por diversos métodos ainda vem sendo
15 estudada e a maioria deles exige preparações complexa, como o rompimento de
16 estruturas celulares (ZHANG *et al.*, 2019). A detecção e quantificação do
17 peróxido de hidrogênio pode ser fundamental para entender diversos processos
18 fisiológicos e patológicos (ABO *et al.*, 2011). As concentrações desse composto
19 no plasma humano variam de 0,25 a 7 μM , proveniente principalmente do
20 metabolismo da NADPH e xantina oxidases, plaquetas e células endoteliais
21 (FORMAN, BERNARDO, DAVIES, 2016). Xiao *et al.*, 2016 desenvolveu técnicas
22 envolvendo fluorescência e microscopia confocal para identificação de peróxido
23 de hidrogênio na mitocôndria. Um ensaio de fluorescência de baixo custo e alta
24 sensibilidade utilizando ácido fólico para detectar a presença de H_2O_2 em uma
25 amostra, foi descrito por Hirakawa, 2006. Esse tipo de ensaio apresenta
26 vantagens por ser altamente sensível e não invasivo. Porém, o sucesso da
27 quantificação depende da especificidade do fluoróforo em se ligar ao peróxido e
28 da sua sensibilidade a variações de pH, o que pode interferir na fluorescência
29 (YE *et al.*, 2020). Métodos de fluorescência para quantificação *in vivo* também
30 vêm sendo desenvolvidos, utilizando fluoróforos mais específicos (distinguindo
31 o H_2O_2 de outras ERO), porém, os reagentes e equipamentos utilizados
32 apresentam alto custo, além da alta complexidade no preparo das amostras
33 (ABO *et al.*, 2011).

1 Os métodos baseados na quimiluminescência são os mais sensíveis e
 2 capazes de detectar até mesmo baixas concentrações de peróxido (DIAZ,
 3 SANCHEZ, GARCIA, 1996). Justamente por ser altamente sensível, as
 4 condições como pH e pureza dos reagentes e temperatura do ambiente, devem
 5 ser rigorosamente padronizadas para evitar interferências (DIAS, 2001). Um dos
 6 primeiros métodos para dosagem de peróxido de hidrogênio por
 7 quimiluminescência foi descrito por Chandross, 1963, utilizando o cloreto de
 8 oxalila. O sistema luminol-peroxidase já foi utilizado para quantificação de
 9 concentrações de H₂O₂ variando de 0 a 0,67 μM, técnica descrita por Diaz,
 10 Sanchez e Garcia, 1996. Nessa metodologia só foi possível quantificar
 11 concentrações maiores de H₂O₂ com o uso de substâncias capazes de aumentar
 12 a emissão de luz do sistema. Além disso, já foi relatado que o uso de ferricianeto
 13 para a detecção de H₂O₂ por quimiluminescência demonstra boa linearidade em
 14 concentrações variando de 1 a 8 μM (DIAZ, SANCHEZ, GARCIA, 1996).

Método	Vantagens	Desvantagens
Fluorescente <i>in vitro</i>	Altamente sensível e não invasivo.	Fluoróforos precisam ser altamente específico e sofrem modificações de acordo com o pH.
Fluorescente <i>in vivo</i>	Fluoróforos mais específicos, alta sensibilidade.	Reagentes e equipamentos caros, preparo complexo das amostras.
Quimiluminescência	Altamente sensível, baixa complexidade, rápido	Requer condições estáveis e bem estabelecidas (pH, temperatura, pureza dos reagentes)

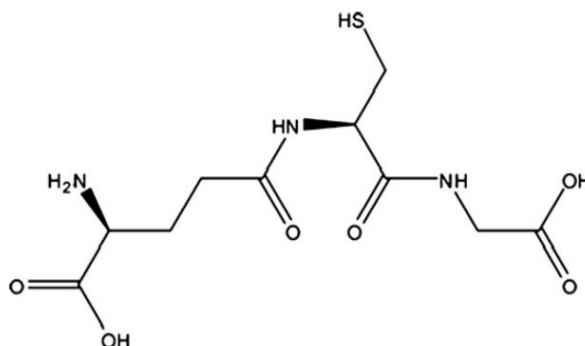
15 **Tabela 1** – Resumo dos principais métodos utilizados para a quantificação de H₂O₂, suas
 16 vantagens e desvantagens.

17

18 1.3. GLUTATIONA

19 γ-L-glutamil-L-cisteinil-glicina, também conhecida como glutathiona, é uma
 20 molécula de baixo peso molecular formada pelos aminoácidos glutamato,
 21 cisteína e glicina (Figura 5) (FORMAN, ZHANG, RINNA, 2009). Está presente no
 22 sangue e nos tecidos principalmente na forma reduzida (GSH), mas também na
 23 forma oxidada (GSSG), sendo uma das mais importantes defesas antioxidantes
 24 (APPENZELLER-HERZOG, 2011). A forma reduzida representa mais de 99% da
 25 glutathiona total nos eritrócitos, com concentrações variando de 0,4 a 3 mM. Isso

1 porque a forma oxidada não atravessa facilmente membranas celulares (VAN
2 T'ERVE *et al.*, 2013). No plasma, a quantidade desse antioxidante é muito baixa,
3 a níveis micromolares (FORMAN, ZHANG, RINNA, 2009).

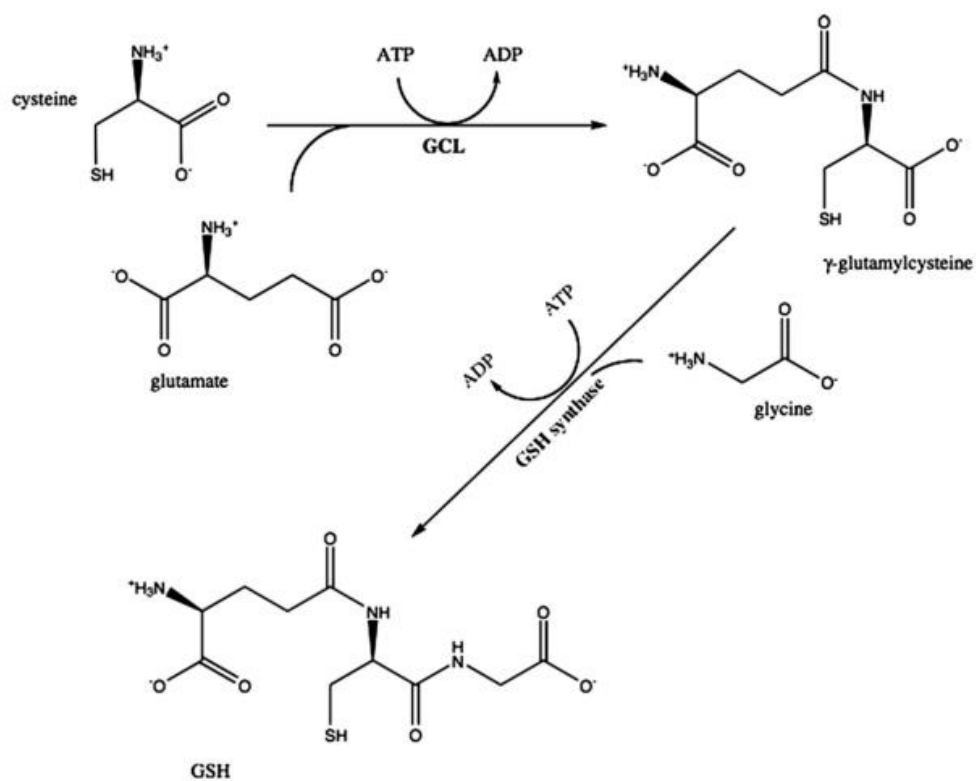


4

5 **Figura 5** – Estrutura química da glutathiona. Fonte: FORMAN, ZHANG, RINNA, 2009.

6 Sua capacidade antioxidante se dá principalmente pela presença do
7 grupamento SH (tiol) na cadeia lateral da molécula de cisteína (APPENZELLER-
8 HERZOG, 2011). Essa conformação facilita a reação com o sítio ativo de
9 enzimas e permite a oxidação de moléculas como o peróxido de hidrogênio,
10 processo catalisado pela glutathiona peroxidase, formando GSSG (ULRICH,
11 JAKOB, 2020). Além disso, participa da síntese de proteínas e de DNA, do
12 metabolismo do ácido ascórbico, na regulação da apoptose, na manutenção da
13 comunicação intercelular, na detoxificação contra xenobióticos, além de
14 funcionar como cofator para diversas enzimas (FORMAN, ZHANG, RINNA,
15 2009; ENSAF, KHAYAMIAN, HASANPOUR, 2008; BARRY HALLIWELL & JOHN
16 GUTTERIDGE, 1999).

17 Sua síntese acontece no citosol das células em duas etapas: (1) a enzima
18 γ -glutamilcisteína sintetase (GCL) faz a junção da molécula de cisteína com a
19 molécula de glutamato; (2) o produto formado (γ -glutamilcisteína) é convertido a
20 GSH, com adição do grupamento glicina a molécula, processo mediado pela
21 glutathiona sintetase (Figura 6) (FORMAN, ZHANG, RINNA, 2009; BARRY
22 HALLIWELL & JOHN GUTTERIDGE, 1999). Esse processo é regulado de
23 acordo com a disponibilidade de cisteína através de *feedback* negativo exercido
24 na enzima γ -glutamilcisteína sintetase pelo próprio GSH (TESKEY *et al.*, 2018).



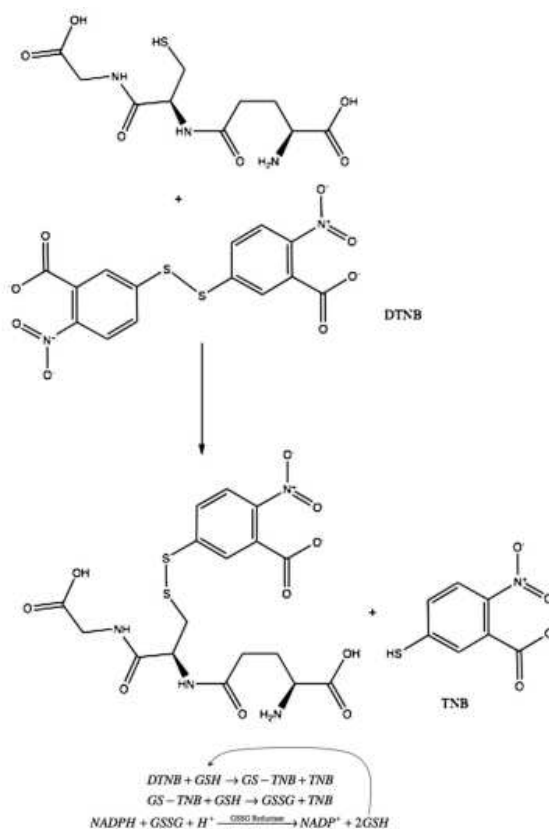
1

2 **Figura 6** – Síntese de GSH. Fonte: FORMAN, ZHANG, RINNA, 2009

3 A dosagem de GSH é extremamente importante e deve ser específica e
 4 capaz de diferenciar essa molécula de outros tióis (HUBER, ALMEIDA, 2008).
 5 Isso porque o grupamento tiol encontra-se muito mais disponível na molécula de
 6 GSH do que em outras proteínas, exercendo uma função antioxidante muito mais
 7 significativa (ULRICH, JAKOB, 2020). Para isso, a precipitação de proteínas da
 8 amostra antes das análises é fundamental, permitindo a purificação da mesma,
 9 aumentando a qualidade dos resultados (JIANG, HE, FOUNTOULAKIS, 2004).
 10 Baixas concentrações de GSH, altas concentrações de GSSG e a diminuição na
 11 razão GSH/GSSG funcionam como um indicador de doenças e estresse
 12 oxidativo. Além disso, baixos níveis de GSH podem contribuir para progressão
 13 de doenças neurodegenerativas, inflamatórias, pulmonares e cardiovasculares
 14 devido ao aumento do dano oxidativo causado pela diminuição da neutralização
 15 das ERO (BALLATORI *et al.*, 2009; SCHOTT, *et al.* 2007).

16 Diversas técnicas podem ser empregadas para quantificação da
 17 glutatona reduzida, desde análises cromatográficas, colorimétricas e
 18 espectrofotométricas. O método mais utilizado em amostras biológicas é um
 19 método espectrofotométrico baseado na utilização do DTNB (também conhecido

1 como “reagente de Ellman”), padronizado por Tietze em 1969. Este ensaio é
 2 baseado na reação do GSH com o DTNB que produz uma molécula de cor
 3 amarelada, o TNB, que emite luz a 412 nm, podendo ser quantificada (Figura 7).
 4 A formação de TNB é proporcional a quantidade de GSH na amostra (TIETZE,
 5 1969). Além disso, Rahman, Kode, Biswas, 2007 propuseram um
 6 aperfeiçoamento para a técnica de Tietze. O protocolo consiste em utilizar a
 7 glutiona redutase que converte o GSSG em GSH, que reage novamente com
 8 o DTNB. Desta forma, é possível quantificar a glutiona total da amostra, já que
 9 a quantificação direta de GSSG é mais difícil devido a proporção de glutiona
 10 reduzida ser muito maior do que a da oxidada (RAHMAN, KODE, BISWAS,
 11 2007). Por isso, também é importante que seja realizado previamente o bloqueio
 12 do GSH da amostra com vinilpiridina ou com o N-etilmaleimida (NEM) (FORMAN,
 13 ZHANG, RINNA, 2009). Esse método pode ser utilizado em uma variedade de
 14 amostras biológicas, porém, sua sensibilidade, ou seja, a menor concentração
 15 que pode ser mensurada e a capacidade de distinguir duas concentrações
 16 próximas, não é alta (AMARANTE *et al.*, 2001, RAHMAN; KODE; BISWAS,
 17 2007).



18

19 **Figura 7** – Reação do GSH com o DTNB. Fonte: FORMAN, ZHANG, RINNA, 2009.

1 Outro método bastante utilizado para quantificação de GSH e GSSG é a
2 cromatografia líquida de alta performance (HPLC) que consiste em separar
3 diversos compostos de uma amostra (FORMAN, ZHANG, RINNA, 2009;
4 MALVIYA *et al.*, 2009). Alguns protocolos permitem quantificar concentrações
5 muito baixas de GSH e detectar também outros tióis presentes na amostra.
6 Porém as limitações existem e estão na aparelhagem de alto custo e no processo
7 de derivatização e alcalinização das amostras, processos necessários nessa
8 quantificação, que podem acabar comprometendo as concentrações reais de
9 GSH e GSSG (RAHMAN, KODE, BISWAS, 2007). Além disso, métodos
10 eletroanalíticos demonstram ser vantajosos por serem de fácil execução, baixo
11 custo e alta sensibilidade (ENSAFI, KHAYAMIAN, HASANPOUR, 2008; RAOOF,
12 OJANI, KARIMI-MALEH, 2009). O problema dessa técnica está no uso de
13 eletrodos para a oxidação do GSH, processo lento e que só é acelerado com o
14 uso de metais tóxicos como o mercúrio (RAOOF, OJANI, KARIMI-MALEH,
15 2009).

