



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

WILLIAM CAPELLARI FUMEGALI

**Tempo de permanência em UTI na determinação
do desfecho para morte ou alta de pacientes com
COVID-19**

Londrina
2023

WILLIAM CAPELLARI FUMEGALI

**Tempo de permanência em UTI na determinação
do desfecho para morte ou alta de pacientes com
COVID-19**

Exame de defesa apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Patologia Experimental.

Orientador: Prof^ª. Dra. Alessandra Lourenço Cecchini Armani

Londrina
2023

WILLIAM CAPELLARI FUMEGALI

**Tempo de permanência em UTI na determinação do
desfecho para morte ou alta de pacientes com COVID-
19**

Exame de defesa apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Patologia Experimental.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof^a Dra. Alessandra
Lourenço Cecchini Armani
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof^a Dra. Glaura Scantamburlo Alves
Fernandes
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Dra. Natalia Medeiros Dias Lopes
Universidade Estadual de Londrina – UEL
02/06/2023

Prof. Dr. Rodrigo Cabral Luiz
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Dr. Fernando Pinheiro de Souza Neto
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 02 de junho de 2023

AGRADECIMENTOS

Agradecer primeiramente meus amados pais Elizabete e Wagner, pela educação que me deram, por todo o apoio e incentivo para seguir atrás dos meus sonhos. Estar com vocês torna tudo mais tranquilo e agradável, trazendo calma mesmo para os tempos mais estressantes. Amo vocês incondicionalmente.

Agradeço também a minha noiva, Pamela, por estar sempre ao meu lado, tantos nos momentos felizes quanto nos momentos de angústia e medo, sempre me incentivando com palavras positivas e deixando a vida mais leve e tranquila. Por você tenho o mais puro e sincero amor.

A Professora Dra. Alessandra Lourenço Cecchini Armani, pela oportunidade que me foi dada, dedicação, apoio e compreensão, contribuindo imensamente para o meu aprendizado e evolução profissional.

Agradecer aos meus amigos de laboratório, presentes durante a minha jornada, obrigada pelo companheirismo, confidências, momentos de descontração e incentivo. Agradeço especialmente aos meus amigos Thiago Nascimento e Jose de Melo, pela troca de ideias nos projetos de COVID, pelo auxílio nos experimentos e principalmente por estarem sempre presentes nos momentos mais difíceis dessa caminhada. Agradeço também ao doutorando Luca, pelo auxílio em grande parte das análises.

Ao técnico Jesus Antônio Vargas pela notável ajuda na parte experimental e pela dedicação aos mestrandos e doutorandos do laboratório.

Aos pacientes e familiares que concordaram em participar do projeto, mesmo passando por um momento muito difícil em suas vidas.

Agradeço também a banca, pela disposição em avaliar o projeto, pelos conselhos e sugestões para contribuir na pesquisa.

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida durante a realização deste projeto, ao programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e a todos os órgãos de fomento que possibilitam a realização das pesquisas em nosso laboratório.

Agradeço a todos, que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho e para meu crescimento profissional e pessoal, a quem expresso meus sinceros agradecimentos.

“Para criaturas tão pequenas como nós, a vastidão só é suportável
através do amor”
Carl Sagan

FUMEGALI, William Capellari. **Tempo de permanência em UTI na determinação do desfecho para morte ou alta de pacientes com COVID-19, 2023**, 94 páginas. Dissertação de mestrado (Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2023.

RESUMO

A COVID-19 é uma doença complexa, que afeta o sistema imunológico e causa respostas inflamatórias, estresse oxidativo e danos teciduais. A exacerbação do estresse oxidativo é uma das principais causas de complicações da doença. Sabendo que as complicações apresentadas pelos pacientes internados possuem uma duração média de 3 semanas, nosso estudo visou compreender as diferenças existentes em dois grupos de pacientes com diferentes tempos de internação, a partir da análise de exames hematológicos, bioquímicos, do estresse oxidativo e de características clínicas e demográficas como parâmetros de comparação, afim de se compreender suas associações com a gravidade e prognóstico da doença. Amostras de sangue foram coletadas de 160 pacientes internados em UTI e foram divididos em dois grupos (grupo A = Até 21 dias de internação, grupo B = Mais de 21 dias de internação). Dados clínicos e demográficos foram obtidos a partir dos prontuários eletrônicos. Para avaliar o estresse oxidativo, foram avaliadas a atividade das enzimas antioxidantes glutathiona reduzida (GSH); Catalase (CAT) e Superóxido Dismutase (SOD); formação de hidroperóxidos de membrana e malondialdeído (MDA) foram medidos. O grupo B apresentou uma diferença mais acentuada em parâmetros hematimétricos. Ambos os grupos apresentaram aumentos acentuados nos níveis de Uréia e Creatinina, sendo que o grupo B apresentou níveis significativamente maiores. Os níveis de GSH estavam aumentados no grupo B, assim como os marcadores oxidativos sistêmicos como a lipoperoxidação inicial e tardia. Observamos um predomínio de óbito em ambos os grupos (67,7% no grupo A e 53,8% no grupo B). Com relação a comorbidades, hipertensão arterial sistêmica (HAS), diabetes mellitos (DM) e obesidade foram as mais prevalentes, sendo também as que mais apresentaram um desfecho de óbito em ambos os grupos, juntamente com doença renal. Demonstramos que o período de internação se correlaciona diretamente com parâmetros hematimétrico e de marcadores de lesão renal, assim como de marcadores de

estresse oxidativo e que, aparentemente, a presença destas comorbidades elencada anteriormente levam os pacientes a terem um pior desdobramento da doença.

Palavras-chaves: COVID-19. Estresse Oxidativo. Marcadores hematológicos e bioquímicos.

FUMEGALI, William Capellari. **Time-course in the ICU stay in determining the outcome for death or discharge of patients with COVID-19. 2023.** 94 pages. Masters dissertation (Postgraduate Program in Experimental Pathology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2023.

ABSTRACT

Caused by the SARS-CoV-2 virus, COVID-19 is a complex disease that affects the immune system and causes inflammatory responses, oxidative stress and tissue damage. Exacerbation of oxidative stress is one of the main causes of disease complications. Knowing that the complications of hospitalized patients have an average duration of 3 weeks, our study aimed to understand the existing differences in two groups of patients with different times of hospitalization (group A = Up to 21 days of hospitalization, group B = More than 21 days of hospitalization), using hematological, biochemical, oxidative stress and pathological and demographic characteristics markers as comparison parameters, in order to understand their associations with the severity and prognosis of the disease. Blood samples were obtained from 160 patients admitted to the ICU of the University Hospital of the State University of Londrina. Clinical and demographic data were obtained from electronic medical records. Erythrocytes were used to quantify initial lipid peroxidation, reduced glutathione (GSH), superoxide dismutase (SOD) and activity of catalase (CAT). Formation of membrane hydroperoxides and malondialdehyde (MDA) were measured. Group B showed a more pronounced difference in hematimetric parameters. Both groups showed marked increases in Urea and Creatinine levels, with group B showing significantly higher levels. GSH levels were increased in group B, as well as systemic oxidative markers such as early and late lipoperoxidation. We observed a domain of death in both groups (67,7% in group A and 53,8% in group B). With regard to comorbidities, the most prevalent were SAH (systemic arterial hypertension), DM (diabetes mellitus) and obesity, and they were also the ones with the most one death in both groups, along with kidney disease. We demonstrated that the length of stay is directly correlated with hematimetric parameters and markers of kidney damage, as well as markers of oxidative

stress, and that apparently the presence of comorbidities leads to a more unfavorable course of the disease.

Key words: COVID-19. Oxidative Stress. Hematological and biochemical markers.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 Espectro dos sintomas da COVID-19	17
Figura 2 Fases da evolução clínica da COVID-19.....	18
Figura 3 Linha do tempo dos casos de pacientes com COVID-19 desde o início da doença.....	19
Figura 4 Curso clínico dos principais sintomas e evolução clínica desde o início da doença em pacientes hospitalizados com COVID-19	19
Figura 5 Reações químicas realizadas pela superóxido dismutase (1) e pela Catalase (2).....	24
Figura 6 Ciclo catalítico da glutatona, demonstrando a conversão de sua forma reduzida (GSH) a forma oxidada (GSSG), pelas enzimas glutatona peroxidase (GSH-px) ou glutatona oxidase (GO), e sua redução de GSH a GSSG pela enzima glutatona redutase (GR).....	25

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

•OH	Radical hidroxila
8-oxoG	8-oxoguanina
ATP	Adenosina trifosfato
CAT	Catalase
CCL2	Ligante 2 de Quimiocina com motivo C-C
COVID-19	Corona Virus Disease 19
DM2	Diabetes Mellitus
DCR	Doença renal crônica
ECA-2	Enzima conversora de angiotensina 2
EO	Estresse oxidativo
ERO	Espécies reativas de oxigênio
GSH	Glutaciona reduzida
GO	Glutaciona Oxidase
GPx	Glutaciona Peroxidase
GSR	Glutaciona Redutase
GSSG	Glutaciona oxidada
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
IFN- γ	Interferon-gama
IL	Interleucina
LOOH	Hidroperóxidos lipídicos
MALT	Tecidos linfóides associados à mucosa
MDA	Malondialdeído
NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
NOX	NADPH oxidase
NETs	Armadilhas extracelulares de neutrófilos
NF- κ B	Fator nuclear kappa B
Nrf2	Fator de transcrição nuclear associado ao E2
NLRP3	Proteína 3 da família do NOD-like receptor
NRL	Relação neutrófilo/Linfócito