16 A quimiluminescência para detecção de GSH e outros compostos é um
17 método mais atrativo por ser altamente sensível e de baixo custo (HAN; HE;
18 ZENG, 2006). A detecção de GSH em soro humano por quimiluminescência
19 usando lucigenina que a exemplo do luminol, gera um luminóforo por oxidação,
20 permite a detecção de concentrações de 10 a 200 vezes menores do que as
21 detectadas por espectrofotometria (HAN; HE; ZENG, 2006). Smith *et al.*, 2014
22 utilizou o sistema permanganato de potássio-formaldeído para a quantificação
23 de glutathiona por quimiluminescência em amostras de tecidos de camundongos.
24 Ensafi, Khayamian, Hasanpour, 2008 quantificaram esse composto em
25 eritrócitos através do sistema luminol-periodato de sódio também por
26 quimiluminescência e compararam os resultados com os resultados obtidos na
27 técnica de Tietze, não observando diferença estatística entre os resultados.

28

29

30

31

Método	Vantagens	Desvantagens
Espectrofotometria	Permite a quantificação de glutatona total (oxidada e reduzida)	Baixa sensibilidade
HPLC	Alta sensibilidade (detecta concentrações em picomolar), diferencia GSH de outros tióis.	Aparelho de alto custo, derivatização e alcalinização da amostra podem comprometer as concentrações de GSH.
Eletroanalíticos	Baixo custo, alta sensibilidade e fácil execução	Processo lento
Quimiluminescência	Muito mais sensível do que a espectrofotometria, aparelho de custo acessível	Alta pureza dos reagentes, condições rigorosamente padronizadas

1 **Tabela 2** – Resumo dos principais métodos utilizados para a quantificação de GSH, suas
2 vantagens e desvantagens.

3

4 1.4. SISTEMA LUMINOL – FERRICIANETO DE POTÁSSIO

5 O luminol (5-amino-2,3-dihidro-1,4-ftalazinadiona) é um sal de coloração
6 amarelada, insolúvel em água, capaz de produzir luminescência e que vem
7 sendo amplamente utilizado na área forense afim de detectar amostras de
8 sangue (ALMEIDA, 2009; KHAN *et al.*, 2014). Além disso, essa substância pode
9 ser empregada para a detecção de radicais livres, substâncias inorgânicas e
10 metais de transição (ROSE; WAITE, 2001). Por se tratar de um composto lábil,
11 altamente sensível a luz, a temperatura e ao pH, deve ser preparado somente
12 no momento do uso (ALMEIDA, 2009). Mesmo com essas particularidades, o
13 luminol ainda é amplamente utilizado na quimiluminescência por ser de fácil
14 acesso e baixo custo (ALMEIDA, 2009; KHAN *et al.*, 2014).

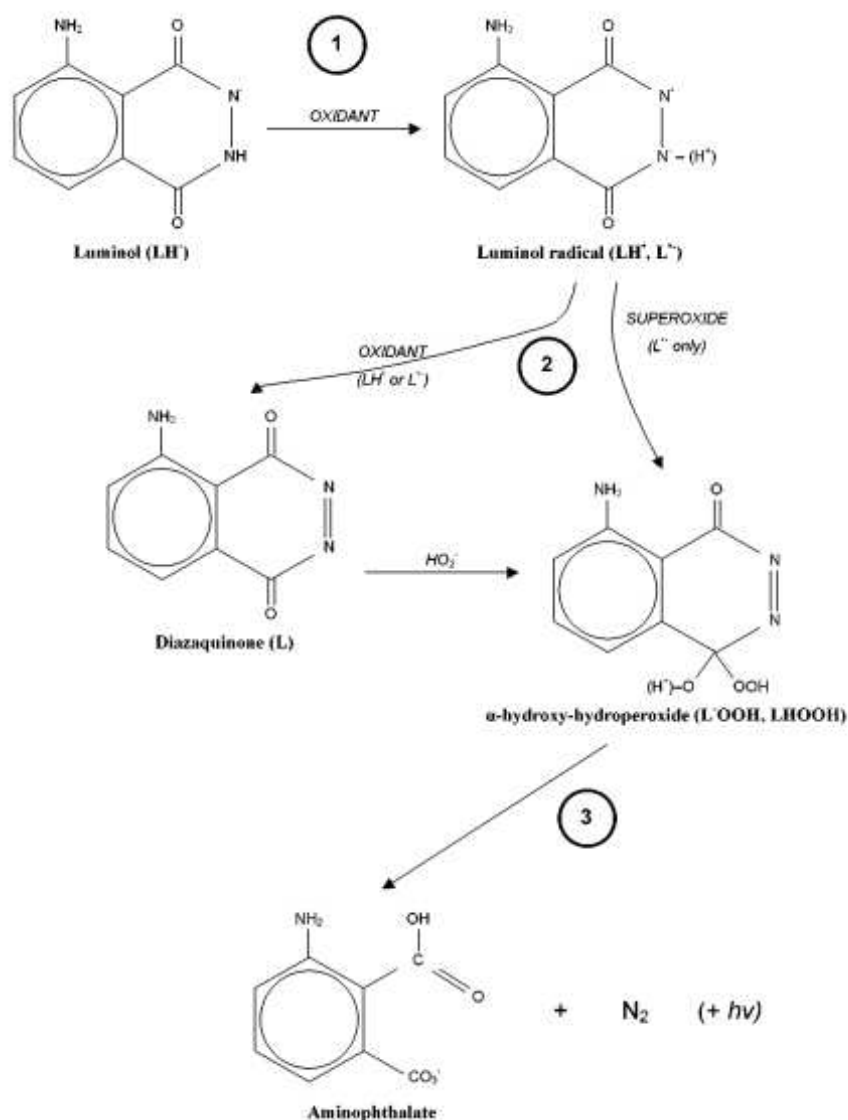
15 O ferricianeto de potássio ($K_3[Fe(CN)_6]$) é um sal de coloração
16 avermelhada, quimicamente estável, solúvel em água, de baixo custo, que pode
17 ser armazenado por longos períodos sem requerer aparelhos sofisticados de
18 refrigeração e que não sofre fácil degradação ao longo do tempo (YANG; WANG;
19 LEE, 2014). Esse reagente funciona como um agente catalítico da oxidação do
20 luminol e de diversas substâncias orgânicas, como tióis e aminoácidos
21 (SARANTONIS, TOWNSHEND, 1985; WHITE *et al.*, 1964; ZOURAB *et al.*,
22 2003). Alguns trabalhos já utilizaram esse reagente para substituir a peroxidase

1 como agente oxidante, obtendo resultados igualmente satisfatórios, em técnicas
2 quimiluminescentes e não-quimiluminescentes (YANG; WANG; LEE, 2014; DU,
3 LI, LU, 2007).

4 A quimiluminescência (QL) é um método altamente sensível – sendo a
5 melhor opção para detecção de baixas concentrações de analito – de baixo custo
6 de operação, tratamento mínimo do material biológico, rápido e que utiliza
7 equipamento de custo acessível (ROSE; WAITE, 2001). A luminescência é
8 emitida quando um elétron passa do seu estado excitado para o estado
9 fundamental, liberando a energia em forma de luz (CINQUANTA, FONTANA,
10 BIZZARO, 2017). A eficácia do método depende de fatores como pH,
11 concentração dos reagentes e tipo de tampão utilizado (ROSE; WAITE, 2001).

12 Um sistema amplamente empregado na quimiluminescência é o luminol-
13 peroxidase-H₂O₂, onde o peróxido de hidrogênio é capaz de intensificar a
14 luminescência emitida pelo luminol (KHAN *et al.*, 2014). Porém, esse sistema
15 possui limitações já que tióis presentes na amostra podem interferir na emissão,
16 por funcionarem como substrato para a peroxidase (HELD, 2015). Além disso, o
17 sistema luminol-hemina já foi utilizado para a quantificação de hidroperóxidos no
18 plasma humano (KHAN *et al.*, 2014).

19 Outro sistema já descrito é o sistema luminol-ferricianeto de potássio, um
20 sistema simples e barato que pode ser empregado para quantificar peróxido de
21 hidrogênio e outros compostos como o próprio ferro (QIN, ZHANG, WANG, 1997;
22 SARANTONIS, TOWNSHEND, 1985). A reação do ferro com o luminol é capaz
23 de produzir luminescência na presença de oxigênio e em meio alcalino, de forma
24 proporcional a concentração dos analitos (ROSE; WAITE, 2001; YILDIZ,
25 DEMIRYÜREK, 1998). Qin, Zhang & Wang, 1997 utilizaram esse sistema para a
26 quantificar ferro II e III na água. Essa metodologia já foi aplicada também para a
27 quantificação de dopamina em amostras de urina (HE *et al.*, 2019). Esse sistema
28 baseia-se nas seguintes reações descritas primeiramente por Shevlin & Neufeld,
29 1968, White *et al.*, 1964 e posteriormente por Rose & Waite, 2001 demonstrada
30 na figura 8:

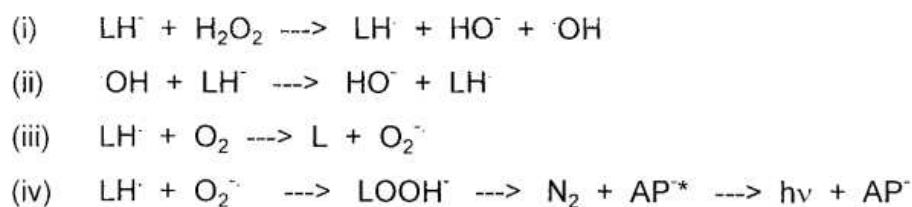


1

2 **Figura 8** – Oxidação do luminol. Fonte: ROSE; WAITE, 2001.

3 A primeira reação consiste na oxidação do luminol, formando um radical
 4 diânion. Depois, o radical pode ser oxidado, em meio alcalino, na presença de
 5 oxigênio, formando o intermediário diazoquinona. A diazoquinona pode ser
 6 convertida a α-hidoxi hidroperóxido (α-HHP) ou o α-HHP pode ser formado após
 7 oxidação + desprotonação do radical diânion (SHEVLIN, NEUFELD, 1968;
 8 ROSE; WAITE, 2001). Por último, ocorre a decomposição do α-HHP, formando
 9 o aminoftalato + nitrogênio (N₂), emitindo luz de forma proporcional a formação
 10 do produto final (ROSE; WAITE, 2001; KHAN *et al.*, 2014). O sistema pode
 11 funcionar com uma série de oxidantes: peroxidase, cobre, magnésio, ferricianeto
 12 e alguns radicais livres (ROSE; WAITE, 2001).

1 Na reação do luminol com o peróxido de hidrogênio, o ferricianeto
 2 funciona como um catalisador: age sobre o peróxido, liberando oxigênio que
 3 oxida o luminol, produzindo luminescência (Figura 9) (YANG; WANG; LEE, 2014;
 4 ALMEIDA, 2009; JAKUBOWSKI *et al.*, 1998). Alguns trabalhos já descreveram
 5 a utilização do luminol para a dosagem de glutatona e cisteína por
 6 quimiluminescência, detectando concentrações entre 3–50 µmol/L de GSH (DU,
 7 LI, LU, 2001; KAMIDATE, KUNIYA, WATANABE, 1993). A reação do luminol
 8 com a glutatona em um sistema quimiluminescente ainda não foi descrita,
 9 porém, já foi relatado que agentes redutores podem contribuir para o aumento
 10 da luminescência (JAKUBOWSKI *et al.*, 1998; LI *et al.*, 2007).



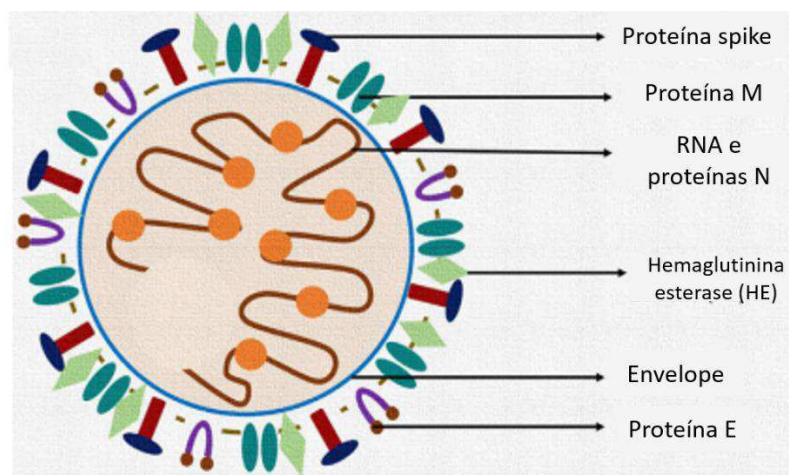
11

12 **Figura 9** – Reação do luminol com o peróxido de hidrogênio catalisada pelo ferricianeto. LH: luminol, LH[·]: radical do luminol, LOOH[·]: α-HHP, AP^{*}: aminoftalato no estado excitado, AP[·]: aminoftalato no estado fundamental Fonte: JAKUBOWSKI *et al.*, 1998.

15 A maioria das publicações com o sistema luminol-ferricianeto de potássio
 16 utilizam análise em fluxo (FIA), que consiste em uma abordagem química-
 17 analítica que transporta um pequeno volume de amostra por um tubo fino até o
 18 detector (ZAGATTO, VIDA, WORSFOLD, 2019). Apesar de ser um método
 19 rápido e que utiliza pequenas alíquotas, a sensibilidade não é alta, já que a
 20 amostra pode sofrer dispersão durante a passagem pelo tubo condutor e não ser
 21 bem misturada com os reagentes (GOMES *et al.*, 2015). Uma de nossas
 22 contribuições é a utilização desse sistema para quantificação de peróxido de
 23 hidrogênio e GSH utilizando injeção direta de ferricianeto na câmara de amostra
 24 com luminômetro de alta velocidade de resposta em pacotes de 50 mS. A injeção
 25 é capaz de entregar um volume preciso do reagente, possibilita uma mistura
 26 adequada das alíquotas no tubo e permite que a captação da luminescência se
 27 inicie imediatamente após o disparo da reação (KORONKIEWICZ,
 28 KALINOWSKI, 2015). A escolha da injeção de ferricianeto se deu por acreditar
 29 que esse reagente é o disparador da reação (DU, LI, LU, 2007).

1 1.5. COVID-19

2 O corona vírus (SARS-CoV-2) é um vírus de RNA, envelopado, causador
 3 da COVID-19, doença que foi declarada como pandemia pela organização
 4 mundial da saúde (OMS) em março de 2020 (DEROUICHE, 2020). Em seu
 5 envelope estão expressas proteínas *spike* (S1 e S2), proteínas de membrana
 6 (M), glicoproteínas (E), hemaglutinina esterase (HE) e proteínas do núcleo
 7 capsídeo (N) (Figura 10) (ZIA-UD-DEN *et al.*, 2020; VALLAMKONDU *et al.*,
 8 2020). As proteínas *spike* estão na forma de trímero, e medeiam a ligação do
 9 vírus aos receptores de membrana das células hospedeiras; as proteínas M são
 10 fundamentais para a montagem das partículas virais; as proteínas E participam
 11 de ambos os processos; a HE auxilia na entrada do vírus nas células e está
 12 envolvida no processo de infecção e as proteínas N participam da replicação e
 13 transcrição do genoma viral e da montagem dos vírions (BOOPATHI, POMAB,
 14 KOLANDAIVEL, 2020; SUHAIL *et al.*, 2020; KOZLOV *et al.*, 2021).

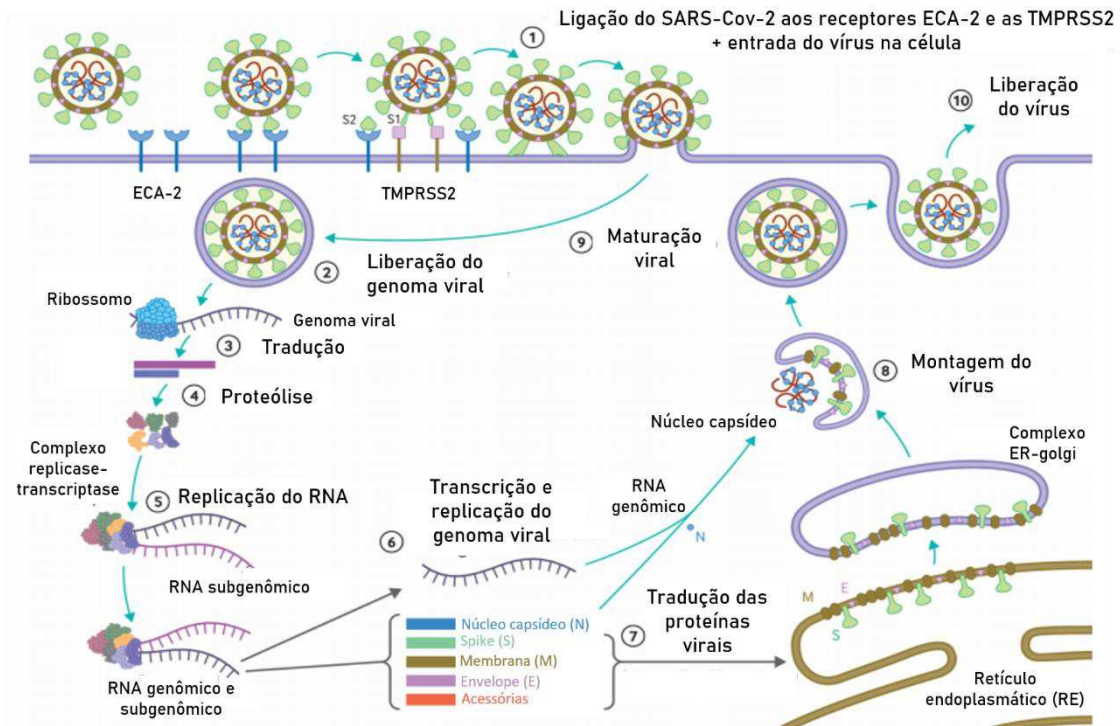


15
 16 **Figura 10** – Estrutura do SARS-CoV-2. Fonte: adaptado de VALLAMKONDU *et al.*, 2020.

17
 18 A transmissão ocorre via contato direto ou indireto de partículas virais com
 19 a mucosa nasal, oral ou conjuntiva (BOOPATHI, POMAB, KOLANDAIVEL, 2020;
 20 CEVIK *et al.*, 2020). Os sintomas podem ser leves, incluindo dor de cabeça,
 21 tosse, febre, perda do paladar e olfato ou mais graves, podendo evoluir para
 22 síndrome respiratória aguda e internação na unidade de terapia intensiva (UTI)
 23 (DELGADO-ROCHE, MESTA, 2020). Esse perfil da doença é grave, podendo
 24 resultar em óbito e acomete na maioria das vezes, pacientes que apresentam
 25 outras comorbidades, como hipertensão, diabetes, obesidade, asma, entre
 26 outros (HOROWITZ, FREEMAN, BRUZZESE, 2020).

1 Inúmeros trabalhos vêm sendo publicados para tentar elucidar a
2 patogênese da COVID-19 (LIN *et al.*, 2020; CEVIK *et al.*, 2020; VALLAMKONDU
3 *et al.*, 2020; CECCHINI & CECCHINI, 2020). Até então, sabe-se que o corona
4 vírus utiliza as proteínas spike para se ligar a enzima conversora de angiotensina
5 2 (ECA-2) – expressa em grande quantidade em pneumócitos do tipo 2 – e a
6 serino-proteases (TMPRSS2) – expressas principalmente no epitélio respiratório
7 – que clivam as proteínas spike em dois domínios (CEVIK *et al.*, 2020; KOZLOV
8 *et al.*, 2021). Após clivagem de um dos domínios, ocorre a fusão das membranas
9 (viral e da célula alvo) e entrada do material genético na célula hospedeira por
10 endocitose (SUHAIL *et al.*, 2020;) (Figura 11). A ligação ao TMPRSS2 contribui
11 também para a ativação do inflamassoma NLRP3, aumentando
12 significativamente a produção de citocinas (BELTRÁN-GARCÍA *et al.*, 2020,
13 CAVALCANTE-SILVA *et al.*, 2021). Além disso, a ligação a ECA-2, resulta no
14 aumento da disponibilidade de angiotensina II, que ativa a enzima NADPH
15 oxidase, aumentando a produção de ERO, principalmente peróxido de
16 hidrogênio (BELTRÁN-GARCÍA *et al.*, 2020). O SARS-Cov-2 possui também a
17 capacidade de liberar hemoglobina dos eritrócitos, disponibilizando ferro e
18 facilitando a ocorrência da reação de Fenton, formando radicais livres a partir do
19 peróxido (BELTRÁN-GARCÍA *et al.*, 2020).

20 O ciclo de vida do corona vírus consiste em utilizar os ribossomos e a RNA
21 polimerase da célula hospedeira para produzir cópias das proteínas virais e do
22 genoma, que são utilizados para montagem dos vírions, liberados através de
23 exocitose (Figura 11) (ZIA-UD-DEN *et al.*, 2020; LI *et al.*, 2020; VALLAMKONDU
24 *et al.*, 2020). Assim que o vírus entra na célula, seus antígenos começam a ser
25 apresentados por células apresentadoras de antígenos (APC) via MHC-I para
26 linfócitos T citotóxicos (LI *et al.*, 2020). Em pacientes sem comorbidades, os
27 linfócitos eliminam as células infectadas, impedindo que o vírus se espalhe
28 (CEVIK *et al.*, 2020).



1
2 **Figura 11** – Ciclo de vida do SARS-CoV-2. Fonte: adaptado de CEVIK *et al.*, 2020.

3
4 O quadro mais grave da doença, que implica na síndrome respiratória
5 aguda, está relacionado com a tempestade de citocinas (IFN- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-
6 6, IL-12, TNF- α) e quimiocinas produzidas em resposta aos mediadores
7 liberados (LI *et al.*, 2020). As citocinas promovem o recrutamento de células do
8 sistema imune inato que produzem espécies reativas de oxigênio e, destroem o
9 parênquima pulmonar, levam a formação de trombos, provocam vasodilatação e
10 aumento da permeabilidade vascular, causando um edema no espaço
11 interalveolar, o que dificulta as trocas gasosas (VALLAMKONDU *et al.*, 2020;
12 HOROWITZ, FREEMAN, BRUZZESE, 2020). Como consequência desse
13 processo inflamatório, o paciente apresenta tosse, dificuldade para respirar e
14 hipoxemia (VALLAMKONDU *et al.*, 2020).

15 Além disso, acredita-se que espécies reativas de oxigênio, em especial o
16 H₂O₂, desencadeiem a ativação do inflamassoma NLRP3 e do NF- κ B,
17 potencializando ainda mais a tempestade de citocinas (DELGADO-ROCHE,
18 MESTA, 2020). As citocinas produzidas ativam células endoteliais, plaquetas e
19 neutrófilos, favorecendo a resposta inflamatória e coagulatória (PASINI *et al.*,
20 2021). A principal fonte de H₂O₂ é o metabolismo da enzima NAPH oxidase, o
21 qual encontra-se aumentado durante a infecção causada pelo SARS-CoV-2

1 (DAMIANO *et al.*, 2020). Esse composto pode ser convertido a radical hidroxil na
2 presença de ferro, levando a lipoperoxidação de membranas e morte celular
3 (CECCHINI & CECCHINI, 2020). O estresse oxidativo pode afetar também, de
4 forma negativa, o processo de reparo tecidual (DEROUICHE, 2020). Levando
5 essas informações em consideração, justifica-se o uso das amostras de
6 pacientes infectados com o SARS-CoV-2 admitidos na UTI para realizar as
7 dosagens de peróxido de hidrogênio e GSH.

8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47

2. JUSTIFICATIVA

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e a glutathiona reduzida (GSH) são marcadores importantes do estresse oxidativo e alterações em seus níveis podem ser indicativos de diversas doenças. A COVID-19 é uma doença causada pelo corona vírus e que pode evoluir para síndrome respiratória aguda grave. Acredita-se que esse quadro da doença ocorra, principalmente, devido ao estresse oxidativo e a tempestade de citocinas relacionados com a entrada do vírus nas células. Assim sendo, o H_2O_2 pode ser um importante marcador de progressão e desfecho da doença. As técnicas utilizadas atualmente para quantificar H_2O_2 e GSH são pouco sensíveis, de alto custo ou alta complexidade de execução. Levando em consideração que esses marcadores podem ser de grande importância para a elucidação da progressão da COVID-19, e a ausência de uma técnica quimiluminescente de simples execução, alta sensibilidade e baixo custo, faz-se necessário o desenvolvimento de um novo tipo de ensaio. Nesse trabalho, foram utilizadas amostras de pacientes com COVID-19 admitidos na UTI para a quantificação de GSH na hemácia e H_2O_2 no plasma sanguíneo, utilizando uma técnica quimiluminescente que foi desenvolvida em nosso laboratório, baseada no sistema luminol-ferricianeto de potássio com sistema de injeção direta na câmara de amostra.

1 **3. OBJETIVOS**

2 **3.2. Objetivos gerais**

3 Demonstrar o possível envolvimento do estresse oxidativo na infecção por
4 SARS-CoV-2 utilizando uma metodologia mais sensível e acessível para a
5 quantificação de GSH e H₂O₂.

6

7 **3.3. Objetivos específicos**

8 ✓ Avaliar o estresse oxidativo através da medida dos níveis de GSH e
9 H₂O₂ no sangue.

10 ✓ Desenvolver uma técnica quimiluminescente altamente sensível para
11 realizar essas quantificações.

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

1 4. RESULTADOS

2 Neste trabalho, desenvolvemos uma técnica quimiluminescente e a
3 utilizamos para quantificar GSH e H₂O₂ em amostras de hemácia e plasma
4 sanguíneo de pacientes com COVID-19 admitidos na UTI. Durante a
5 padronização, definimos que a solução de luminol deve ser preparada em
6 tampão carbonato de sódio (0,2 M), em pH 9,5, na concentração de 10 µM e que
7 a solução de ferricianeto de potássio deve estar na concentração de 4,5 mM,
8 preparada em água destilada, para que se obtenha uma boa linearidade nas
9 dosagens. O *range* de concentrações que puderam ser quantificadas para o
10 H₂O₂ variou de 0,3 a 2 µM, e o de GSH foi de 0,5 a 83 µM, porém, obteve-se
11 uma menor linearidade até 10 µM. Constatou-se também que a reação deve
12 acontecer entre 21–24°C e que 15 segundos são suficientes para que a curva
13 de leitura atinja o pico máximo e decaia, com um intervalo de captura de fótons
14 ideal de 0.05 segundos.

15 Em relação ao preparo das amostras, após a separação do plasma
16 sanguíneo e hemácia, conclui-se que ambas devem passar por um processo de
17 precipitação de proteínas com ácido sulfossalicílico para remoção de
18 interferentes. A hemácia, antes da precipitação, deve ser hemolisada para
19 liberação do GSH, que se encontra quase que exclusivamente no meio
20 intracelular. Devido a acidificação da amostra, o sobrenadante ácido deve ser
21 neutralizado com hidróxido de sódio 8% (para o plasma) (já que a reação
22 acontece em pH básico) ou diluído 250x (para a hemácia, para que a
23 concentração de GSH entre no range padronizado). Incubamos a catalase e a
24 vinilpiridina com as amostras de plasma sanguíneo e de hemácia,
25 respectivamente, e com isso conseguimos provar que o H₂O₂ e o GSH estavam
26 realmente presentes e sendo detectados pelo método.

27 Os pacientes de COVID-19 foram agrupados em um grande grupo e
28 classificados de acordo com o desfecho clínico. Os níveis de GSH dos pacientes
29 infectados pelo SARS-CoV-2 foram semelhantes aos do grupo controle,
30 mantendo o mesmo padrão quando analisados separadamente de acordo com
31 o desfecho clínico.

Para o H₂O₂, observou-se uma redução de 10 vezes no grupo COVID, 3.7 vezes no grupo alta e 23 vezes no grupo óbito quando comparados aos voluntários saudáveis, além da redução também ter sido significativa, de 6 vezes, no grupo óbito em relação ao grupo alta.

1 Por fim, a atividade da catalase também foi quantificada, constatando que
2 na COVID-19 há uma redução da atividade dessa enzima, tanto no pacientes de
3 forma geral como nos que tiveram como desfecho clínico o óbito, em relação ao
4 grupo controle.

5 Com esses resultados podemos concluir que houve uma boa linearidade
6 do método proposto nas condições citadas. Pode-se também constatar que o
7 estresse oxidativo está envolvido na patogênese da COVID-19 devido a redução
8 dos níveis de H₂O₂ que não se deu devido a ação das defesas antioxidantes,
9 mas sim, devido a conversão dessa espécie reativa em outras com maior
10 potencial de gerar danos ao pulmão e aos demais tecidos.

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

1 **5. ARTIGO**

2 O presente trabalho originou um artigo científico, que foi realizado na
3 Universidade Estadual de Londrina, no laboratório de Fisiopatologia e Radicais
4 Livres.

5 O trabalho intitula-se “H₂O₂ quantification by chemiluminescence: a
6 sensitive, rapid and low-cost method for monitoring the outcome of COVID-19 in
7 ICU patients”

8 Revista para submissão: Free Radical Biology and Medicine (6.170), A1

9 Submission guidelines: [https://www.elsevier.com/journals/free-radical-](https://www.elsevier.com/journals/free-radical-biology-and-medicine/0891-5849/guide-for-authors)
10 [biology-and-medicine/0891-5849/guide-for-authors](https://www.elsevier.com/journals/free-radical-biology-and-medicine/0891-5849/guide-for-authors)

11

H₂O₂ quantification by chemiluminescence: a sensitive, rapid and low-cost method for monitoring the outcome of COVID-19 in ICU patients

Liara Freitas Cavalcanti¹, Isabela Chagas Silva², Thiago Henrique Daniel do Nascimento², Jôse de Melo², Alessandra Lourenço Cecchini², Rubens Cecchini^{1*}

¹Laboratory of Pathophysiology and Free Radicals, Department of General Pathology, State University of Londrina, UEL, Londrina, PR, Brazil.

²Laboratory of Molecular Pathology, Department of Pathological Sciences, State University of Londrina, UEL, Londrina, PR, Brazil.

Corresponding author: Rubens Cecchini.

email: rubenscecchini@hotmail.com, Phone: +55 (43) 3371-4521.