O ₂ ⁻	Anion radical superóxido
OH-1	Heme oxigenase-1
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PMNs	Polimorfonucleares
PRR	Receptor de reconhecimento de padrão
RNS	Espécies reativas de nitrogênio
RT-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase com Transcrição Reversa
SRAG	Síndrome respiratória aguda grave
SARS-CoV-2	Coronavírus 2 da síndrome respiratória aguda grave
SOD	Superóxido Dismutase
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TNF- α	Fator de necrose tumoral-alfa
UTI	Unidade de Terapia Intensiva

SUMÁRIO

1 REVISÃO DE LITERATURA.....	16
1.1 COVID-19.....	16
1.2 EVOLUÇÃO CLÍNICA DA COVID-19	18
1.3 FATORES DE RISCO PARA PROGNÓSTICO DESFAVORÁVEL DA COVID-19	20
1.4 RESPOSTA IMUNOLÓGICA CONTRA O SARS-COV-2	21
1.5 ESTRESSE OXIDATIVO	23
1.6 ESTRESSE OXIDATIVO E COVID-19	25
2 JUSTIFICATIVA.....	29
3 OBJETIVOS.....	30
3.1 OBJETIVOS GERAIS	30
3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	30
4 ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO	31
5 CONCLUSÃO.....	32
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	33
6 REFERÊNCIAS	34
7 ARTIGO	46
8 ANEXOS – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP.....	87

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1 COVID-19

A COVID-19 (Corona Vírus Disease 19) é uma doença infecciosa respiratória causada pelo SARS-CoV-2 (coronavírus 2 da síndrome respiratória aguda grave), surgindo na cidade de Wuhan na China, em 2019, que rapidamente se espalhou pelo mundo (Araf, Y, et al., 2021). SARS-CoV-2 se apresenta como o terceiro coronavírus a emergir como um problema de saúde pública e causar surtos na população humana nas últimas duas décadas, sendo este o causador da atual pandemia (Park, M, et al., 2020).

Até meados de junho de 2023, já eram mais de 767 milhões de casos confirmados ao redor do mundo, levando a óbito mais de 6,5 milhões de pessoas segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) (WHO, 2023). Apenas no Brasil, são mais de 37 milhões de casos acumulados, apresentando mais de 698 mil mortos. Em termos de mortalidade, o Brasil se apresenta com uma taxa de 328,9/100 mil habitantes, enquanto sua letalidade se encontra em 1,9% (Brasil, Ministério da Saúde., 2023).

O SARS-CoV-2 é um vírus altamente transmissível, cujo contágio normalmente ocorre via gotículas liberadas pelos indivíduos infectados ao tossir, espirrar ou falar, contaminando o ambiente e indivíduos, que por sua vez, podem perpetuar a propagação do vírus (WHO, 2022).

De acordo com dados recentes, cerca de 80% das pessoas infectadas com o vírus SARS-CoV-2 apresentam sintomas leves ou são assintomáticos, não necessitando de intervenção médica. Esses sintomas podem incluir febre, fadiga e tosse seca. Os casos moderados podem ser tratados em atendimento ambulatorial. No entanto, cerca de 20% dos pacientes podem desenvolver uma forma mais grave da doença, precisando ser hospitalizados para tratamento da pneumonia crítica (CONASS; 2023). O curso da doença pode mostrar uma rápida evolução para falência de múltiplos órgãos, casos mais graves podem

culminar em morte dos pacientes (Tsai PH, et al., 2021). Em casos mais graves, os indivíduos podem apresentar dispneia grave, culminando em hipoxemia com saturação de oxigênio abaixo de 85%, levando a síndrome respiratória aguda grave (SRAG), choque séptico e disfunção da coagulação sanguínea. Nesses casos, pacientes necessitam de cuidados em Unidade de Terapia Intensiva (UTI) (Figura 1)(Cecchini & Cecchini AL., 2020).

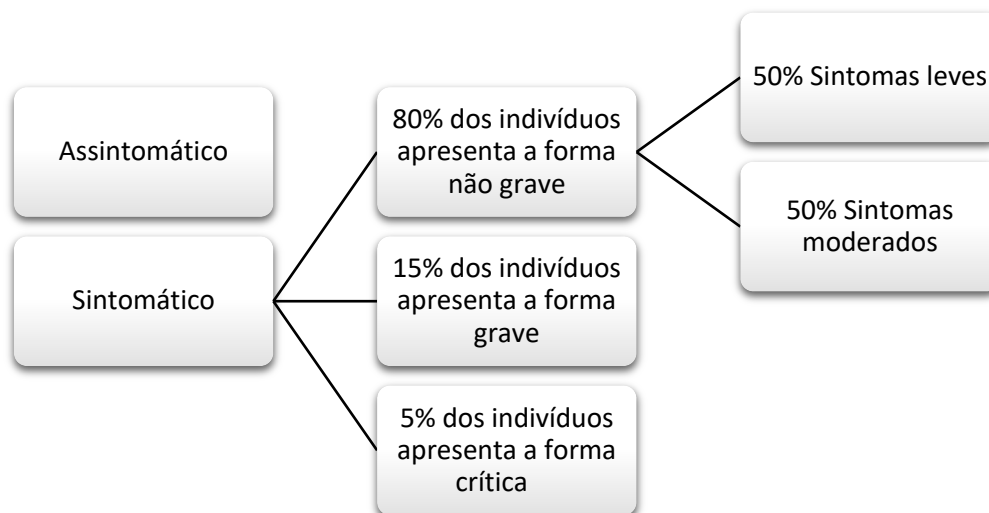


Figura 1 Espectro dos sintomas da COVID-19: De assintomática à forma crítica da doença. Fonte: Próprio autor.

Uma das principais estratégias de combate a pandemia é a testagem para detectar o vírus e dessa forma conseguir monitorar o cenário epidemiológico e acompanhar a taxa de transmissão (Carod-Artal FJ., 2021). O Brasil possui dois principais métodos para se detectar o SARS-CoV-2: RT-PCR. Esse teste detecta o vírus a partir de seu material genético, podendo se analisar em qualquer momento da infecção; e o teste rápido de antígeno, que é capaz de detectar antígenos do próprio vírus, sendo este indicado para indivíduos sintomáticos ou que tiveram contato com pessoas sintomáticas (Guimarães TC, et al., 2022).

As estratégias de tratamento para a COVID-19 estão melhorando rapidamente. Todavia, a terapia utilizada ainda é amplamente relacionada ao suporte do paciente e focada na prevenção de possíveis complicações, sendo assim, uma abordagem individual para cada paciente mediante as suas necessidades. As melhores medidas que temos contra a COVID-19 é o

distanciamento de pessoas infectadas e a vacinação, que protegem não apenas a si mesmo, mas toda a comunidade (Zheng C, et al, 2022; Fiolet T, et al., 2022).

1.2 Evolução clínica da COVID-19

É bem estabelecido que o período de incubação viral é, em média, de 5 a 7 dias, com intervalos que podem chegar a até 12 dias, sendo esse o período em que os primeiros sintomas levam para aparecer desde o momento da infecção (figura 2) (Cevik, et al., 2020).

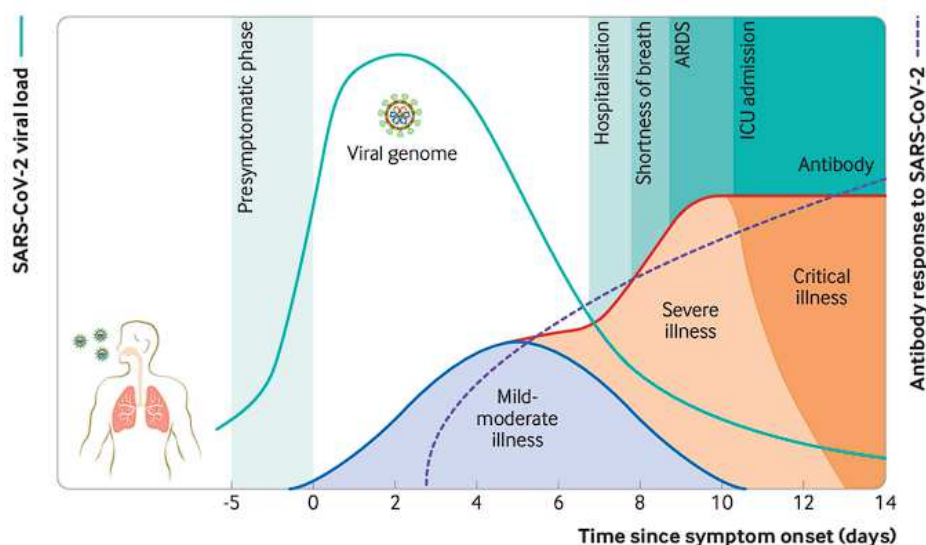


Figura 2 Fases da evolução clínica da COVID-19. Fonte: CEVIK, et al., 2020

Huang e colaboradores (2020) estudaram 41 pacientes infectados pelo SARS-CoV-2 e avaliaram características clínicas desses pacientes. No início da doença, 40 dos 41 pacientes apresentavam febre, sendo esse o sintoma mais comum, seguido de tosse (31 pacientes) e mialgia ou fadiga (18 pacientes). A média de duração do tempo entre o início dos sintomas até a primeira internação hospitalar foi de 07 dias, a ocorrência de dispneia 08 dias, SRAG e ventilação mecânica 09 dias e admissão em UTI 10,5 dias (figura 3) (Huang, et al., 2020).