Abstract

Oxidative stress (OS) is possibly involved in the pathogenesis of COVID-19 and in the mechanisms by which SARS-CoV-2 (corona virus) causes injuries to tissues. Blood concentrations of glutathione (GSH) and hydrogen peroxide (H₂O₂) could be an indicative of oxidative stress, but its quantifications are performed by techniques with low sensitivity or with a high cost and complexity of execution. So, we aimed to develop a chemiluminescence technique highly sensitive and low cost and use it to demonstrate that blood levels of H₂O₂ and GSH may be a useful parameter for evaluating COVID-19 prognosis, clinical outcome and oxidative stress related to its pathogenesis. The luminol-potassium ferricyanide was used. Samples were obtained from COVID-19 patients admitted to the ICU of Londrina University Hospital. They were analyzed as a big group (COVID) and also divided according to the clinical outcome (discharged or died). The GSH concentrations remained similar in COVID group, death and discharged groups when compared to control. On the other hand, the levels of H₂O₂ were 10 times lower in COVID group, 3.7 times in discharged group and 23 times lower in died group compared to healthy volunteers. Comparing patients who died with discharged patients, the reduction was 6 times. Lastly, we measured the catalase activity observing a reduction in COVID group and died group, both compared with control. We could conclude that H₂O₂ plays an important role in the pathogenesis of COVID-19, being mainly involved in diffuse pulmonary lesions and other organs and tissues seen in this disease. Additionally, it can be a good predictor of the severity of its evolution.

Key words: Blood plasma, corona virus, erythrocytes, luminol, oxidative stress.

Introduction

COVID-19 is a disease caused by corona virus (SARS-CoV-2), a new type of RNA virus, discovered in Wuhan, China, in 2019 [1,2]. Most cases present mild or any symptoms, but in some patients, it could be severe, culminating in acute respiratory distress syndrome [3,4,5]. There are some published works that proposed that the pathogenesis and the aggravation of COVID-19 are related to oxidative stress (OS) [6,7,8,9]. It has already been described that SARS-CoV-2 binds to ACE-2 and to TRPM2 ligands via spike proteins, resulting in membranes fusion and entry of genetic material into host cells [7]. This entry promotes NLRP3 inflammasome activation and cytokine storm, that provokes the destruction of pulmonary parenchyma, thrombus formation, vasodilatation and edema in the intra-alveolar space [8,5,2]. Also, the link between spike proteins and ACE-2 culminates in activation of NADPH oxidase, in phagocytes, particularly neutrophils an important source of H_2O_2 [3].

Oxidative stress is defined as an imbalance between the production of oxidant molecules and its neutralization by antioxidant defenses, resulting in DNA, protein and cell membrane damage by lipid peroxidation [10,11]. Moderate levels of reactive oxygen species (ROS) like hydrogen peroxide (H_2O_2) are important to regulate several signaling pathways, cell cycle, enzymes activity and protein function [12,13,14,15]. However, H_2O_2 can be converted to hydroxyl radical or to hypochlorous acid, both with ability to induce tissue damage [16,17]. Reduced glutathione (GSH), a tripeptide, is one of the most important molecules in the cellular antioxidant defenses mechanisms, responsible for neutralizing and detoxify oxidant agents such as H_2O_2 [17,18]. Furthermore, catalase, participates of this detox process through degradation of H_2O_2 in H_2O and O_2 [19]. On the contrary of most ROS, H_2O_2 is a stable molecule and feasible to be measured. Since GSH is one of most important antioxidants and degrades H_2O_2 , the quantification of both and the ratio of H_2O_2 /GSH, can be a reliable indicator of OS and its quantification can elucidate part of the pathogenesis of some diseases including signaling pathways involvement [14,20,21].

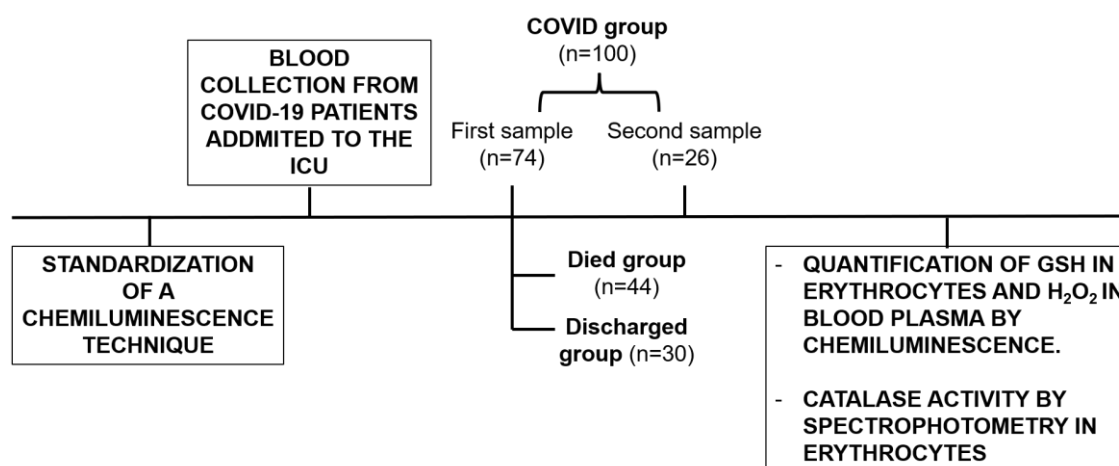
The assays available to quantify H_2O_2 and GSH are complex, unspecific, little sensitive or expensive [22,23,24,25,26,8]. The chemiluminescence methods have advantages such as high sensitivity, inexpensive apparatus, short time analysis, wide working range, low detection limit and no background scattering light interference [27]. Here, we used the luminol-potassium ferricyanide system with direct injection of the sample into the sample compartment. It is a system that allows the injection of a precise volume, a suitable mixture of the reagents, besides allowing the luminescence to be captured as soon as the reaction starts [28]. Also, the luminol and the ferricyanide has a low cost and have previously been used for dosing other compounds satisfactorily [29,30]. With this work, we aim to demonstrate that blood H_2O_2 and H_2O_2 /GSH ratio may be a useful parameter for evaluating COVID-19 prognostic and outcome and also the participation of oxidative stress on the pathogenesis of COVID-19.

Materials and methods

Experimental design

First, we standardized a chemiluminescence technique highly sensitive and low cost to quantify GSH in erythrocytes and H_2O_2 in blood plasma. With all conditions determined, the heparinized blood was obtained from adult patients with COVID-19 at admission to the ICU of the Hospital of the State University of Londrina-state of Parana-Brazil. In general, only one sample of each patient was collected, but, in some cases, we obtained two. The two samples were grouped forming the COVID group, and the

samples from first collection were divided according to the clinical outcome of the patients. Then, the samples were used to quantify GSH and H_2O_2 and to determine the catalase activity. The control group was not foreseen in this project, so the approval of another project was used to recruited the healthy volunteers in the campus of the State University of Londrina to obtain blood samples to quantify GSH and H_2O_2 . To catalase activity control group, we used a database. All the experiments were approved by the Research Ethics Committee Involving Human Beings from State University of Londrina (CAAE: 34446720.4.0000.5231; CAAE: 44235015.3.0000.5231).



Reagents and solutions

The working solutions (luminol 10 μ M; potassium ferricyanide 4,5 mM; hydrogen peroxide 0,3, 1 and 2 μ M and glutathione 1, 2 and 4 μ M) were prepared on the same day of the experiments from the stock solutions in distilled water, except the luminol that was diluted in carbonate buffer. For the luminol stock solution, 7,96 mg of luminol (Sigma®) were added to 10 mL of carbonate buffer (Na_2CO_3) 0,2 M, pH 9,5, with the final concentration of 4,5 mM. For potassium ferricyanide stock solution, 1,65g (Êxodo®) were diluted in 100 mL (50 mM). The carbonate buffer was prepared mixing 8,48 g of the salt (Vetec®) in 400 mL of distilled water with subsequent pH adjustment to 9.5. The working solutions of H_2O_2 were prepared from a 35% H_2O_2 solution (Anidrol®) and the GSH solutions were made from a 10 mM solution (4 mg of GSH (Sigma®) diluted in 1,3 mL of distilled water). The stocks solutions, as wells as the carbonate buffer, were kept under refrigeration and protected from light where they remained stable for a week.

Sample preparation

The red blood cells (RBC) were separated from blood plasma and buffy coat by centrifugation at 3000 rpm for 15 minutes at 4°C. The blood plasma was frozen at -20°C for further quantifications and H_2O_2 concentration remained stable for one week. The RBC were washed three times with NaCl 0,9% followed by centrifugation at 3000 rpm for 5 minutes at 4°C. Then, were lysed with distilled water (1:1) v/v to release the GSH. The blood plasma was thawed at room temperature. In order to reduce the number of interfering substances, sulfosalicylic acid 10% (2:1) v/v was added to hemolyzed RBC and thawed plasma followed by centrifugation at 3500 rpm for 10 minutes at 4°C, as described by Ensafi, Khayamian and Hasanpour [25]. After protein precipitation, neutral pH of both samples were restored by dilution and/or with NaOH 8%. We tested a dilution

of 250x to erythrocytes as described by Hirakawa [24] and four dilutions to blood plasma. Then, the samples were ready to the quantifications.

Standardization of the technique

We determined the total reading time and the photon capture interval (PCI) performing several combinations and observing in which one we would have a better response and a better curve profile. We used luminol + water + potassium ferricyanide (basal) to make the readings. The concentration of luminol and potassium ferricyanide solutions were chosen performing two reads to each concentration (the basal and the analyte (GSH 5 μ M)) using three different concentrations to luminol and four to potassium ferricyanide. The ratios between the maximum peaks were calculated (analyte/basal) in order to obtain the best emission for each reagent. To determine the reaction pH, we selected five different alkaline pH of the carbonate buffer that was used to prepare the luminol solution. Then, as previously described, two readings were made for each pH (basal and analytes (GSH 8 μ M and H₂O₂ 1.5 μ M)) and the ratios were calculated.

Apparatus and measurements

The chemiluminescent analyses were performed using a luminometer Lumat³ LB9508 (Berthold®), always in triplicate, at 21 – 24°C. The reactions were made in plastic tubes (7.5 x 1 cm) with: 300 μ L of GSH or H₂O₂ solutions or the sample (erythrocytes hemolyzed or blood plasma), 300 μ L of luminol solution and 200 μ L of distilled water. These volumes were chosen according to the volume needed to fill the photon capture chamber of the device. The tube was positioned in the chamber and after 15 seconds, 100 μ L of potassium ferricyanide were automatically injected and immediately the photon counting was started.

Use of inhibitors

The 2-vinylpyridine is a blocker of the SH group, reacting with GSH. We used the vinylpyridine to prove that we were quantifying GSH in the RBC. 500 μ L of hemolyzed RBC were incubated with 8 μ L of vinylpyridine for 1 hour at room temperature as described by Griffith [31]. To prove the quantification of H₂O₂, the catalase was used. The catalase is an enzyme responsible for the degradation of H₂O₂ in H₂O and O₂. To 750 μ L of plasma was added 250 U of catalase for 5 minutes at 30°C, following protocol described by Lacy, O'Connor & Schmid-Schönbein [32]. Both inhibitors were incubated with the samples before protein precipitation. The concentration of 250 U catalase was chosen after testing other three concentrations (50, 150 and 2000 U).

Determination of total protein content

Total protein was measured to express the catalase activity results. After sample preparation described previously, RBC were diluted 1:800 in distilled water and mixed with Cupric reagent (1:1), resting for 10 minutes at room temperature. Then, the Folin reagent was added and incubated in a 50°C bath for 10 min. The absorbance was read

in a spectrophotometer at 660 nm (Shimadzu UV-1650 PC), and sample concentrations were determined (mg), using bovine serum albumin for the standard concentration curve.

Catalase activity determination

Erythrocytic catalase activity was determined as described by Aebi [33]. After sample preparation described previously, RBC were diluted 1:80 in distilled water, and different volumes were incubated in a system containing 1 M TRIS buffer and 200 mM H₂O₂ solution. Absorbance disappearance kinetics was monitored in a spectrophotometer at 240 nm (Shimadzu UV-1650 PC). The results were expressed in absorbance values per minute per milliliter of sample (vabs min⁻¹ ml⁻¹).

Statistical analysis

The data were submitted to normality (Kolmogorov-Smirnov or Shapiro-Will tests) test. Parametric data were expressed as mean \pm standard error of the mean and analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) for multiple comparisons or by t-test for comparison of two groups. For nonparametric analysis, the data were expressed as median and were analyzed using the Kruskal-Wallis test or by Mann-Whitney test. Results were considered statistically significant with a p-value < 0.05. Data were analyzed using Graph Pad Prism (version 8.0.1; San Diego, CA, USA).

Results

Total reading time (TRT) and photon capture interval (PCI) definition

With 30 seconds of TRT and 0.5 second of PCI, there was loss of the maximum reading (Supplementary Figure 1 A). The same happened with 0.1 second of PCI (Supplementary Figure 1 B). The best result was obtained with 15 seconds of TRT and 0.05 seconds of PCI. (Supplementary Figure 1 C), being this combination chosen for subsequent experiments.

Effect of luminol and potassium ferricyanide concentrations on CL intensity

The 10 μ M concentration of luminol gave the maximum reading ratio (Supplementary Figure 2 A, Table 1). Higher concentrations were beyond the luminometer capacity to capture light emission. To the potassium ferricyanide, the highest ratio was obtained with 4.5 mM (Supplementary Figure 2 B, and Table 1). These concentrations were used in the subsequent experiments. We also observed that the luminol and potassium ferricyanide solutions must be prepared in the same day of the experiments to keep the stability of the solutions (data not shown).

Effect of reaction pH on CL intensity

It is known that the luminol luminescence reaction happens more efficiently in an

alkaline pH between 8 to 9.5 [34]. The ratios between the maximum reading from the five pH values evaluated was at pH 9.5, being used for the following experiments (Supplementary Table 2).

Effect of dilution and protein precipitation of RBC and blood plasma

The dilution of 250x of erythrocytes was found to be adequate to fit the GSH light emission into the standard curve (Supplementary Figure 3 A). Blood plasma, after sample preparation as described before, was used without dilution for H₂O₂ measurement (Supplementary Figure 3 B). Comparing the readings before and after protein precipitation, it was obtained a better curve profile to both samples after this procedure (Supplementary Figure 4).

Determination of the GSH standard curve

A good linearity was found in light emission with concentrations between 0.5 to 83 μ M to the GSH (Supplementary Figure 5 A). Above 83 μ M there was a quenching in light emission. The correlation index between chemiluminescence intensity and the concentration of GSH was linear ($R^2 = 0,95$) (Supplementary Figure 5 B). However, the best curves reproducibility was obtained in the lower concentrations of GSH between 1 to 4 μ M, with a coefficient of variation between the triplicates of 7.45 to 17.4% (data not shown). The readings in all measurement were adjusted to fit the emission light inside this range.

Determination of the H₂O₂ standard curve

The best linearity of light emission was between 0.3 to 2 μ M (Supplementary Figure 6 A) ($R^2 = 0,99$) (Supplementary Figure 6 B). Above 2 μ M there was a quenching of light emission. So, we chose 0.3, 1 and 2 μ M to use in the standard curve to determine the samples concentration in the next experiments. The coefficient of variation between the triplicates was 5.6 to 10.8% (data not shown).

Effect of the inhibition of GSH with vinylpyridine and of H₂O₂ with catalase

Vinylpyridine reacts with the SH group of GSH, preventing light emission [31]. When used in RBC chemiluminescence, vinylpyridine was able to quench light emission to control levels, proven that our procedure was quite specific and measure the real GSH concentration (Figure 4 A). Most assays to detect H₂O₂ are not specific, detecting also other ROS in the process and most of time occur a big variation and conflicting data [35]. Our assay of plasma H₂O₂ measurement proven to be specific. Adding 250 U of catalase to the sample, there was reduction of light emission (Figure 4 B) at level of plasma plus saline and 250U of catalase alone (Figure 4 C). Both GSH and H₂O₂ concentration measurements were made comparing with the control.

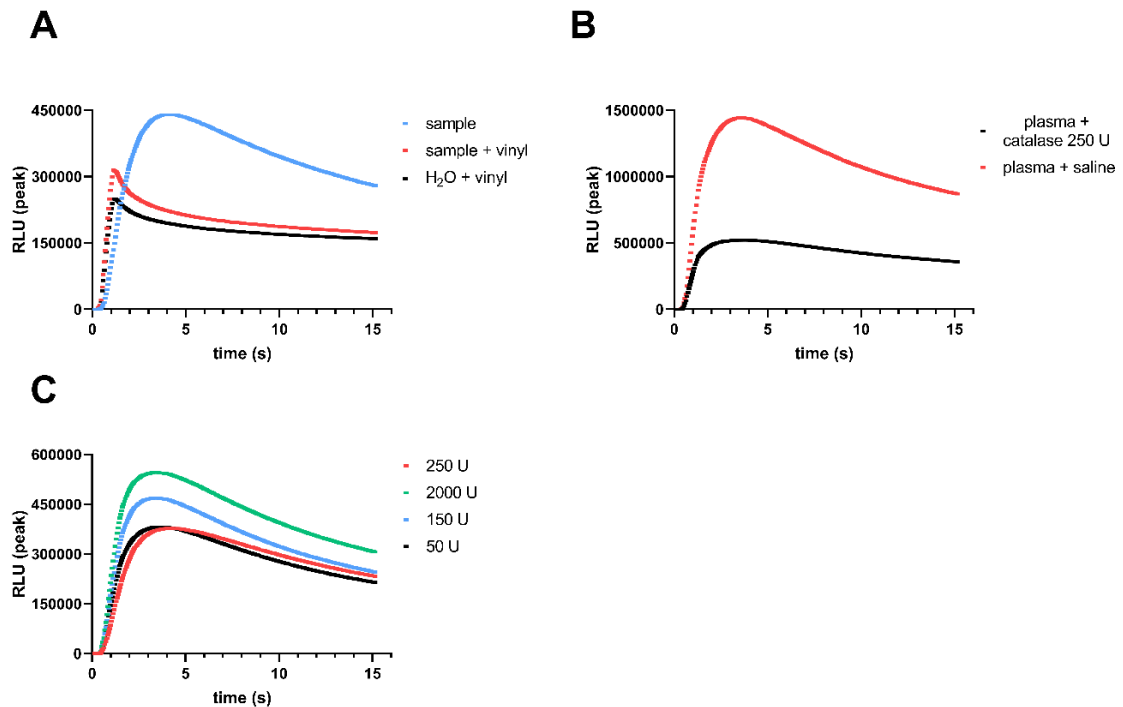
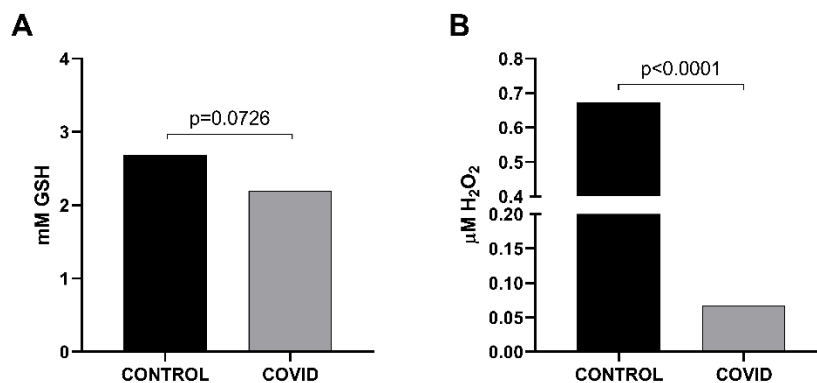


Figure 4. Use of inhibitors in erythrocytes and blood plasma. (A) Graphic representation of luminescence emission of GSH in erythrocytes with and without vinyl pyridine and of water + vinyl to demonstrate the emission of the reagent. (B) Graphic representation of luminescence emission of H₂O₂ in blood plasma with and without 250 U of catalase. (C) Graphic representation of luminescence emission of four concentrations of catalase with H₂O₂ 2 μ M. RLU: relative light unit.

Quantification of GSH and H₂O₂ in blood samples of COVID-19 patients

No significant reduction was verified in RBC GSH levels of COVID-19 patients (Figure 5A), patients that had been discharged and patients that died (Figure 5 C), compared to respective healthy controls. The reduction of H₂O₂ levels in COVID group was 10 times lower (Figure 5B), 3.7 times lower to patients that had been discharged and 23 times lower to patients that died regarding the respective control (Figure 5D). Comparing patients that died with discharged patients, the reduction was 6 times.



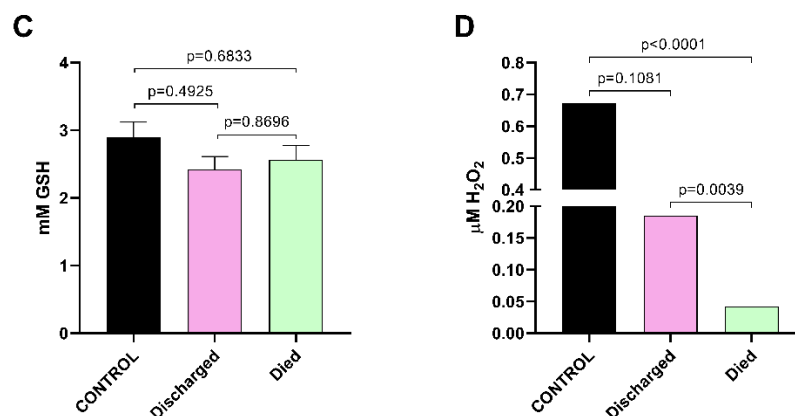


Figure 5. Quantification of GSH and H₂O₂ in COVID-19 samples from patients admitted to the ICU. (A) Comparison of GSH concentration of the control group (n=12) with COVID-19 patients (n=97). (B) Comparison of H₂O₂ concentration of the control group (n=10) with COVID-19 patients (n=79). (C) Comparison of GSH concentration between control group (n=12), patients that had been discharged (n=29) or that died (n=44). (D) Comparison of H₂O₂ concentration between control group (n=10), patients that had been discharged (n=26) or that died (n=37). The data correspond to concentrations after correction of dilutions. C date is expressed as mean \pm standard error, and A, B and D data are expressed as median.

Ratio control/patient of the consumption of H₂O₂

Using the values of mean and median, we calculated the ratio of H₂O₂ concentration between the patient groups and cohort (Table 2). The ratio of all patients compared with control group was 10.8. The biggest ratio of 16 was found in patients that died.

Table 2. Ratio of H₂O₂ consumption between the groups.

Groups	Ratio of H ₂ O ₂
CONTROL/COVID	10.8
CONTROL/DISCHARGED	3.6
CONTROL/DIED	16
DISCHARGED/DIED	4.7

Measure of catalase activity in COVID-19 patients

The catalase activity was significant lower in COVID group compared with the healthy volunteers (Figure 6 A). When we divided the COVID group according to the clinical outcome, we found an important decrease in catalase activity in the patients that died regarding the control group (Figure 6 B). Although, there was no difference in the activity comparing the clinical outcomes between them and the patients that had been discharged with the control (Figure 6 B).

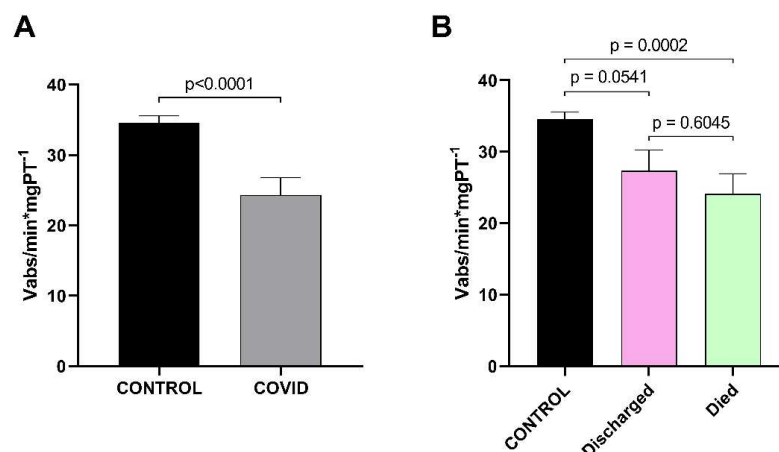


Figure 6. Measure of catalase activity in erythrocytes from COVID-19 patients admitted to the ICU by spectrophotometric method. (A) Comparison of the activity between the control (n=80) group and the COVID patients (n=69). (B) Comparison of the activity between the control group (n=80), patients that had been discharged (n=21) and patients that died (n=38). The data correspond to values after correction of dilutions and protein concentration. Data are expressed as mean \pm standard error.

Discussion

In our experiments, we quantified three markers of oxidative stress: GSH, H₂O₂ and catalase activity. The reduced glutathione is the most important non enzymatic antioxidant, acting as a ROS scavenger, mainly by reducing of H₂O₂ to H₂O and O₂ [39]. GSH is concentrated almost entirely inside the cells and its concentrations in erythrocytes vary between 0.4 to 3 mM [40]. It's been shown that the decrease of antioxidant defenses favors the viral replication in COVID-19, aggravating the disease [16] and contributing to the damages caused by the cytokine storm [41], showing the importance of the redox balance maintenance. In our results we did not observe a significant reduction in GSH levels in any of the groups compared to each other or to the control. Similar to our findings, Gadotti et al [42] described that there is no correlation between GSH and other antioxidant levels and the gravity of the disease. The maintenance of GSH levels may be due to the efficiency of the glutathione reductase that does the recycling of GSSG to GSH, maintaining constant levels of this antioxidant [43,44].

Catalase is a very important antioxidant that reacts with H₂O₂ to produce H₂O and O₂ [19]. In the present work, its activity was lower in COVID group and in the died group when compared with the control. Corroborating with our results, Muhammad et al. also described this reduction in catalase activity in COVID-19 patients [45]. This shows that an important antioxidant defense is deficient in the disease, which could cause oxidative stress. In fact, it was also reported the use of catalase as a therapy to treat COVID-19, repressing the replication of the virus and reducing the oxidative damage [46], reinforcing the importance of this defense against SARS-CoV-2.

Since the pathogenesis of COVID-19 is related to oxidative stress and inflammation [15,19], we thought we would find high plasma levels of H₂O₂ in COVID-19. There are evidences that suggests that the adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase, which has its activity increased after binding of SARS-CoV-2 to TLR 7 receptors, is one of the major sources of H₂O₂ in COVID-19 [15,47]. Also, there is a large amount that is produced by activated neutrophils, being an important marker of the most severe cases of the disease [48]. However, when we verified the H₂O₂ concentration in

COVID group it was found an important reduction of 10 times in blood plasma and a reduction of 16 times in died group both compared to the control. We presume that this reduction also happens in the tissues, since H_2O_2 has the ability to easily move across these two compartments through aquaporins [39,49,50].

At first sight, we could presume that the oxidative stress would be diminished in these patients. But when we analyze the data together, we can't assign the decrease of H_2O_2 to the antioxidant system, since the GSH levels in COVID group were very similar to the control and that catalase activity was reduced in the disease. In addition, it can be speculated that occur a decrease of H_2O_2 production. However, it has been demonstrated that NADPH oxidase and neutrophils are activated in COVID-19 patients [48]. Therefore, in fact H_2O_2 production is augmented. Although the GSH and the catalase could be acting neutralizing or degradating H_2O_2 , it is plausible to assume that the H_2O_2 is being direct converted or generating intermediates that can turn into much more reactive species like peroxyxynitrite in the presence of nitric oxide, abundantly produced during inflammatory process [51,52], hypochlorous acid by action of mieloperoxidase [8] and hydroxyl radical in the presence of iron, since SARS-CoV-2 is capable of attacking hemoglobin, releasing iron from RBC [15]. All these species generate serious damage to pulmonary tissue, leading to disease aggravation [20,17]. So, it is possible to conclude that there was an increase in H_2O_2 consumption and not a reduction in the production.

Some studies have shown that antioxidant therapies in patients with COVID-19 during hospitalization contributes to reduce mortality and activate antioxidant enzymes via Nrf2 [15,53]. Taking this into account, we believe it is worth investigate further the use of antioxidants as a treatment to COVID-19, aiming to reduce the damages caused by reactive species produced during SARS-CoV-2 infection.

Conclusion

With the chemiluminescent technique that was developed in this work, we can presume that oxidative stress is present in the pathogenesis of COVID-19 and that patients have altered levels of H_2O_2 , a marker of oxidative stress, due to its conversion in other reactive species that causes oxidative damage to cells. However, more studies are necessary to better understand this mechanism and to conclude if the administration of antioxidants could neutralize these damages and reduce the gravity of the disease. Also, the technique shows a high sensitivity, easy performance, and low cost, in addition to being able to be used on a large scale and in several diseases that involve the measurement of oxidative stress markers and its pathogenesis.

References

- [1] 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.* 6 (2020) 1–6. <https://doi.org/10.23937/2474-3658/1510121>.
- [2] L.H.A. Cavalcante-Silva, D.C.M. Carvalho, E.A. Lima, J.G.F.M. Galvão, J.S.F. da Silva, J.M. de Sales-Neto, S. Rodrigues-Mascarenhas, Neutrophils and COVID-19: The road so far, *International Immunopharmacology.* 90 (2021) 107233. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.107233>.
- [3] J. Beltrán-García, R. Osca-Verdegal, F. V. Pallardó, J. Ferreres, M. Rodríguez, S. Mulet, F. Sanchis-Gomar, N. Carbonell, J.L. García-Giménez, Oxidative stress and inflammation in covid-19-associated sepsis: The potential role of anti-oxidant therapy in avoiding disease progression, *Antioxidants.* 9 (2020) 1–20. <https://doi.org/10.3390/antiox9100936>.