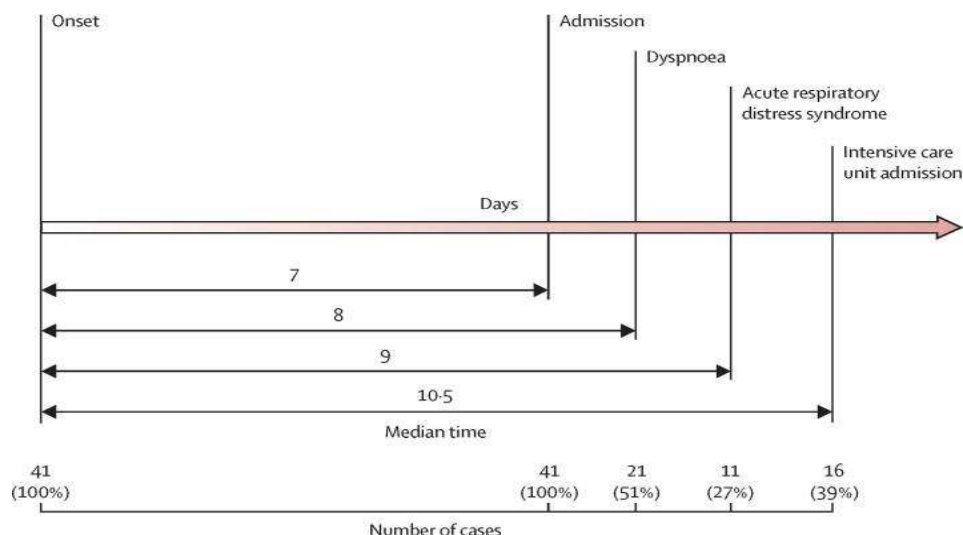


Figura 3 Linha do tempo dos casos de pacientes com COVID-19 desde o início da doença. Fonte: Huang, et al., 2020

Em um estudo de coorte retrospectivo realizado por Zhou e colaboradores (2020) utilizando 191 pacientes hospitalizados na China, demonstrou o curso clínico da doença (figura 4) (Zhou, et al., 2020). Seus achados demonstram que a dispneia ocorre por volta do sétimo dia em pacientes sobreviventes. A sepse surge em torno do nono dia nos pacientes que sobreviveram e no décimo dia em pacientes que não sobreviveram. Os pacientes são admitidos na UTI aproximadamente no décimo segundo dia após o início dos sintomas. Após esse período, o desenvolvimento de novas complicações, tais como lesões cardíacas, renais e até infecções secundárias podem levar os pacientes a óbito (Zhou, et al., 2020).

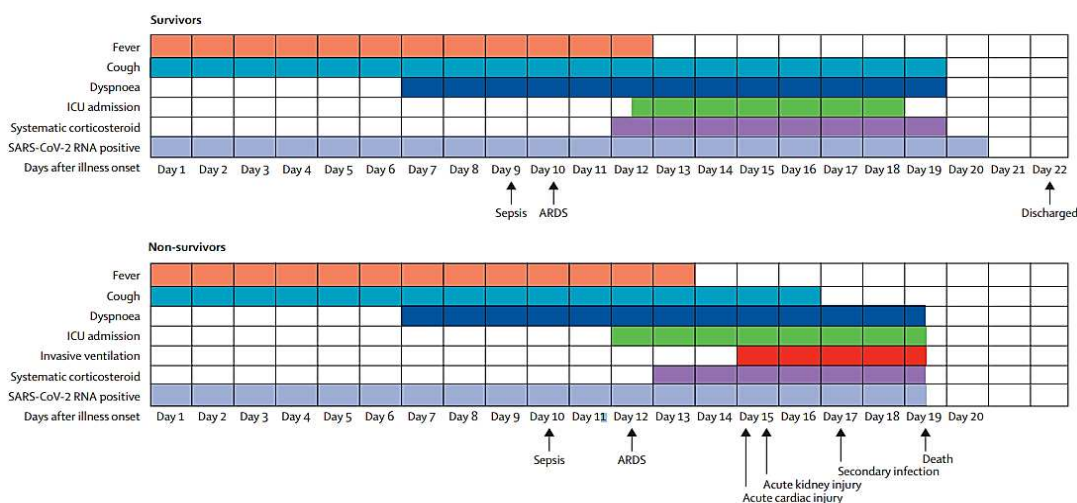


Figura 4 Curso clínico dos principais sintomas e evolução clínica desde o início da doença em pacientes hospitalizados com COVID-19. Fonte: Zhou, et al., 2020

1.3 Fatores de risco para prognóstico desfavorável da COVID-19

Estudos epidemiológicos demonstram que a gravidade e morbidade da COVID-19 se correlacionam com comorbidades pré-existentes nos pacientes e que aparecem como fatores de risco para um pior prognóstico, aumentando o risco de infecções graves e morte (Alam MS, Czajkowsky DM., 2020; Ejaz H, et al., 2020; Dessie ZG, Zewotir T., 2021). Os principais fatores de risco são os cardiovasculares, além de diabetes mellitus, hipertensão e obesidade. Essas comorbidades também estão associadas com níveis basais aumentados de espécies reativas de oxigênio (ERO) (Delgado RL, Mesta F., 2020; Alam MS, Czajkowsky DM., 2020; Damiano S, et al., 2020).

Diabetes mellitus (DM) se apresenta como um dos fatores de risco que alteram a gravidade e a mortalidade da doença em pacientes com COVID-19. A relação entre a COVID-19 e a diabetes foi explicada pelo aumento na expressão da enzima conversora de angiotensina 2 (ECA-2) (Choi JH, et al., 2022; Rajpal, et al., 2020). DM2 é caracterizado por um estado de inflamação crônica devido a uma alteração no perfil de células reguladoras de células inflamatórias de perfil TH1 e TH17, levando a uma piora no curso da infecção viral, além de que, torna os indivíduos mais vulneráveis a surtos na produção de citocinas, possibilitando maiores complicações (Hodgson K, et al., 2015).

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) tem sido observada com maior frequência em pacientes com COVID-19 grave do que aqueles que não apresentam a forma grave da doença. Xiaochen li e colaboradores (2020) relataram que a hipertensão, existente no momento da admissão na UTI, foi significativamente associada com o desenvolvimento para a COVID-19 grave (Xiaochen li, et al., 2020). O histórico de hipertensão arterial sistêmica estava presente em aproximadamente 15 a 30% dos pacientes internados (Zhou, et al., 2020). Durante a pandemia, na região da Itália, quase 75% dos pacientes que morreram apresentavam hipertensão arterial (Kreutz, et al., 2020).

A obesidade se mostra como um fator de preocupação de saúde no mundo todo e tem sido considerado como fator de risco para diversas infecções

incluindo pelo SARS-CoV-2 (Zhou Y et al., 2021). A obesidade demonstra ter efeitos deletérios na imunidade do hospedeiro, assim como afetar a função pulmonar de múltiplas formas, desde mecânica (Dixon AE, Peters U., 2018) até inflamatória (Kawai T, Autieri MV, Scalia R., 2021), tornando esse indivíduo mais propenso a sofrer com sintomas respiratórios até evoluir a insuficiência respiratória (Zhou Y et al., 2021; Yu W, et al., 2021).

É sabido que o SARS-CoV-2 afeta pessoas em todo o mundo. Além de comorbidades como diabetes, hipertensão e obesidade, outras condições como doenças renais, hepáticas e coinfeções estão associadas a um maior risco de infecção e piores prognósticos. Nesse contexto, é de extrema importância que indivíduos com comorbidades adotem medidas preventivas mais rigorosas para proteger sua saúde e bem-estar (Ejaz H, et al., 2020).

1.4 Resposta Imunológica contra o SARS-CoV-2

A resposta imune inata é considerada como uma defesa crítica contra o SARS-CoV-2, pois se baseia em uma resposta inespecífica que se inicia através da ativação de receptores de reconhecimento de padrões (PRR) em macrófagos e células dendríticas pela interação com padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) induzindo ativação de vias inflamatórias e respostas imunes (Ma Z, et al., 2018). A eficácia de uma resposta inata contra o SARS-CoV-2 é importante não apenas para se combater o vírus logo no início da infecção, mas também para estruturar a base de uma resposta adaptativa mais vigorosa e específica. Alterações nesses processos estão envolvidos com desequilíbrio imunológico e uma maior suscetibilidade do hospedeiro, desempenhando um papel vital nos sintomas clínicos e na gravidade da doença COVID-19 (Shafqat A, et al., 2022).

As superfícies mucosas são as primeiras barreiras de defesa contra o SARS-CoV-2, sendo protegidas contra o vírus por meio dos tecidos linfóides associados à mucosa (MALT). Como descrito, o vírus entra no corpo humano inicialmente via trato respiratório e mucosa oral, nesses tecidos a IgA é o que

lhes concede proteção inicial (Rizzo P, et al., 2020). SARS-CoV-2 utiliza a proteína S (proteína spike) presente em seu envelope para se ligar a enzima ECA2, sendo esta utilizada como receptor, possibilitando a sua entrada nas células do hospedeiro e bloqueando a enzima (Mason, 2020). Uma vez bloqueada, a enzima ECA2 não apresentará mais a sua atividade de clivagem da bradicinina. Como consequência a bradicinina se acumula nos pulmões e induz a migração de neutrófilos, potencializando o dano tecidual causado pelo aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, levando a formação de edema pulmonar e insuficiência respiratória (Sodhi, et al., 2018). A redução da função fisiológica do ECA2 também resulta em casos agudos de hipertensão, levando à disfunção de múltiplos órgãos (Zhang J, et al., 2020).

Células dendríticas, macrófagos e neutrófilos atuam como primeira linha de defesa celular e iniciam a reação imune, sendo capazes de afetar o tipo de resposta e sua intensidade (Li Q, et al., 2022). Essas células ativadas são capazes de produzir diversas citocinas que desencadeiam uma cascata inflamatória que, através de uma regulação positiva da expressão dessas citocinas via NF- κ B gera a tempestade de citocinas. Uma vez instalado, esse cenário cria um ambiente repleto de espécies reativas de oxigênio geradas por macrófagos e neutrófilos, o que induz ao estresse oxidativo. Esse estresse oxidativo, por sua vez, é capaz de induzir a uma maior liberação de citocinas, perpetuando esse ciclo que é capaz de gerar danos teciduais independentemente do vírus (Cecchini & Cecchini AL., 2020).