- [4] L. Delgado-Roche, F. Mesta, Oxidative Stress as Key Player in Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus (SARS-CoV) Infection, *Arch. Med. Res.* 51 (2020) 384–387. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2020.04.019>.
- [5] R.I. Horowitz, P.R. Freeman, J. Bruzzese, Efficacy of glutathione therapy in relieving dyspnea associated with COVID-19 pneumonia: A report of 2 cases, *Respir. Med. Case Reports.* 30 (2020) 101063. <https://doi.org/10.1016/j.rmcr.2020.101063>.
- [6] X. Li, M. Geng, Y. Peng, L. Meng, S. Lu, Molecular immune pathogenesis and diagnosis of COVID-19, *J. Pharm. Anal.* 10 (2020) 102–108. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2020.03.001>.
- [7] M. Cevik, K. Kuppalli, J. Kindrachuk, M. Peiris, Virology, transmission, and pathogenesis of SARS-CoV-2, *BMJ.* 371 (2020) 1–6. <https://doi.org/10.1136/bmj.m3862>.
- [8] J. Vallamkondu, A. John, W. Yousuf, S. Pathinti. SARS-CoV-2 pathophysiology and assessment of coronaviruses in CNS diseases with a focus on therapeutic targets. *Molecular Basis of Disease.* 1886 (2020) 165889. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2020.165889>.
- [9] R. Cecchini, A. Lourenço, SARS-CoV-2 infection pathogenesis is related to oxidative stress as a response to aggression, *Med. Hypotheses.* 143 (2020) 110102. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2020.110102>.
- [10] S.S.K. Wijeratne, S.L. Cuppett, Lipid hydroperoxide induced oxidative stress damage and antioxidant enzyme response in Caco-2 human colon cells, *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 4476–4481. <https://doi.org/10.1021/jf060475v>.
- [11] D.P. Jones, Redefining Oxidative Stress, Antioxidants & Redox Signaling. 8 (2006) 1865–1879. <https://doi.org/10.1089/ars.2006.8.1865>.
- [12] D.H. Kwon, H.J. Cha, H. Lee, S.H. Hong, C. Park, S.H. Park, G.Y. Kim, S. Kim, H.S. Kim, H.J. Hwang, Y.H. Choi, Protective effect of glutathione against oxidative stress-induced cytotoxicity in RAW 264.7 macrophages through activating the nuclear factor erythroid 2-related factor-2/heme oxygenase-1 pathway, *Antioxidants.* 8 (2019). <https://doi.org/10.3390/antiox8040082>.
- [13] S. Magder, Reactive oxygen species: Toxic molecules or spark of life?, *Crit. Care.* 10 (2006) 1–8. <https://doi.org/10.1186/cc3992>.
- [14] M. Abo, Y. Urano, K. Hanaoka, T. Terai, T. Komatsu, T. Nagano, Development of a highly sensitive fluorescence probe for hydrogen peroxide, *J. Am. Chem. Soc.* 133 (2011) 10629–10637. <https://doi.org/10.1021/ja203521e>.
- [15] M. Rojkind, J. Domínguez-rosales, N. Nieto, P. Greenwel, Cellular and Molecular Life Sciences Role of hydrogen peroxide and oxidative stress, *Cell. Mol. Life Sci.* 59 (2002) 1872–1891. <https://doi.org/10.1007/PL00012511>.
- [16] D. Gupta, Methods for determination of antioxidant capacity: A review, *Int. J. Pharm. Sci. Res.* 6 (2015) 546–566. [https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.6\(2\).546-66](https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.6(2).546-66).
- [17] H. J. Forman, H. Zhang, A. Rinna. Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Mol Aspects Med.* 30 (2008) 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2008.08.006.Glutathione>.
- [18] C. Appenzeller-Herzog, Glutathione- and non-glutathione-based oxidant control in the endoplasmic reticulum, *J. Cell Sci.* 124 (2011) 847–855. <https://doi.org/10.1242/jcs.080895>.
- [19] H.N. Kirkman, G.F. Gaetani, Mammalian catalase: a venerable enzyme with new mysteries, *Trends Biochem. Sci.* 32 (2007) 44–50. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2006.11.003>
- [20] J. Garcia, D. Han, H. Sancheti, L.P. Yap, N. Kaplowitz, E. Cadenas, Regulation of mitochondrial glutathione redox status and protein glutathionylation by respiratory

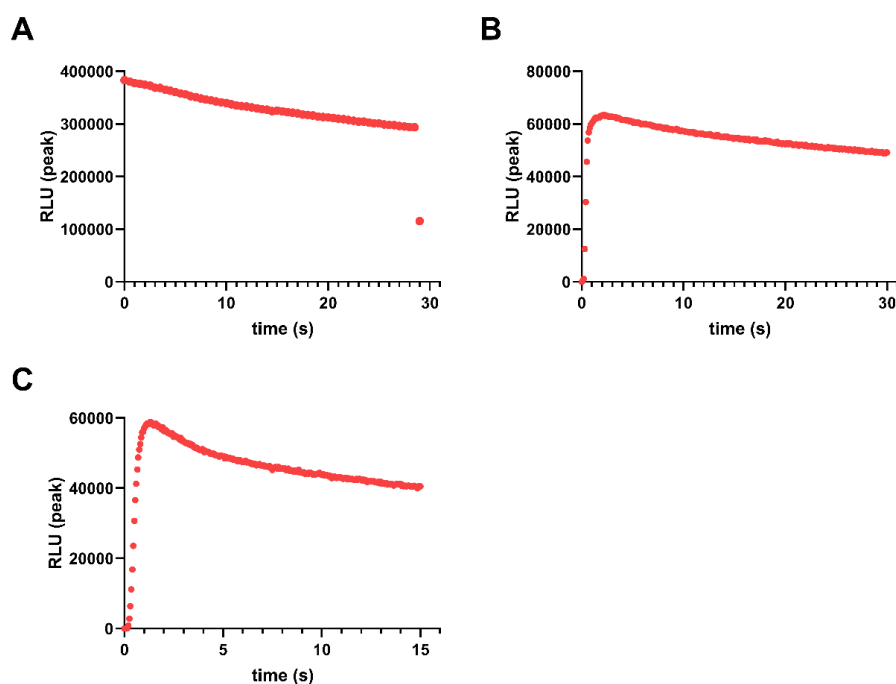
- substrates, *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 39646–39654.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M110.164160>.
- [21] K.L. Schott, M.F. Charão, J. Valentin, J. Cassol, S.C. Garcia, V.J. Pomblum, D. Bohrer, Influência de desproteinizantes ácidos na quantificação da glutatona reduzida eritrocitária por CLAE-UV, *Quim. Nova.* 30 (2007) 592–596.
<https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000300017>.
- [22] J. Zhang, L. Shi, Z. Li, D. Li, X. Tian, C. Zhang, Near-infrared fluorescence probe for hydrogen peroxide detection: Design, synthesis, and application in living systems, *Analyst.* 144 (2019) 3643–3648. <https://doi.org/10.1039/c9an00385a>.
- [23] H. Xiao, P. Li, X. Hu, X. Shi, W. Zhang, B. Tang, Simultaneous fluorescence imaging of hydrogen peroxide in mitochondria and endoplasmic reticulum during apoptosis, *Chem. Sci.* 7 (2016) 6153. <https://doi.org/10.1039/C6SC01793B>.
- [24] K. Hirakawa, Fluorometry of hydrogen peroxide using oxidative decomposition of folic acid, *Anal. Bioanal. Chem.* 386 (2006) 244–248. <https://doi.org/10.1007/s00216-006-0649-1>.
- [25] A.A. Ensafi, T. Khayamian, F. Hasanpour, Determination of glutathione in hemolysed erythrocyte by flow injection analysis with chemiluminescence detection, *J Pharm Biomed Sci.* 48 (2008) 140–144. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2008.04.028>.
- [26] I. Rahman, A. Kode, S.K. Biswas, Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method, *Nat. Protoc.* 1 (2007) 3159–3165. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.378>.
- [27] A.L. Rose, T.D. Waite, Chemiluminescence of luminol in the presence of iron(II) and oxygen: Oxidation mechanism and implications for its analytical use, *Anal. Chem.* 73 (2001) 5909–5920. <https://doi.org/10.1021/ac015547q>.
- [28] S. Koronkiewicz, S. Kalinowski, Direct-injection chemiluminescence detector. Properties and potential applications in flow analysis, *Talanta.* 133 (2015) 112–119.
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.06.077>
- [29] W. Qin, Z.J. Zhang, F.C. Wang, Chemiluminescence flow system for the determination of Fe(II) and Fe(III) in water, *Fresenius. J. Anal. Chem.* 360 (1998) 130–132.
<https://doi.org/10.1007/s002160050659>.
- [30] E.G. Sarantonis, A. Townshend, Flow-injection determination of iron(II), iron(III) and total iron with chemiluminescence detection, *Anal. Chim. Acta.* 184 (1986) 311–315.
[https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(00\)86498-3](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)86498-3).
- [31] O.W. Griffith, Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis, *Free Radic. Biol. Med.* 27 (1999) 922–935. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(99\)00176-8](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(99)00176-8).
- [32] F. Lacy, D.T. O'Connor, G.W. Schmid-Schönbein, Plasma hydrogen peroxide production in hypertensives and normotensive subjects at genetic risk of hypertension, *J. Hypertens.* 16 (1998) 291–303. <https://doi.org/10.1097/00004872-199816030-00006>.
- [33] H. Aebi, Catalase in vitro, *Methods in Enzymology.* 105 (1984) 121–126.
[https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3).
- [34] P. Khan, D. Idress, M.A. Moxley, J.A. Corbett, F. Ahmad, G. von Figura, W.S. Sly, A. Waheed, Md.I. Hassan, Luminol-Based Chemiluminescent Signals: Clinical and Non-clinical Application and Future Uses. *Appl Biochem Biotechnol.* 176 (2017) 139–148.
<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.03.040>.
- [35] M. Moßhammer, M. Köhl, K. Koren, Possibilities and Challenges for Quantitative Optical Sensing of Hydrogen Peroxide, *Chemosensors,* 5 (2017) 1–23.
<https://doi.org/10.3390/chemosensors5040028>.

- [36] H. K. Koh, A. C. Geller, T. J. VanderWeele, Deaths From COVID-19, *JAMA*. 325 (2021) 133–134. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.25381>.
- [37] M. Sanchez, E. Moura, J. Moreira, R. Lima, I. Barreto, C. Pereira, L. Santos, Mortality from COVID-19 in Brazil: analysis of death's civil registry from 2020 January to 2021 February, *SciELO Preprints*. <https://doi.org/10.1590/SciELOPreprints.2012>.
- [38] M. O'Driscoll, G. Ribeiro Dos Santos, L. Wang, D.A.T. Cummings, A.S. Azman, J. Paireau, A. Fontanet, S. Cauchemez, H. Salje, Age-specific mortality and immunity patterns of SARS-CoV-2, *Nature*. 590 (2021) 140–145. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2918-0>.
- [39] B.M. Bakadia, B.O.O. Boni, A.A.Q. Ahmed, G. Yang, The impact of oxidative stress damage induced by the environmental stressors on COVID-19, *Life Sci*. 264 (2021) 118653. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118653>.
- [40] A. Navas Díaz, F. García Sanchez, J.A. González García, Hydrogen peroxide assay by using enhanced chemiluminescence of the luminol-H₂O₂-horseradish peroxidase system: Comparative studies, *Anal. Chim. Acta*. 327 (1996) 161–165. [https://doi.org/10.1016/0003-2670\(96\)00077-3](https://doi.org/10.1016/0003-2670(96)00077-3)
- [41] S.R. Arancibia, M.V. Fuentes, J.B. Miranda, L.B. Zuñiga, M.M. Jáquez, E.H. Orozco, V.C. Trejo, C.R. Ramos. I.C. García, I.E. Caleti, E.R. Martínez, Oxidative Stress, Antioxidant Defenses, COVID-19 and Pollution, *Med. Res. Arch*. 8 (2010). <https://doi.org/10.18103/mra.v8i10.2254>.
- [42] A.C. Gadotti, A.L. Lipinski, F.T. Vasconcellos, L.F. Marqueze, E.B. Cunha, A.C. Campos, C.F. Oliveira, A.N. Amaral, C.P. Baena, J.P. Telles, F.F. Tuon, R.A. Pinho, Susceptibility of the patients infected with Sars-Cov2 to oxidative stress and possible interplay with severity of the disease, *Free Radic. Biol. Med*. 165 (2021) 184–190. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2021.01.044>.
- [43] P. C. Huber, W. P. Almeida, Glutathione E Enzimas Relacionadas: Papel Biológico E Importância Em Processos Patológicos, *Quim. Nova*. 31 (2008) 1170-1179. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422008000500046>.
- [44] J. Pizzorno, Glutathione!, *Integr Med (Encinitas)*. 13 (2014) 8–12.
- [45] Y. Muhammad, Y.A. Kani, S. Iliya, J.B. Muhammad, A. Binji, A. El-Fulaty Ahmad, M.B. Kabir, K. Umar Bindawa, A. Ahmed, Deficiency of antioxidants and increased oxidative stress in COVID-19 patients: A cross-sectional comparative study in Jigawa, Northwestern Nigeria, *SAGE Open Med*. 9 (2021) 205031212199124. <https://doi.org/10.1177/2050312121991246>.
- [46] M. Qin, Z. Cao, J. Wen, Q. Yu, C. Liu, F. Wang, F. Yang, Y. Li, G. Fishbein, S. Yan, B. Xu, Y. Hou, Z. Ning, K. Nie, N. Jiang, Z. Liu, J. Wu, Y. Yu, H. Li, H. Zheng, J. Li, W. Jin, S. Pan, S. Wang, J. Chen, Z. Gan, Z. He, Y. Lu, An antioxidant enzyme therapeutic for COVID-19, *BioRxiv*. (2020). <https://doi.org/10.1101/2020.07.15.205211>.
- [47] S. Damiano, C. Sozio, G. La Rosa, M. Santillo, NOX-Dependent Signaling Dysregulation in COVID-19, *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 10 (2020) 609435. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.608435>.
- [48] M.L. Meizlish, A.B. Pine, J.D. Bishai, G. Goshua, E.R. Nadelmann, M. Simonov, C.H. Chang, H. Zhang, M. Shallow, P. Bahel, K. Owusu, Y. Yamamoto, T. Arora, D.S. Atri, A. Patel, R. Gbyli, J. Kwan, C.H. Won, C. Dela Cruz, C. Price, J. Koff, B.A. King, H.M. Rinder, F.P. Wilson, J. Hwa, S. Halene, W. Damsky, D. Van Dijk, A.I. Lee, H.J. Chun, A neutrophil activation signature predicts critical illness and mortality in COVID-19, *Blood Adv*. 5 (2021) 1164–1177. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2020003568>.
- [49] R.M. Day, Y.J. Suzuki, Cell proliferation, reactive oxygen and cellular glutathione, *Dose-Response*. 3 (2005) 425–442. <https://doi.org/10.2203/dose-response.003.03.010>.
- [50] B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge, *Free radicals in biology and medicine*, third ed., Oxford

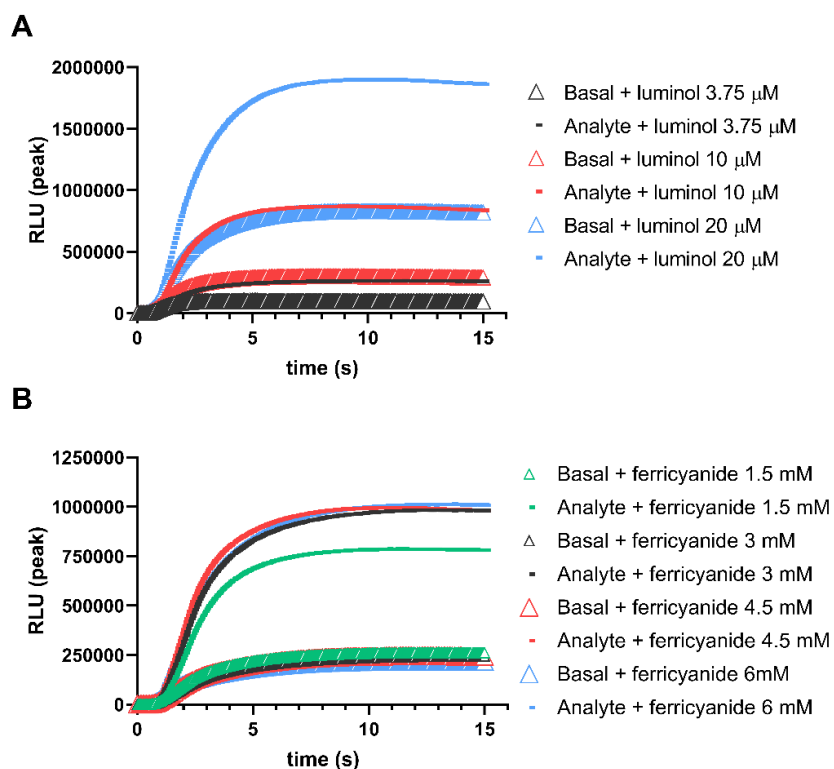
University Press, Oxford, 1999.