A tempestade de citocinas é um achado comum em pacientes que apresentam complicações decorrentes da infecção pelo SARS-CoV-2 (Tang XD, et al., 2021). Ela se desenvolve a partir de uma resposta imune inadequada ao vírus, não sendo capaz de eliminar eficientemente as células infectadas. Pacientes com COVID-19 apresentam níveis aumentados de diversas citocinas, incluindo IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, CCL2 (MCP-1), TNF- α , IFN- γ (Frisoni P, et al., 2022). Sabe-se que a produção excessiva dessas citocinas pró-inflamatórias está intrinsecamente relacionada com o quadro clínico do paciente, sendo esse um fator preditor da gravidade da doença devido à forte associação com a falência de múltiplos órgãos, podendo levar à morte (Tang XD, et al., 2021).

1.5 Estresse oxidativo

O estresse oxidativo é definido como um desequilíbrio entre moléculas oxidantes e antioxidantes, sendo que nesse cenário temos um predomínio das oxidantes (Sies., 1985), ou, uma definição mais contemporânea, quando ocorre falhas na sinalização e controle das reações de oxidação e redução (REDOX) (Jones., 2006). As espécies pró-oxidantes são divididas em radicalares, que são moléculas que apresentam um elétron desemparelhado em sua camada de valência, como o radical hidroxila ($\bullet\text{OH}$) e o ânion superóxido (O_2^-) e não radicalares, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Jones, 2008). Entretanto, as moléculas antioxidantes, aquelas responsáveis por neutralizar as espécies reativas, podem ser enzimáticas, como a Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT), Glutathione Peroxidase (GPx) e Glutathione Redutase (GSR), e as não enzimáticas, como as vitaminas E e C e a Glutathione reduzida (GSH) (Moussa Z, et al., 2019).

Em quantidades moderadas, a geração dessas espécies, que podem ser de oxigênio ou de nitrogênio (ERN) é importante para o bom funcionamento do organismo e de vias de sinalização, como a via do fator de necrose tumoral α (TNF- α) e a via do fator nuclear kappa B (NF κ B), além de serem importantes reguladores da proliferação e sobrevivência celular. Porém, quando o equilíbrio redox é quebrado, essas espécies podem reagir com outras biomoléculas, incluindo proteínas, lipídios, carboidratos, ácidos nucleicos, intermediários metabólicos, entre outros (Reuter, et al., 2010). As mitocôndrias são as principais fontes de espécies oxidantes em todos os tipos celulares de forma contínua e fisiológica. As espécies reativas de oxigênio (ERO) são formados a partir da redução parcial do oxigênio na cadeia transportadora de elétrons na geração de ATP, durante processos de apoptose, e também pela atividade de algumas enzimas como xantina oxidase, NADPH oxidase e as pertencentes ao citocromo P450 (Musatov A., 2012). Reagindo com o DNA nuclear ou mitocondrial, ocorre a formação de 8-oxoguanina (8-oxoG) (Lushchak VI., 2014), além de mutações ocasionado por quebras no DNA (Cadet J, et al., 2017). O malondialdeído (MDA) é um produto comumente encontrado a partir da oxidação de lipídeos de membrana. A sua formação indica perda da integridade e da permeabilidade da

membrana plasmática. Já a oxidação de lipoproteínas do sangue pode acelerar a progressão da aterosclerose (Yuan T, et al., 2019).

As moléculas antioxidantes desempenham um papel crucial na prevenção, retardamento e inibição do dano oxidativo. Seu objetivo não é eliminar completamente os oxidante, mas sim mantê-los em níveis fisiológicos que não sejam prejudiciais ao organismo (Moussa Z, et al., 2019). A SOD é a primeira linha de defesa do organismo contra radicais livres de oxigênio, estando presente em todas as células do corpo humano. Se apresenta com 3 isoformas, com diferentes íons metálicos que são necessários para a sua função catalítica: A SOD Cu/Zn (Cu/ZnSOD ou SOD1) se apresentam no citoplasmática, a SOD manganês (MnSOD ou SOD2) está presente nas mitocôndrias e a SOD extracelular (ecSOD ou SOD3) (Miller., 2012; Qin Z, et al., 2008; Miao L, St Clair DK, 2009). Atuando por mecanismos iguais, são capazes de reagir com o ânion superóxido, convertendo em peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular (Figura 5 (1)). Na presença de ferro, esse peróxido de hidrogênio, pode vir a formar radicais hidroxila que é extremamente tóxico e que não possuem um mecanismo enzimático no organismo para a defesa dessas espécies (Cecchini & Cecchini AL., 2020; Lushchak VI, 2014). Dessa forma, evitar a formação dessas espécies se torna a forma de proteção mais eficiente possível. A Catalase, enzima presente no citosol e peroxissomos, utiliza de NADPH para converter H_2O_2 em água e oxigênio (Figura 5 (2)) (Vasconcelos, et al., 2007).

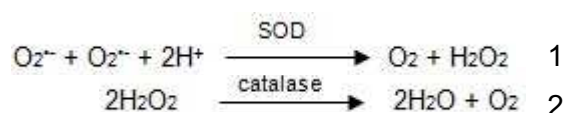


Figura 5 Reações químicas realizadas pela superóxido dismutase (1) e pela Catalase (2).
Fonte: Lushchak VI, 2014

Outra enzima envolvida na conversão de H_2O_2 em água e oxigênio é a Glutathiona peroxidase, sendo abundante principalmente nas hemácias e hepatócitos (Huber, Almeida., 2008). A glutathiona se apresenta em duas formas, reduzida (GSH) e oxidada (GSSG). Para que se ocorra a degradação de H_2O_2 , é necessário a que a glutathiona peroxidase converta a forma reduzida para a forma oxidada da glutathiona, e o processo reverso é realizado pela glutathiona redutase (Figura 6) (Moussa Z, et al., 2019). Utilizando de NADPH como substrato para converter GSSG em GSH, a glutathiona redutase realiza processo

fundamental que se estabelecer a manutenção das defesas antioxidantes (Figura 6), uma vez que a formação de GSSG ocorre após a exposição da GSH a um agente oxidante (Deponte, M., 2013).

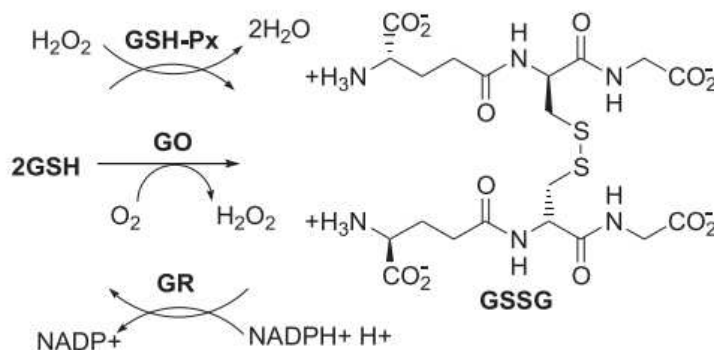


Figura 6 Ciclo catalítico da glutatona, demonstrando a conversão de sua forma reduzida (GSH) para a forma oxidada (GSSG), pelas enzimas glutatona peroxidase (GSH-px) ou glutatona oxidase (GO), e sua redução de GSSG a GSH pela enzima glutatona redutase (GR).
Fonte: Huber e Almeida, 2008

1.6 Estresse oxidativo e COVID-19

Estudos evidenciam que os parâmetros oxidativos podem sinalizar a gravidade da doença (Suhail S, et al., 2020; Chernyak et al., 2020; Gain C, et al., 2023). Muhammad e colaboradores (2021) demonstraram que pacientes com COVID-19 apresentam altos níveis de ERO, juntamente com menores níveis de antioxidantes, ocasionando em aumento de estresse oxidativo sistêmico (Muhammad Y, et al., 2021).

Processos infecciosos e inflamatórios são capazes de induzir um estado de hiperóxia que, conseqüentemente, leva a um aumento na produção de ERO nas mitocôndrias, e se tratando de uma infecção pelo vírus SARS-CoV-2 que é capaz de infectar células com grande número de mitocôndrias, como os pneumócitos tipo II, a quantidade de ERO geradas tende a ser elevada, prejudicando ainda mais o quadro desses pacientes (Chernyak et al., 2020).

Um mecanismo fundamental adicional que pode contribuir para a geração de ERO (incluindo $\text{O}_2^{\cdot-}$ e H_2O_2) em indivíduos afetados pelo COVID-19 é a ativação da enzima Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato (NADPH)

oxidase (NOX). A Nox é responsável por catalisar a transferência de elétrons do NADPH para o oxigênio molecular, gerando $O_2^{\cdot-}$, que pela ação da SOD, será convertido em H_2O_2 (Cárdenas-Rodríguez N, et al., 2021). A isoforma 2 (NOX-2) foi superexpressa em pacientes hospitalizados com COVID-19 e foi associada ao aumento do estresse oxidativo (EO) (Violi F, et al., 2020).

Após infectado, os neutrófilos são os primeiros a responder de modo que extravasem rapidamente da corrente sanguínea para os tecidos sólidos, fornecendo uma forte linha de defesa contra os agentes invasores (Vorobjeva NV, Chernyak BV., 2020). De acordo com Lage e colaboradores (2022), há uma associação positiva entre os níveis de neutrófilos e a gravidade da COVID-19, uma vez que pacientes com estado moderado-grave da doença apresentavam uma contagem mais elevada dessas células (Lage, et al., 2022). Um estudo conduzido por Jianhong Fu e colaboradores (2020), demonstrou que uma alta relação entre neutrófilos para linfócitos (NLR) foi um preditor de mau prognóstico, mesmo nos momentos iniciais da doença. NLR foi associado com níveis muito mais altos de produção de ERO, levando a um maior desenvolvimento da forma grave da doença devido a danos teciduais e complicações trombóticas (Laforge, et al., 2020; DiNicolantonio JJ, McCarty M., 2020). Além do burst respiratório, neutrófilos utilizam de degranulação, fagocitose e liberação de armadilhas extracelulares (NETs) para combater os patógenos. Esse efeito é mais proeminente em bactérias, mas podem contribuir para a imunidade antiviral (McKenna, et al., 2022).

O estresse oxidativo que se instala é capaz de agir na membrana plasmática de eritrócitos gerando alterações (Effenberger-Neidnicht, K., Hartmann, M., 2018) que, associada a outros fatores, levam a hemólise em pacientes com COVID-19, aumentando os níveis de hemoglobina livre e grupamento heme, sendo posteriormente degradado pela heme oxigenase (OH-1) gerando ferro livre (Su WL et al., 2021). Segundo Oliveira e colaboradores (2017), há evidências de que os eritrócitos alterados a partir de ERO produzidas durante processos inflamatórios são fagocitados por macrófagos e palimorfonucleares (PMNs). Quando essas células são ativadas, elas liberam mais ERO, gerando um ciclo vicioso e contínuo de produção dessas substâncias (Oliveira, et al., 2017).

O excesso de peróxido de hidrogênio gerado durante o estresse oxidativo aumentado, em associação com o ferro (II) que foi gerado a partir da redução do ferro (III) pelo radical ânion superóxido, será convertido em radical hidroxila via reação de Fenton (Henkel, Ralf. 2010). Esse radical é extremamente tóxico para proteínas e membranas celulares, levando as células a morte por apoptose ou necrose (Shi X, et al., 2012). Além disso, o ferro III e suas espécies hidrolíticas são capazes de interagir com o fibrinogênio e/ou fibrina alterando sua morfologia e propriedades, induzindo a formação de coágulos insolúveis resistentes a degradação enzimática (Jankun J, et al., 2014). Esses processos se encontram envolvidos com graves danos ao tecido pulmonar e ocasionando o agravamento da doença, mesmo em momentos onde o SARS-CoV-2 não é mais detectável no organismo (Cao, X., 2020).

A replicação viral na COVID-19 é favorecida pela diminuição das defesas antioxidantes, o que agrava a doença (Delgado RL, Mesta F., 2020). OIagnier e colaboradores (2020) demonstraram que o SARS-CoV-2 tem como alvo a via de Nrf2, conseguindo suprimi-la (OIagnier, et al., 2020). Como resultado, temos uma redução do estado antioxidante, devido a inibição da expressão de genes relacionados a enzimas antioxidantes, como SOD, CAT e GPX (Tsermpini EE, et al., 2022). ERO regulam positivamente o inflamassoma NLRP3, acionado por NF-κB, para produzir citocinas inflamatórias, as quais irão induzir o estresse oxidativo, esse ciclo irá se retroalimentar, fazendo com que as ERO aumentem os níveis de citocinas e as citocinas aumentam os níveis de espécies reativas (Ebrahimi, et al., 2021).

Cavalcanti e colaboradores (2022) demonstram que a atividade da enzima catalase estava reduzida em pacientes com COVID-19 falecidos e nos acometidos que se recuperaram da doença em comparação com o grupo controle (Cavalcanti LF, et al., 2022). Esses resultados são consistentes com um estudo anterior de Muhammad et al. (2021), que também relatou uma diminuição na atividade da catalase em pacientes com COVID-19. Além dessa enzima, alguns oligoelementos antioxidantes como manganês, zinco, selênio e cobre também estavam reduzidos (Muhammad Y, et al., 2021).

O papel do GSH como agente redutor relacionado às ERO tem sido amplamente estudado em função de suas vantagens no organismo, incluindo a atuação como fator antiviral e no manejo de pacientes com COVID-19 (Khanfar A, Al Qaroot B., 2020; Guloyan V, et al., 2020). A presença de níveis elevados de GSH pode melhorar a capacidade de resposta do indivíduo a infecções virais, protegendo as células imunológicas do hospedeiro por meio de seu mecanismo antioxidante e contribuindo para a função adequada de diversas células, incluindo as do sistema imunológico (Forman HJ, Zhang H, Rinna A., 2009). Estudos demonstraram que pacientes com COVID-19 em estado moderado ou grave apresentaram níveis mais baixos de GSH, além de níveis mais elevados de ERO e status redox aumentado (razão ERO/GSH) quando comparados a pacientes com a doença leve (Sestili P, Fimognari C., 2020; Polonikov A., 2020; Jaiswal N, Bhatnagar M, Shah H., 2020; Jorge-Aarón RM, Rosa-Ester MP., 2020).

Os resultados dos estudos de Muhammad e colaboradores (2021) indicam que os pacientes com COVID-19 apresentam níveis inferiores de GSH, GPx, catalase e SOD plasmático em comparação com indivíduos saudáveis (Muhammad Y, et al., 2021). De modo similar, Dworzanski e colaboradores (2020), observaram atividades reduzidas de SOD e GPx em pacientes com vírus Epstein-Barr em um estudo correlato (Dworzański J, et al., 2020). Além disso, as concentrações plasmáticas de oligoelementos antioxidantes, incluindo manganês, zinco, selênio, cobre e cromo, foram avaliadas em pacientes com COVID-19 em comparação com indivíduos controle. Constatou-se que os níveis plasmáticos desses oligoelementos foram significativamente menores nos pacientes com COVID-19 (Muhammad Y, et al., 2021). A deficiência desses oligoelementos compromete tanto a resposta imune quanto a atividade antioxidante, resultando em um agravamento na severidade da condição dos pacientes que apresentem a da doença (Zhang J, et al., 2020; Kardos J, et al., 2018; Taheri M, et al., 2021)

2 JUSTIFICATIVA

A pandemia da COVID-19 que já consta com mais de 6,5 milhões de óbitos ao redor do mundo tem deixando grandes ensinamentos para toda a humanidade. A compreensão sobre mecanismos de infecção, patogênese, prevenção e tratamentos vem se tornando cada vez mais claros. Abranger os conhecimentos sobre as particularidades que tornam essa doença tão complexa pode ser o caminho para tratamentos mais eficazes. A avaliação de diversos parâmetros clínicos associados ao tempo de internação e ao estresse oxidativo em concomitância pode trazer novas perspectivas sobre a COVID-19. Por este motivo, o presente trabalho avaliou estes parâmetros para enriquecer os conhecimentos sobre a evolução COVID-19.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Estabelecer as particularidades clínicas, laboratoriais e de estresse oxidativo em duas coortes de pacientes adultos com diferentes períodos de internação na UTI do Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina, apresentando quadro de COVID-19 durante o período de 10 de julho de 2020 a 10 de janeiro de 2021, e correlacionar com o desfecho clínico para alta ou óbito.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 3.2.1** Análise de parâmetros oxidativos em eritrócitos e no plasma de pacientes internados em UTI com COVID-19.
- 3.2.2** Correlacionar a presença de comorbidades com o desfecho clínico dos pacientes internados em UTI com COVID-19.
- 3.2.3** Análise dos dados hematimétricos e parâmetros bioquímicos dos pacientes internados em UTI com COVID-19.
- 3.2.4** Comparação do perfil de leucócitos e o desfecho clínico dos pacientes internados em UTI com COVID-19.

4 ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

O presente trabalho foi realizado na Universidade Estadual de Londrina, nos laboratórios de Patologia Molecular e de Fisiopatologia e Radicais livres, sendo as amostras obtidas no Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina. Os dados obtidos permitiram a produção de um artigo científico que será submetido para publicação na revista internacional *Free Radicals Biology and medicine* (Fator de impacto: 6.170) A1, e intitula-se: “Time spent in the ICU is determinant for the outcome for death or discharge of patients with COVID-19”.

5 CONCLUSÃO

Este estudo investigou o tempo de permanência em UTI como determinante no desfecho para [óbito ou alta de pacientes com COVID-19. Nossos resultados indicam que a presença de comorbidades está associada a uma maior taxa de mortalidade. Além disso, pacientes com maior tempo de internação apresentaram níveis mais elevados de Ureia e Creatinina. Os parâmetros hematológicos revelaram que o tempo de internação se correlaciona com os piores casos de anemia. Além disso, observou-se que os parâmetros de estresse oxidativo estão alterados de acordo com o tempo de interção. Essas descobertas destacam a importância da gestão adequada de comorbidades, monitoramento renal e hematológico, além da atenção ao estresse oxidativo em pacientes com COVID-19 internados em UTI

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados deste estudo revelam a complexidade da COVID-19. As descobertas destacaram uma relação significativa entre a duração da internação hospitalar e alterações nos parâmetros hematológicos marcadores de lesão renal e de estresse oxidativo. Esses parâmetros são indicadores cruciais da progressão da doença. Portanto, essas observações reforçam a importância de monitorar de perto esses indicadores durante a internação hospitalar para avaliar a evolução do quadro clínico dos pacientes. Compreender essas relações contribui para uma abordagem mais abrangente e personalizada no tratamento da COVID-19, buscando otimizar os cuidados e melhorar os desfechos dos pacientes afetados pela doença.

7 REFERÊNCIAS

Alam MS, Czajkowsky DM. SARS-CoV-2 infection and oxidative stress: Pathophysiological insight into thrombosis and therapeutic opportunities. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2022 Feb;63:44-57. doi: 10.1016/j.cytogfr.2021.11.001. Epub 2021 Nov 15. PMID: 34836751; PMCID: PMC8591899.