- [51] B.P. Held, B. Instruments, An Introduction to Reactive Oxygen Species Measurement of ROS in Yeast Cells, TechNote. (2015) 1–21. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>.
- [52] F. Collin, Chemical basis of reactive oxygen species reactivity and involvement in neurodegenerative diseases, *Int. J. Mol. Sci.* 20 (2019). <https://doi.org/10.3390/ijms20102407>.
- [53] J. Bousquet, J.-P. Cristol, W. Czarlewski, J.M. Anto, A. Martineau, T. Haahtela, S.C. Fonseca, G. Iaccarino, H. Blain, A. Fiocchi, G.W. Canonica, J.A. Fonseca, A. Vidal, H.-J. Choi, H.J. Kim, V. Le Moing, J. Reynes, A. Sheikh, C.A. Akdis, T. Zuberbier, Nrf2-interacting nutrients and COVID-19: time for research to develop adaptation strategies, *Clin. Transl. Allergy.* 10 (2020) 1–18. <https://doi.org/10.1186/s13601-020-00362-7>.

Supplementary information



Supplementary figure 1. Determination of total reading time and photon capture interval to perform the experiments. (A) Total time of the reading: 30 seconds with a photon capture interval of 0.5 seconds. (B) Total time of the reading: 30 seconds with a photon capture interval of 0.1 seconds. (C) Total time of the reading: 15 seconds with a photon capture interval of 0.05 seconds. RLU: relative light unit.



Supplementary figure 2. Graphic representation of the difference in luminescence emission between basal readings and analyte readings. (A) Emission of three different concentrations of luminol with and without the analyte (GSH 5 μM). (B) Emission of four different concentrations of potassium ferricyanide with and without the analyte (GSH 5 μM). RLU: relative light unit.

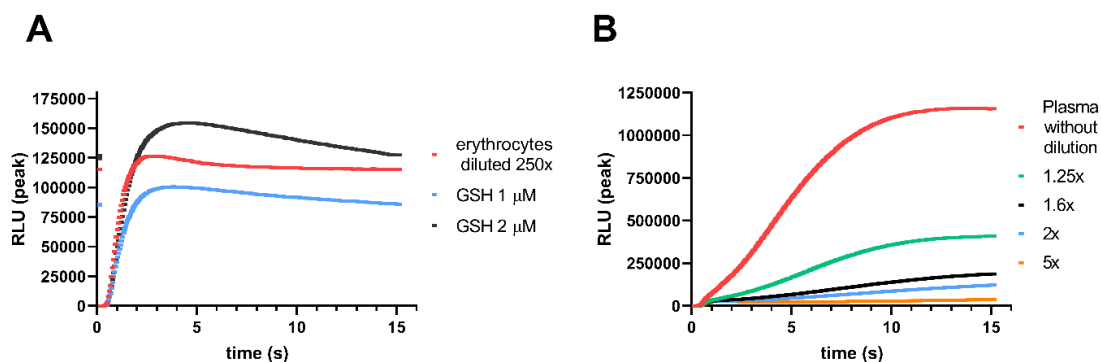
Luminol concentration (μM)	Ratio between the readings (analyte/basal)	Potassium ferricyanide concentration (mM)	Ratio between the readings (analyte/basal)
3.75	2.59	1.5	2.98
10	2.89	3	4.01
20	2.28	4.5	4.16
		6	4.02

Supplementary table 1. Ratio between the maximum peaks of the readings of three different concentrations of luminol and five of potassium ferricyanide with and without the analyte (GSH 5 μM).

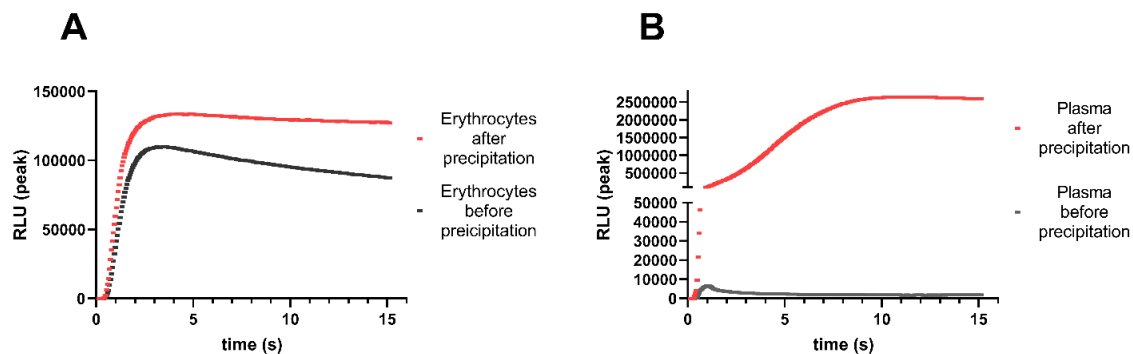
Carbonate buffer pH	Ratio between the readings (GSH/basal)	Ratio between the readings (H_2O_2 /basal)
8.5	8	14
9	14	18

9.5	16	16
10	12	12
10.5	8	6

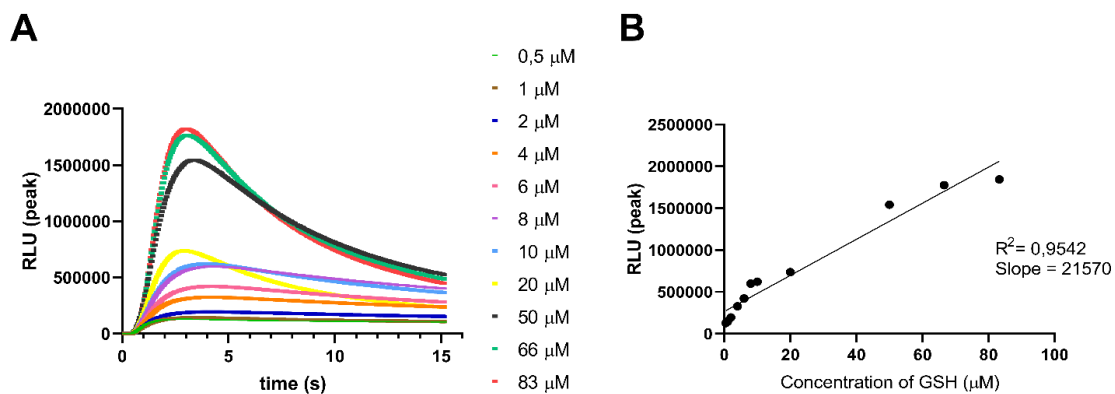
Supplementary table 2. Ratio between the peaks of the readings with five different pH with or without the analytes (GSH 5 μ M and H₂O₂ 1.5 μ M).



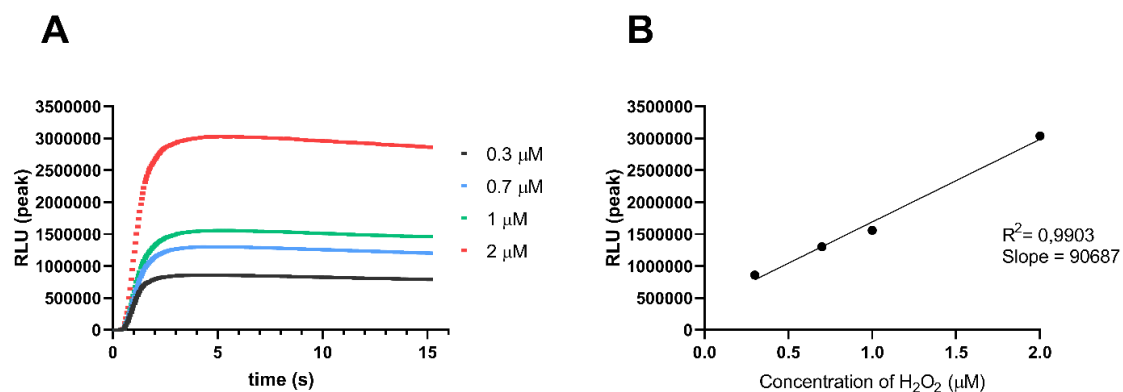
Supplementary figure 3. Determination of the best dilutions to the readings of GSH and H₂O₂. (A) Graphic representation of luminescence emission of GSH in erythrocytes diluted 250x compared with 2 concentrations of GSH (1 and 2 μ M). (B) Comparison of luminescence emission of H₂O₂ in blood plasma without dilution or diluted 1.25, 1.6, 2 and 5 times. RLU: relative light unit.



Supplementary figure 4. Samples readings after and before precipitation with sulfosalicylic acid (10%) (A) Graphic representation of luminescence emission of GSH in erythrocytes diluted 250x before and after protein precipitation (B) Graphic representation of luminescence emission of H₂O₂ in blood plasma without dilution after protein precipitation. RLU: relative light unit.



Supplementary Figure 5. Determination of GSH standard curve. (A) Graphic representation of luminescence emission of 11 concentrations of GSH (0.5 to 83 μM). (B) linear regression of experiment A. RLU: relative light unit.



Supplementary Figure 6. Determination of H₂O₂ standard curve. (A) Graphic representation of luminescence emission of 4 concentrations of H₂O₂ (0.3 to 2 μM). (B) linear regression of experiment A. RLU: relative light unit.

6. CONCLUSÃO

Analisando os dados obtidos, concluímos que os níveis de GSH não se alteram na doença, possivelmente devido a eficácia do sistema de reciclagem da glutathione que restaura rapidamente os níveis de GSH a partir do GSSG, graças a ação da glutathione redutase. Considerando que houve uma diminuição da atividade da catalase nos pacientes de COVID, os baixos níveis plasmáticos de H_2O_2 não podem ser atribuídos a nenhum desses dois sistemas antioxidantes. Com isso, o mais provável de se inferir é o H_2O_2 estaria sendo utilizado para a geração de espécies mais reativas como o radical hidroxil, peroxinitrito e ácido hipocloroso, causando os danos ao parênquima pulmonar relacionados com o estresse oxidativo e a gravidade da doença.

Conclui-se também que a técnica quimiluminescente proposta, utilizando o sistema luminol-ferricianeto de potássio, foi eficaz para a quantificação de GSH e H_2O_2 em hemácia e plasma sanguíneo, respectivamente e que para se obter uma boa linearidade nas quantificações, são necessárias condições padronizadas de pH, temperatura e diluição.

De forma geral, este trabalho traz uma importante contribuição por ter estabelecido uma técnica de baixo custo, alta aplicabilidade e reprodutibilidade para facilitar e baratear a quantificação de moléculas importantes no estudo do estresse oxidativo em diversas doenças. Além disso, irá auxiliar no entendimento da patogênese da COVID-19, que pouco se sabe até o momento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABO, M. et al. Development of a Highly Sensitive Fluorescence Probe for Hydrogen Peroxide. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 133, n. 27, p. 10629-10637, 2011.
- AMARANTE Jr., O. P. de, et al. Validação de métodos analíticos: uma breve revisão. **Cad. Pesq.**, v. 12, p. 116-131, 2001.
- APPENZELLER-HERZOG, C. Glutathione- and non-glutathione-based oxidant control in the endoplasmic reticulum. **Journal of Cell Science**, v. 124, p.847-855, 2011.
- AITKEN, R. J. et al. Oxidative stress and male reproductive health. **Asian Journal of Andrology**, v. 16, n. 1, p. 31–38, 2014.
- ALMEIDA de, J. P. Influência dos testes de triagem para detecção de sangue nos exames imunológicos e de genética forense. Dissertação (Mestrado em biologia celular e molecular) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.
- BALLATORI, N. et al. Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. **Biol Chem.**, v. 390, n. 3, p. 191–214, 2009.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Oxidative stress: Relations between the formation of reactive species and the organism's defense. **Química Nova**, v. 29, n.1, p.113–123, 2006.
- BELTRÁN-GARCÍA, J. et al. Oxidative stress and inflammation in covid-19-associated sepsis: The potential role of anti-oxidant therapy in avoiding disease progression. **Antioxidants**, v. 9, n. 10, p. 1–20, 2020.
- BIRBEN, E. et al. Oxidative stress and antioxidant defense. **World Allergy Organization Journal**, v. 5, n. 1, p. 9–19, 2012.
- BOOPATHI, S.; POMA, A. B.; KOLANDAIVEL, P. Novel 2019 coronavirus structure, mechanism of action, antiviral drug promises and rule out against its treatment. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, v. 0, n. 0, p. 1–10, 2020.
- CAVALCANTE-SILVA, L. H. A. et al. Neutrophils and COVID-19: The road so far. **International Immunopharmacology**, v. 90, p. 107233, 2021.
- CECCHINI, R.; LOURENÇO, A. SARS-CoV-2 infection pathogenesis is related to oxidative stress as a response to aggression. **Medical Hypotheses**, v. 143, p. 1 – 5, 2020.
- CEVIK, M. et al. Virology, transmission, and pathogenesis of SARS-CoV-2. **The BMJ**, v. 371, p. 1–6, 2020.
- CHANDROSS, E. A. A New Chemiluminescent System. **Tetrahedron Letters**, n. 12, p. 761–765, 1963.
- CINQUANTA, L.; FONTANA, D. E.; BIZZARO, N. Chemiluminescent immunoassay technology: what does it change in autoantibody detection? **Autoimmunity Highlights**, v. 8, n. 1, 2017.
- DAMIANO, S. et al. NOX-Dependent Signaling Dysregulation in COVID-19. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, p. 608435, 2021.
- DIAS, J. R. M. Desenvolvimento e otimização de sistemas Quimioluminescentes de detecção de Espécies químicas em águas. Dissertação (Mestrado em Química) – Faculdade de ciências da Universidade do Porto, Porto, 2001.
- DELGADO-ROCHE, L.; MESTA, F. Oxidative Stress as Key Player in Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus (SARS-CoV) Infection. **Archives of Medical Research**, v. 51, n. 5, p. 384–387, 2020.
- DÍAZ, A. N.; SANCHEZ, G. F.; GARCÍA, G. J. A. Hydrogen peroxide assay by using enhanced chemiluminescence of the luminol-H₂O₂-horseradish peroxidase system: Comparative studies. **Analytica Chimica Acta**, v. 327, n. 2, p. 161–165, 1996.