Ando, M; Shibuya, A; Tsuchiya, K; Akiba, T; Nitta, K (2006). Reduced expression of Toll-like receptor 4 contributes to impaired cytokine response of monocytes in uremic patients. , 70(2), 358–362. doi:10.1038/sj.ki.5001548

Araf, Y, et al. Omicron variant of SARS-CoV-2: Genomics, transmissibility, and responses to current COVID-19 vaccines. *Medical Virology* 2021.

Brasil, Ministério da Saúde. Banco de dados do Sistema Único de Saúde-DATASUS. Disponível em <http://www.datasus.gov.br> (Acessado em 13 de junho de 2023).

Cadet J, Davies KJA, Medeiros MH, Di Mascio P, Wagner JR. Formation and repair of oxidatively generated damage in cellular DNA. *Free Radic Biol Med.* 2017 Jun;107:13-34. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.12.049. Epub 2017 Jan 2. PMID: 28057600; PMCID: PMC5457722.

Cao, X. COVID-19: immunopathology and its implications for therapy. *Nat Rev Immunol* 20, 269–270 (2020). doi: 10.1038/s41577-020-0308-3.

Cárdenas-Rodríguez N, Bandala C, Vanoye-Carlo A, Ignacio-Mejía I, Gómez-Manzo S, Hernández-Cruz EY, Pedraza-Chaverri J, Carmona-Aparicio L, Hernández-Ochoa B. Use of Antioxidants for the Neuro-Therapeutic Management of COVID-19. *Antioxidants (Basel).* 2021 Jun 17;10(6):971. doi: 10.3390/antiox10060971. PMID: 34204362; PMCID: PMC8235474.

Carod-Artal FJ. Post-COVID-19 syndrome: epidemiology, diagnostic criteria and pathogenic mechanisms involved. *Rev Neurol* 2021;72 (11):384-396 doi: 10.33588/rn.7211.2021230

Cavalcanti LF, Chagas Silva I, do Nascimento THD, de Melo J, Grion CMC, Cecchini AL, Cecchini R. Decreased plasma H₂O₂ levels are associated with the pathogenesis leading to COVID-19 worsening and mortality. *Free Radic Res.* 2022 Nov-Dec;56(11-12):740-748. doi: 10.1080/10715762.2023.2174021. Epub 2023 Feb 1. PMID: 36708322.

Cecchini R., Cecchini AL., SARS-CoV-2 infection pathogenesis is related to oxidative stress as a response to aggression. Elsevier 2020, v 14 outubro de 2020.

Cevik, M., Kuppalli, K., Kindrachuk, J., & Peiris, M. (2020). Virology, transmission, and pathogenesis of SARS-CoV-2. *BMJ*, m3862. doi:10.1136/bmj.m3862

Chernyak BV, Popova EN, Prikhodko AS, Grebenchikov OA, Zinovkina LA, Zinovkin RA. COVID-19 and Oxidative Stress. *Biochemistry (Mosc)*. 2020 Dec;85(12):1543-1553. doi: 10.1134/S0006297920120068. PMID: 33705292; PMCID: PMC7768996.

Choi JH, Choi SH, Yun KW. Risk Factors for Severe COVID-19 in Children: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Korean Med Sci*. 2022 Feb 7;37(5):e35. doi: 10.3346/jkms.2022.37.e35. PMID: 35132841; PMCID: PMC8822112.

CONASS. Painel nacional: COVID-19 [Online]. Disponível em: <https://www.conass.org.br/painelconasscovid19/>. Acesso em 13 de junho de 2023

Damiano S, Sozio C, La Rosa G, Santillo M. NOX-Dependent Signaling Dysregulation in Severe COVID-19: Clues to Effective Treatments. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020 Dec 15;10:608435. doi: 10.3389/fcimb.2020.608435. PMID: 33384971; PMCID: PMC7769936.

Delgado-Roche L, Mesta F. Oxidative Stress as Key Player in Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus (SARS-CoV) Infection. *Arch Med Res*. 2020 Jul;51(5):384-387. doi: 10.1016/j.arcmed.2020.04.019. Epub 2020 Apr 30. PMID: 32402576; PMCID: PMC7190501.

Deponte, M. (2013). Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1830(5), 3217–3266. doi: 10.1016/j.bbagen.2012.09.018

Dessie ZG, Zewotir T. Mortality-related risk factors of COVID-19: a systematic review and meta-analysis of 42 studies and 423,117 patients. *BMC Infect Dis*. 2021 Aug 21;21(1):855. doi: 10.1186/s12879-021-06536-3. PMID: 34418980; PMCID: PMC8380115.

DiNicolantonio JJ, McCarty M. Thrombotic complications of COVID-19 may reflect an upregulation of endothelial tissue factor expression that is contingent on activation of endosomal NADPH oxidase. *Open Heart*. 2020 Jun;7(1):e001337. doi: 10.1136/openhrt-2020-001337. PMID: 32532805; PMCID: PMC7298678.

Dixon AE, Peters U. The effect of obesity on lung function. *Expert Rev Respir Med*. 2018 Sep;12(9):755-767. doi: 10.1080/17476348.2018.1506331. Epub 2018 Aug 14. PMID: 30056777; PMCID: PMC6311385.

Dworzański J, Strycharz-Dudziak M, Kliszczewska E, Kielczykowska M, Dworzańska A, Drop B, Polz-Dacewicz M. Glutathione peroxidase (GPx) and superoxide dismutase (SOD) activity in patients with diabetes mellitus type 2 infected with Epstein-Barr virus. *PLoS One*. 2020 Mar 25;15(3):e0230374. doi: 10.1371/journal.pone.0230374. PMID: 32210468; PMCID: PMC7094858.

Ebrahimi M, Norouzi P, Aazami H, Moosavi-Movahedi AA. Review on oxidative stress relation on COVID-19: Biomolecular and bioanalytical approach. *Int J Biol Macromol*. 2021 Oct 31;189:802-818. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.08.095. Epub 2021 Aug 18. PMID: 34418419; PMCID: PMC8372478.

Effenberger-Neidnicht, K., Hartmann, M. Mechanisms of Hemolysis During Sepsis. *Inflammation* 41, 1569–1581 (2018). <https://doi.org/10.1007/s10753-018-0810-y>

Ejaz H, Alsrhani A, Zafar A, Javed H, Junaid K, Abdalla AE, Abosalif KOA, Ahmed Z, Younas S. COVID-19 and comorbidities: Deleterious impact on infected

patients. *J Infect Public Health*. 2020 Dec;13(12):1833-1839. doi: 10.1016/j.jiph.2020.07.014. Epub 2020 Aug 4. PMID: 32788073; PMCID: PMC7402107.

Fiolet T, Kherabi Y, MacDonald CJ, Ghosn J, Peiffer-Smadja N. Comparing COVID-19 vaccines for their characteristics, efficacy and effectiveness against SARS-CoV-2 and variants of concern: a narrative review. *Clin Microbiol Infect*. 2022 Feb;28(2):202-221. doi: 10.1016/j.cmi.2021.10.005. Epub 2021 Oct 27. PMID: 34715347; PMCID: PMC8548286.

Forman HJ, Zhang H, Rinna A. Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Mol Aspects Med*. 2009 Feb-Apr;30(1-2):1-12. doi: 10.1016/j.mam.2008.08.006. Epub 2008 Aug 30. PMID: 18796312; PMCID: PMC2696075.

Frisoni P, Neri M, D'Errico S, Alfieri L, Bonuccelli D, Cingolani M, Di Paolo M, Gaudio RM, Lestani M, Marti M, Martelloni M, Moreschi C, Santurro A, Scopetti M, Turriziani O, Zanon M, Scendoni R, Frati P, Fineschi V. Cytokine storm and histopathological findings in 60 cases of COVID-19-related death: from viral load research to immunohistochemical quantification of major players IL-1 β , IL-6, IL-15 and TNF- α . *Forensic Sci Med Pathol*. 2022 Mar;18(1):4-19. doi: 10.1007/s12024-021-00414-9. Epub 2021 Aug 31. Erratum in: *Forensic Sci Med Pathol*. 2021 Dec 15;: PMID: 34463916; PMCID: PMC8406387.

Gain C, Song S, Angtuaco T, Satta S, Kelesidis T. The role of oxidative stress in the pathogenesis of infections with coronaviruses. *Front Microbiol*. 2023 Jan 13;13:1111930. doi: 10.3389/fmicb.2022.1111930. PMID: 36713204; PMCID: PMC9880066.

Guimarães TC, Marques BBF, Tinoco JMM, Porto LCMS, Tinoco EMB, Fischer RG. SARS-COV-2 detection in saliva and nasopharyngeal swabs using RT-PCR was similar. *Braz Dent J*. 2022 Mar-Apr;33(2):68-72. doi: 10.1590/0103-6440202204591. PMID: 35508038; PMCID: PMC9645155.

Guloyan V, Oganesian B, Baghdasaryan N, Yeh C, Singh M, Guilford F, Ting YS, Venketaraman V. Glutathione Supplementation as an Adjunctive Therapy in

COVID-19. *Antioxidants* (Basel). 2020 Sep 25;9(10):914. doi: 10.3390/antiox9100914. PMID: 32992775; PMCID: PMC7601802.

Henkel, Ralf. (2010). ROS and sperm DNA integrity – Implications of male accessory gland infections. 10.3109/9781841847474-37.

Hodgson K, Morris J, Bridson T, Govan B, Rush C, Ketheesan N. Immunological mechanisms contributing to the double burden of diabetes and intracellular bacterial infections. *Immunology*. 2015 Feb;144(2):171-85. doi: 10.1111/imm.12394. PMID: 25262977; PMCID: PMC4298412.

Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, Zhang L, Fan G, Xu J, Gu X, Cheng Z, Yu T, Xia J, Wei Y, Wu W, Xie X, Yin W, Li H, Liu M, Xiao Y, Gao H, Guo L, Xie J, Wang G, Jiang R, Gao Z, Jin Q, Wang J, Cao B. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet*. 2020 Feb 15;395(10223):497-506. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30183-5. Epub 2020 Jan 24. Erratum in: *Lancet*. 2020 Jan 30;: PMID: 31986264; PMCID: PMC7159299.

Huber, Paula C.; Almeida, Wanda P.; Fátima, Ângelo de (2008). Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. *Química Nova*, 31(5), 1170–1179. doi:10.1590/S0100-40422008000500046.

Jaiswal N, Bhatnagar M, Shah H. N-acetylcysteine: A potential therapeutic agent in COVID-19 infection. *Med Hypotheses*. 2020 Nov;144:110133. doi: 10.1016/j.mehy.2020.110133. Epub 2020 Jul 24. PMID: 32758904; PMCID: PMC7380211.

Jankun J, Landeta P, Pretorius E, Skrzypczak-Jankun E, Lipinski B. Unusual clotting dynamics of plasma supplemented with iron(III). *Int J Mol Med*. 2014 Feb;33(2):367-72. doi: 10.3892/ijmm.2013.1585. Epub 2013 Dec 11. PMID: 24337469.

Jones, D. P. (2006). Redefining Oxidative Stress. *Antioxidants & Redox Signaling*, 8(9-10), 1865–1879. doi:10.1089/ars.2006.8.1865.

Jones, D. P. Radical-free biology of oxidative stress. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2008 Oct;295(4):C849-68. doi: 10.1152/ajpcell.00283.2008. Epub 2008 Aug 6. PMID: 18684987; PMCID: PMC2575825.

Jorge-Aarón RM, Rosa-Ester MP. N-acetylcysteine as a potential treatment for COVID-19. *Future Microbiol*. 2020 Jul;15:959-962. doi: 10.2217/fmb-2020-0074. Epub 2020 Jul 14. PMID: 32662664; PMCID: PMC7359418.

Kardos J, Héja L, Simon Á, Jablonkai I, Kovács R, Jemnitz K. Copper signalling: causes and consequences. *Cell Commun Signal*. 2018 Oct 22;16(1):71. doi: 10.1186/s12964-018-0277-3. Erratum in: *Cell Commun Signal*. 2018 Nov 12;16(1):80. PMID: 30348177; PMCID: PMC6198518.

Kawai T, Autieri MV, Scalia R. Adipose tissue inflammation and metabolic dysfunction in obesity. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2021 Mar 1;320(3):C375-C391. doi: 10.1152/ajpcell.00379.2020. Epub 2020 Dec 23. PMID: 33356944; PMCID: PMC8294624.

Khanfar A, Al Qaroot B. Could glutathione depletion be the Trojan horse of COVID-19 mortality? *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2020 Dec;24(23):12500-12509. doi: 10.26355/eurrev_202012_24046. PMID: 33336769.

Kreutz R, Algharably EAE, Azizi M, Dobrowolski P, Guzik T, Januszewicz A, Persu A, Prejbisz A, Riemer TG, Wang JG, Burnier M. Hypertension, the renin-angiotensin system, and the risk of lower respiratory tract infections and lung injury: implications for COVID-19. *Cardiovasc Res*. 2020 Aug 1;116(10):1688-1699. doi: 10.1093/cvr/cvaa097.

Laforge M, Elbim C, Frère C, Hémadi M, Massaad C, Nuss P, Benoliel JJ, Becker C. Tissue damage from neutrophil-induced oxidative stress in COVID-19. *Nat Rev Immunol*. 2020 Sep;20(9):515-516. doi: 10.1038/s41577-020-0407-1. Erratum in: *Nat Rev Immunol*. 2020 Aug 10;: PMID: 32728221; PMCID: PMC7388427.

Lage SL, Amaral EP, Hilligan KL, Laidlaw E, Rupert A, Namasivayan S, Rocco J, Galindo F, Kellogg A, Kumar P, Poon R, Wortmann GW, Shannon JP, Hickman

HD, Lisco A, Manion M, Sher A, Sereti I. Persistent Oxidative Stress and Inflammasome Activation in CD14^{high}CD16⁻ Monocytes From COVID-19 Patients. *Front Immunol.* 2022 Jan 14; 12:799558. doi: 10.3389/fimmu.2021.799558. PMID: 35095880; PMCID: PMC8795739.

Li Q, Wang Y, Sun Q, Knopf J, Herrmann M, Lin L, Jiang J, Shao C, Li P, He X, Hua F, Niu Z, Ma C, Zhu Y, Ippolito G, Piacentini M, Estaquier J, Melino S, Weiss FD, Andreano E, Latz E, Schultze JL, Rappuoli R, Mantovani A, Mak TW, Melino G, Shi Y. Immune response in COVID-19: what is next? *Cell Death Differ.* 2022 Jun;29(6):1107-1122. doi: 10.1038/s41418-022-01015-x. Epub 2022 May 17. PMID: 35581387; PMCID: PMC9110941.

Lushchak VI. Classification of oxidative stress based on its intensity. *EXCLI J.* 2014 Aug 26;13:922-37. PMID: 26417312; PMCID: PMC4464080.

Ma Z, Ni G, Damania B. Innate Sensing of DNA Virus Genomes. *Annu Rev Virol.* 2018 Sep 29;5(1):341-362. doi: 10.1146/annurev-virology-092917-043244. PMID: 30265633; PMCID: PMC6443256.

Mason RJ. Pathogenesis of COVID-19 from a cell biology perspective. *Eur Respir J.* 2020 Apr 16;55(4):2000607. doi: 10.1183/13993003.00607-2020. PMID: 32269085; PMCID: PMC7144260.

McKenna E, Wubben R, Isaza-Correa JM, Melo AM, Mhaonaigh AU, Conlon N, O'Donnell JS, Ní Cheallaigh C, Hurley T, Stevenson NJ, Little MA, Molloy EJ. Neutrophils in COVID-19: Not Innocent Bystanders. *Front Immunol.* 2022 Jun 1;13:864387. doi: 10.3389/fimmu.2022.864387. PMID: 35720378; PMCID: PMC9199383.

Miao L, St Clair DK. Regulation of superoxide dismutase genes: implications in disease. *Free Radic Biol Med.* 2009 Aug 15;47(4):344-56. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2009.05.018. Epub 2009 May 25. PMID: 19477268; PMCID: PMC2731574.

Miller AF. Superoxide dismutases: ancient enzymes and new insights. *FEBS Lett.* 2012 Mar 9;586(5):585-95. doi: 10.1016/j.febslet.2011.10.048. Epub 2011 Nov 10. PMID: 22079668; PMCID: PMC5443681.

Moussa, Z.; M.A. Judeh, Z.; A. Ahmed, S. Nonenzymatic Exogenous and Endogenous Antioxidants. *Free Radical Medicine and Biology*, 2019.

Muhammad Y, Kani YA, Iliya S, Muhammad JB, Binji A, El-Fulaty Ahmad A, Kabir MB, Umar Bindawa K, Ahmed A. Deficiency of antioxidants and increased oxidative stress in COVID-19 patients: A cross-sectional comparative study in Jigawa, Northwestern Nigeria. *SAGE Open Med.* 2021 Feb 1; 9:2050312121991246. doi: 10.1177/2050312121991246. PMID: 33614035; PMCID: PMC7871282.

Musatov, A., & Robinson, N. C. (2012). Susceptibility of mitochondrial electron-transport complexes to oxidative damage. Focus on cytochrome c oxidase. *Free Radical Research*, 46(11), 1313–1326. doi:10.3109/10715762.2012.717273.

Olagnier D, Farahani E, Thyrssted J, Blay-Cadanet J, Herengt A, Idorn M, Hait A, Hernaez B, Knudsen A, Iversen MB, Schilling M, Jørgensen SE, Thomsen M, Reinert LS, Lappe M, Hoang HD, Gilchrist VH, Hansen AL, Ottosen R, Nielsen CG, Møller C, van der Horst D, Peri S, Balachandran S, Huang J, Jakobsen M, Svenningsen EB, Poulsen TB, Bartsch L, Thielke AL, Luo Y, Alain T, Rehwinkel J, Alcamí A, Hiscott J, Mogensen TH, Paludan SR, Holm CK. SARS-CoV2-mediated suppression of NRF2-signaling reveals potent antiviral and anti-inflammatory activity of 4-octyl-itaconate and dimethyl fumarate. *Nat Commun.* 2020 Oct 2;11(1):4938. doi: 10.1038/s41467-020-18764-3. Erratum in: *Nat Commun.* 2020 Oct 21;11(1):5419. PMID: 33009401; PMCID: PMC7532469.

Oliveira YP, Pontes-de-Carvalho LC, Couto RD, Noronha-Dutra AA. Oxidative stress in sepsis. Possible production of free radicals through an erythrocyte-mediated positive feedback mechanism. *Braz J Infect Dis.* 2017 Jan-Feb;21(1):19-26. doi: 10.1016/j.bjid.2016.11.004. Epub 2016 Dec 1. PMID: 27916603; PMCID: PMC9425491.

Park, M., Cook, A. R., Lim, J. T., Sun, Y., & Dickens, B. L. (2020). A Systematic Review of COVID-19 Epidemiology Based on Current Evidence. *Journal of Clinical Medicine*, 9(4), 967. doi:10.3390/jcm9040967.

Polonikov A. Endogenous Deficiency of Glutathione as the Most Likely Cause of Serious Manifestations and Death in COVID-19 Patients. *ACS Infect Dis*. 2020 Jul 10;6(7):1558-1562. doi: 10.1021/acsinfecdis.0c00288. Epub 2020 May 28. PMID: 32463221; PMCID: PMC7263077.