- DU, J.; LI, Y.; LU, J. Investigation on the chemiluminescence reaction of luminol-H₂O₂-S₂-R-SH system. **Analytica Chimica Acta**, v. 448, n. 1–2, p. 79–83, 2001.
- DU, J.; LI, Y.; LU, J. Flow injection chemiluminescence determination of rutin based on its enhancing effect on the luminol-ferricyanide/ferrocyanide system. **Analytical Letters**, v. 34, n. 10, p. 1741–1748, 2001.
- ENSAF, A. A.; KHAYAMIAN, T.; HASANPOUR, F. Determination of glutathione in hemolysed erythrocyte by flow injection analysis with chemiluminescence detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 48, n. 1, p. 140–144, 2008.
- FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Defesa E Estresse Oxidativo. **Medicina**, v. 43, n.1, p.61–68, 1997.
- FORMAN, H. J.; BERNARDO, A.; DAVIES, K. J. A. What is the concentration of hydrogen peroxide in blood and plasma? **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 603, p. 48–53, 2016.
- FORMAN, H. J.; ZHANG, H.; RINNA, A. Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. **Mol Aspects Med**, v. 23, n. 1, p. 1–7, 2008.
- FUKAI, T.; USHIO-FUKAI, M. Superoxide Dismutases: Redox signaling, vascular function and diseases. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 15, n. 6, p. 1583-1606, 2011.
- GARCIA, J., et al. Regulation of Mitochondrial Glutathione Redox Status and Protein Glutathionylation by Respiratory Substrates. **The journal of biological chemistry**, v. 285, n. 51, p. 39646–39654, 2010.
- GLORIEUX, C.; CALDERON, P. B. Catalase, a remarkable enzyme: Targeting the oldest antioxidant enzyme to find a new cancer treatment approach. **Biological Chemistry**, v. 398, n. 10, p. 1095–1108, 2017.
- GOMES, P. R. B. et al. An approach of the historical aspects, the advantages and disadvantages of automated analyzers: Analysis in segmented flow (SFA) the Flow Analyzer - batch (FBA). **J. chem. Pharm**, v. 7, n. 10, p. 901–906, 2015.
- GOUGH, D. R.; COTTER, T. G. Hydrogen peroxide: a Jekyll and Hyde signalling molecule. **Cell Death and Disease**, v. 2, e.212, 2011.
- GRIFFITH, O. W. Determination of Glutathione and Glutathione Disulfide Using Glutathione Reductase and 2-Vinylpyridine. **Analytical biochemistry**, v.106, p.207-212, 1980.
- GRIFFITH, O. W. Biologic and pharmacologic regulation of mammalian Glutathione synthesis. **Free Radical Biology & Medicine**, v.27, n.9/10, v.922-935, 1999.
- GUPTA, D. Methods for determination of antioxidant capacity: A review. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v.6, n.2, p.546–566, 2015.
- HADWAN, M. H. Simple spectrophotometric assay for measuring catalase activity in biological tissues. **BMC Biochemistry**, v.19, n.1, p.1–8, 2018.
- HAHN, G. F.; OLIVEIRA, J. R.; BOCK, P. M. The role of factor 2 erythroid nuclear factor 2 (Nrf2) in diabetes mellitus. **Clinical & Biomedical Research**, v.37, n.3, p.203-213, 2017.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 3^a ed. Oxford: Oxford University Press, 1999.
- HAN, H. Y.; HE, Z. K.; ZENG, Y. E. Chemiluminescence method for the determination of glutathione in human serum using the Ru(phen)₃²⁺ - KMnO₄ system. **Microchimica Acta**, v.155, n.3–4, p.431–434, 2006.
- HE, L., et al. Novel Iron(III)-Based Metal-Organic Gels with Superior Catalytic Performance toward Luminol Chemiluminescence. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v.9, n.37, p.31834–31840, 2017.
- HELD, B. P. An Introduction to Reactive Oxygen Species Measurement of ROS in Yeast Cells.

TechNote, p.1–21, 2015.

HIRAKAWA, K. Fluorometry of hydrogen peroxide using oxidative decomposition of folic acid. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 386, n. 2, p. 244–248, 2006.

HOROWITZ, R. I.; FREEMAN, P. R.; BRUZZESE, J. Efficacy of glutathione therapy in relieving dyspnea associated with COVID-19 pneumonia: A report of 2 cases. **Respiratory Medicine Case Reports**, v. 30, p. 101063, 2020.

HUANG, Y.; ZHANG, Z.; ZHANG, D. Chemiluminescence flow injection analysis of menadione sodium bisulfite based on luminol reaction. **Analytical Letters**, v. 33, n. 13, p. 2677–2688, 2000.

HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p.1170-1179, 2008.

JAKUBOWSKI, W. et al. Luminol luminescence induced by oxidants in antioxidant-deficient yeasts *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochemistry and Molecular Biology International**, v. 45, n. 1, p. 191–203, 1998.

JIANG, L.; HE, L.; FOUNTOLAKIS, M. Comparison of protein precipitation methods for sample preparation prior to proteomic analysis. **J. Chromatogr. A**, v. 1023, p. 317–320, 2004.

JONES, D. P. Redefining Oxidative Stress. **Clinical Measures of the Balance**, v.8, 2006.

KAMIDATE, T.; KUNIYA, I.; WATANABE, H. Simultaneous Determination of Cysteine and Glutathione via Use of Time-Resolved Luminol Chemiluminescence Method. **Chemistry Letters**, p. 2049–2052, 1993.

KHAN, P. et al. Luminol-Based Chemiluminescent Signals: Clinical and Non-clinical Application and Future Uses. **Physiology & behavior**, v. 176, n. 5, p. 139–148, 2017.

KIRKMAN, H. N.; GAETANI, G. F. Mammalian catalase: a venerable enzyme with new mysteries. **Trends in Biochemical Sciences**, v.32, n.1, p.44–50, 2007.

KORONKIEWICZ, S.; KALINOWSKI, S. Direct-injection chemiluminescence detector. Properties and potential applications in flow analysis. **Talanta**, v. 133, p. 112–119, 2015.

KOSLOV, E. M. et al. Involvement of Oxidative Stress and the Innate Immune System in SARS-CoV-2 Infection. **Diseases**, v. 9, n. 17, 2021.

KUBO, H.; TORIBA, A. Chemiluminescence flow injection analysis of reducing agents based on the luminol reaction. *Anal. Chim. Acta*, v.353, n.2-3, p.345-349, 1997.

LACY, F.; O'CONNOR, D. T.; SCHMID-SCHÖNBEINA, G. W. Plasma hydrogen peroxide production in hypertensives and normotensive subjects at genetic risk of hypertension. **J. Hypertens**, v.16, p.291–303, 1998.

LI, B. et al. Secondary chemiluminescence emission of the luminol-ferricyanide system induced by reducing agents. **Microchimica Acta**, v. 162, n. 1–2, p. 189–198, 2008.

LI, X. et al. Molecular immune pathogenesis and diagnosis of COVID-19. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 10, n. 2, p. 102–108, 2020.

MAGDER, S. Reactive oxygen species: toxic molecules or spark of life? **Critical Care**. v.10, p.208, 2006.

MALVIYA, R. et al. High performance liquid chromatography: a short Review. **Journal of Global Pharma Technology**, v. 2, n. 5, p. 22–26, 2009.

MÁRTON, M., et al. O. NRF2-regulated cell cycle arrest early stage of oxidative stress response mechanism. **Plos One**, v.13, n.11, 2018.

MCCORD, J. M. The evolution of free radicals and oxidative stress. **American Journal of Medicine**, v.108, n.8, p.652–659, 2000.

MCGILL, M. R., JAESCHKE, H. A direct comparison of methods used to measure oxidized

- glutathione in biological samples: 2-vinylpyridine and N-ethylmaleimide. **Toxicol Mech Methods**, v.25, n.8, p.589–595, 2015.
- MIROŃCZUK-CHODAKOWSKA, I.; WITKOWSKA, A. M.; ZUJKO, M. E. Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body. **Advances in Medical Sciences**, v. 63, n. 1, p. 68–78, 2018.
- MISHRA, R.; PATEL, H.; YUAN, L.; GARRETT, J. T. Role of reactive oxygen species and targeted therapy in melanoma. **Cancer Research Frontiers**, v. 4, n. 1, p. 101-130, 2018.
- MOLONEY, J. N.; COTTER, T. G. Ros signaling in the biology of cancer. **Seminars in cell & developmental biology**, v. 80, p. 50-64, 2018.
- MOUSSA, Z.; M.A. JUDEH, Z.; A. AHMED, S. Nonenzymatic Exogenous and Endogenous Antioxidants. **Free Radical Medicine and Biology**, 2019.
- OESTREICHER, J.; MORGAN, B. Glutathione: subcellular distribution and membrane transport. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 97, n. 3, p. 270-289, 2018.
- QIANG MA. Role of Nrf2 in oxidative stress and toxicity. **Pharmacology and Toxicology**, v. 53, p. 401-426, 2013.
- QIN, W., ZHANG, Z. J., WANG, F. C. Chemiluminescence flow system for the determination of Fe (II) and Fe (III) in water. **Fresenius' Journal of Analytical Chemistry**, v. 360 n. 1, p. 130–132, 1998.
- RAHMAN, I., KODE, A., BISWAS, S. K. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. **Nature Protocols**, v.1, n.6, p.3159–3165, 2007.
- RAOF, J. B.; OJANI, R.; KARIMI-MALEH, H. Electrocatalytic oxidation of glutathione at carbon paste electrode modified with 2,7-bis (ferrocenyl ethyl) fluoren-9-one: application as a voltammetric sensor. **Journal of Applied Electrochemistry**, n. 39, p. 1169–1175, 2009.
- REUTER, S.; GRUPTA, S. C.; CHATURVEDI, M. M.; AGGARWAL, B. B. – Oxidative stress, inflammation and câncer: How are they linked? **Free Radical Biology & Medicine**, v. 49, n. 11, p.1603-1616, 2010.
- ROJKIND, M. et al. Role of hydrogen peroxide and oxidative stress in healing responses. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 59, p. 1872 – 1891, 2002.
- ROSE, A. L., WAITE, T. D. Chemiluminescence of luminol in the presence of iron (II) and oxygen: Oxidation mechanism and implications for its analytical use. **Analytical Chemistry**, v. 73, n. 24, p. 5909–5920, 2001.
- SAMIR, D. Oxidative Stress Associated with SARS-Cov-2 (COVID-19) Increases the Severity of the Lung Disease - A Systematic Review. **Journal of Infectious Diseases and Epidemiology**, v. 6, n. 3, 2020.
- SANTOS, C, S. **Oxidação quimiluminescente do luminol em meios micelares: Desenvolvimento de um ensaio para determinação da capacidade anti-radicalar.** Dissertação (Mestrado em química orgânica) – Instituto de química, Universidade de São Paulo, São paulo, 2008.
- SARANTONIS, E. G., TOWNSHEND, A. Flow-injection determination of iron (II), iron (III) and total iron with chemiluminescence detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 184, p. 311-315, 1986.
- SCHOTT, K. L., et al. Influência de desproteinizantes ácidos na quantificação da glutathione reduzida eritrocitária por clae-uv. **Quim. Nova**, v. 30, n. 3, p. 592-596, 2007.
- SHEVLIN, P. B., NEUFELD, H. A. Mechanism of the Ferricyanide Catalyzed Chemiluminescence of Luminol. **Journal of Organic Chemistry**, v. 35, n. 7, p. 2178–2182, 1970.

- SIES, H. Oxidative stress: introductory remarks. 1^a ed. Londres: **Academic Press**, 1985.
- SOSA, V.; MOLINÉ, T.; SOMOZA, R.; PACIUCCI, R.; KONDOH, H.; LEONEON, M. – Oxidative stress and câncer: an overview. **Ageing Research Reviews**, v. 12, p. 376-390, 2013.
- SUHAIL, S. et al. Role of Oxidative Stress on SARS-CoV (SARS) and SARS-CoV-2 (COVID-19) Infection: A Review. **Protein Journal**, v. 39, n. 6, p. 644–656, 2020.
- TESKEY, G. et al. Glutathione as a Marker for Human Disease. **Advances in Clinical Chemistry**, v. 87, 2018.
- TIETZE, F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. **Analytical Biochemistry**. v. 27, p. 502-522, 1969.
- ULRICH, K.; JAKOB, U. The role of thiols in antioxidant systems. **Free Radic Biol Med.**, v. 140, p. 14–27, 2020.
- VALLAMKONDU, J. et al. SARS-CoV-2 pathophysiology and assessment of coronaviruses in CNS diseases with a focus on therapeutic targets. **Molecular Basis of Disease**, v. 1866, p. 165889, 2020.
- VAN' T EVER, T. J. et al. The Concentration of Glutathione in Human Erythrocytes is a Heritable Trait. **Free Radic Biol Med**, v. 23, n. 1, p. 1–7, 2008.
- VASCONCELOS, S. M. L., et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: Principais métodos analíticos para a sua determinação. **Química Nova**. v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.
- VYSAKH A., et al. Role of NF-κB Signaling Pathway and Oxidative Stress in Liver Inflammation. **Austin Hepatol**, v. 1, n. 1, p.1 004–1, 2016.
- WALTE, G. N., MUELLER, S. Chemiluminescence detection of hydrogen peroxide. **Principles of free radical biomedicine**, v. 1, 2011.
- WHITE, E. . et al. Chemiluminescence of Luminol: The Chemical Reaction. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 86, n. 6, p. 2–3, 1964.
- WU, J. H.; BATIST, G. Glutathione and glutathione analogues: therapeutic potentials. **Biochimica and Biophysica Acta (BBA)**, v. 1830, n. 5, p. 3350-3353, 2013.
- XIAO, H. et al. Simultaneous fluorescence imaging of hydrogen peroxide in mitochondria and endoplasmic reticulum during apoptosis. **Chem. Sci**, v.7, n.9, p.6153, 2016
<https://doi.org/10.1039/C6SC01793B>
- YANG, J., WANG, S., LEE, J. H. Photovoltaic detection of hydrogen peroxide employing potassium ferricyanide as a catalyst in the chemiluminescence of luminol. **Sensors and Materials**, v. 26, n. 9, p. 677–686, 2014.
- YE, S. et al. Fluorescent probes for: In vitro and in vivo quantification of hydrogen peroxide. **Chemical Science**, v. 11, n. 44, p. 11989–11997, 2020.
- YILDIZ, G.; DEMIRYÜREK, A. T. Ferrous iron-induced luminol chemiluminescence: A method for hydroxyl radical study. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 39, n. 3, p. 179–184, 1998.
- ZAGATTO, E. A. G.; VIDA, A. C. F.; WORSFOLD, P. J. **Encyclopedia of Analytical Science**. 3^a ed. *Amsterdã: Elsevier*, 2019.
- ZIA-UD-DEN, N. et al. Corona Virus; A Comprehensive Overview About Its Life Cycle and Pathogenicity. **American Journal of Biomedical and Life Sciences**, v. 8, n. 3, p. 54, 2020.
- ZHANG, J., et al. Near-infrared fluorescence probe for hydrogen peroxide detection: Design, synthesis, and application in living systems. **Analyst**, v.144, n. 11, p. 3643–3648, 2019.
- ZOURAB, S. M. et al. Oxidation of amines by potassium ferricyanide in AOT surfactant systems. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 24, n. 1, p. 67–77, 2003.