Qin Z, Reszka KJ, Fukai T, Weintraub NL. Extracellular superoxide dismutase (ecSOD) in vascular biology: an update on exogenous gene transfer and endogenous regulators of ecSOD. *Transl Res*. 2008 Feb;151(2):68-78. doi: 10.1016/j.trsl.2007.10.003. Epub 2007 Nov 8. PMID: 18201674; PMCID: PMC4230486.

Rajpal, Aman; Rahimi, Leili; Ismailâ-Beigi, Faramarz. Factors Leading to High Morbidity and Mortality of COVID 19 in Patients with Type 2 Diabetes. *Journal of Diabetes*, 2020, doi:10.1111/1753-0407.13085.

Reuter, S., Gupta, S. C., Chaturvedi, M. M., & Aggarwal, B. B. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked. *Free radical biology & medicine*, v.49(11), p.1603–1616, 2010.

Rizzo P, Vieceli Dalla Sega F, Fortini F, Marracino L, Rapezzi C, Ferrari R. COVID-19 in the heart and the lungs: could we "Notch" the inflammatory storm? *Basic Res Cardiol*. 2020 Apr 9;115(3):31. doi: 10.1007/s00395-020-0791-5. PMID: 32274570; PMCID: PMC7144545.

Sestili P, Fimognari C. Paracetamol-Induced Glutathione Consumption: Is There a Link With Severe COVID-19 Illness? *Front Pharmacol*. 2020 Oct 7;11:579944. doi: 10.3389/fphar.2020.579944. PMID: 33117175; PMCID: PMC7577213.

Shafqat A, Shafqat S, Salameh SA, Kashir J, Alkattan K, Yaqinuddin A. Mechanistic Insights Into the Immune Pathophysiology of COVID-19; An In-Depth Review. *Front Immunol*. 2022 Mar 24;13:835104. doi: 10.3389/fimmu.2022.835104. PMID: 35401519; PMCID: PMC8989408.

Shi X, Zhang Y, Zheng J, Pan J. Reactive oxygen species in cancer stem cells. *Antioxid Redox Signal*. 2012 Jun 1;16(11):1215-28. doi: 10.1089/ars.2012.4529. Epub 2012 Mar 9. PMID: 22316005; PMCID: PMC3324813.

Sies, H.; Cadenas, E. Oxidative stress: damage to intact cells and organs. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences*, v. 311, n. 1152, p. 617-631, 1985

Sodhi, C. P., Wohlford-Lenane, C., Yamaguchi, Y., Prindle, T., Fulton, W. B., Wang, S. & Jia, H. (2018). Attenuation of pulmonary ACE2 activity impairs inactivation of des-Arg9 bradykinin/BKB1R axis and facilitates LPS-induced neutrophil infiltration. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 314(1), L17-L31.

Su WL, Lin CP, Hang HC, Wu PS, Cheng CF, Chao YC. Desaturation and heme elevation during COVID-19 infection: A potential prognostic factor of heme oxygenase-1. *J Microbiol Immunol Infect*. 2021 Feb;54(1):113-116. doi: 10.1016/j.jmii.2020.10.001. Epub 2020 Oct 16. PMID: 33176981; PMCID: PMC7566820.

Suhail S, Zajac J, Fossum C, Lowater H, McCracken C, Severson N, Laatsch B, Narkiewicz-Jodko A, Johnson B, Liebau J, Bhattacharyya S, Hati S. Role of Oxidative Stress on SARS-CoV (SARS) and SARS-CoV-2 (COVID-19) Infection: A Review. *Protein J*. 2020 Dec;39(6):644-656. doi: 10.1007/s10930-020-09935-8. Epub 2020 Oct 26. PMID: 33106987; PMCID: PMC7587547.

Taheri M, Bahrami A, Habibi P, Nouri F. A Review on the Serum Electrolytes and Trace Elements Role in the Pathophysiology of COVID-19. *Biol Trace Elem Res*. 2021 Jul;199(7):2475-2481. doi: 10.1007/s12011-020-02377-4. Epub 2020 Sep 8. PMID: 32901413; PMCID: PMC7478435.

Tang XD, Ji TT, Dong JR, Feng H, Chen FQ, Chen X, Zhao HY, Chen DK, Ma WT. Pathogenesis and Treatment of Cytokine Storm Induced by Infectious

Diseases. *Int J Mol Sci.* 2021 Nov 30;22(23):13009. doi: 10.3390/ijms222313009. PMID: 34884813; PMCID: PMC8658039.

Tsai PH, Lai WY, Lin YY, Luo YH, Lin YT, Chen HK, Chen YM, Lai YC, Kuo LC, Chen SD, Chang KJ, Liu CH, Chang SC, Wang FD, Yang YP. Clinical manifestation and disease progression in COVID-19 infection. *J Chin Med Assoc.* 2021 Jan 1;84(1):3-8. doi: 10.1097/JCMA.0000000000000463. PMID: 33230062.

Tsermpini EE, Glamočlija U, Ulucan-Karnak F, Redenšek Trampuž S, Dolžan V. Molecular Mechanisms Related to Responses to Oxidative Stress and Antioxidative Therapies in COVID-19: A Systematic Review. *Antioxidants (Basel).* 2022 Aug 19;11(8):1609. doi: 10.3390/antiox11081609. PMID: 36009328; PMCID: PMC9405444.

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.

Violi F, Oliva A, Cangemi R, Ceccarelli G, Pignatelli P, Carnevale R, Cammisotto V, Lichtner M, Alessandri F, De Angelis M, Miele MC, D'Ettorre G, Ruberto F, Venditti M, Pugliese F, Mastroianni CM. Nox2 activation in Covid-19. *Redox Biol.* 2020 Sep;36:101655. doi: 10.1016/j.redox.2020.101655. Epub 2020 Jul 25. PMID: 32738789; PMCID: PMC7381406.

Vorobjeva NV, Chernyak BV. NETosis: Molecular Mechanisms, Role in Physiology and Pathology. *Biochemistry (Mosc).* 2020 Oct;85(10):1178-1190. doi: 10.1134/S0006297920100065. PMID: 33202203; PMCID: PMC7590568.

World Health Organization. Infection prevention and control during health care when novel coronavirus (nCoV) infection is suspected (2020). Available at: [https://www.who.int/publications-detail/infection-prevention-and-control-during-health-care-when-novel-coronavirus-\(ncov\)-infection-is-suspected-20200125](https://www.who.int/publications-detail/infection-prevention-and-control-during-health-care-when-novel-coronavirus-(ncov)-infection-is-suspected-20200125) (Accessed Dezember 10, 2022).

World Health Organization. WHO Coronavirus Disease (COVID-19) Dashboard | WHO Coronavirus Disease (COVID-19) Dashboard (2023). Available at: <https://covid19.who.int/> (Accessed June 13, 2023)

Yu W, Rohli KE, Yang S, Jia P. Impact of obesity on COVID-19 patients. *J Diabetes Complications*. 2021 Mar;35(3):107817. doi: 10.1016/j.jdiacomp.2020.107817. Epub 2020 Nov 26. PMID: 33358523; PMCID: PMC7690270

Yuan T, Yang T, Chen H, Fu D, Hu Y, Wang J, Yuan Q, Yu H, Xu W, Xie X. New insights into oxidative stress and inflammation during diabetes mellitus-accelerated atherosclerosis. *Redox Biol*. 2019 Jan;20:247-260. doi: 10.1016/j.redox.2018.09.025. Epub 2018 Oct 19. PMID: 30384259; PMCID: PMC6205410.

Zhang J, Wu J, Sun X, Xue H, Shao J, Cai W, Jing Y, Yue M, Dong C. Association of hypertension with the severity and fatality of SARS-CoV-2 infection: A meta-analysis. *Epidemiol Infect*. 2020 May 28;148:e106. doi: 10.1017/S095026882000117X. PMID: 32460927; PMCID: PMC7270484.

Zheng C, Shao W, Chen X, Zhang B, Wang G, Zhang W. Real-world effectiveness of COVID-19 vaccines: a literature review and meta-analysis. *Int J Infect Dis*. 2022 Jan;114:252-260. doi: 10.1016/j.ijid.2021.11.009. Epub 2021 Nov 17. PMID: 34800687; PMCID: PMC8595975.

Zhou Y, Chi J, Lv W, Wang Y. Obesity and diabetes as high-risk factors for severe coronavirus disease 2019 (Covid-19). *Diabetes Metab Res Rev*. 2021 Feb;37(2):e3377. doi: 10.1002/dmrr.3377. Epub 2020 Jul 20. PMID: 32588943; PMCID: PMC7361201.

Zhou, F., Yu, T., Du, R., Fan, G., Liu, Y., Liu, Z., Cao, B. (2020). Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *The Lancet*, 395(10229), 1054–1062. doi:10.1016/s0140-6736(20)30566-3

Tempo de permanência em UTI é determinante no desfecho para óbito ou alta de pacientes com COVID-19

Time spent in the ICU is determinant for the outcome for death or discharge of patients with COVID-19

William Capellari Fumegali¹; Jose de Melo¹; Luca Trancolin¹ Thiago Henrique Daniel do Nascimento¹; Liara Freitas Cavalcanti²; Isabela Chagas Silva¹; Walison Augusto Silva Brito⁴; Cinthia Magalhães Carvalho Grion³; Ruben Cecchini²; Alessandra Lourenço Cecchini¹

¹ Laboratório de Patologia Molecular, Departamento de Ciências Patológicas Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brasil.

² Laboratório de Fisiopatologia e Radicais Livres, Departamento de Ciências Patológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brasil.

³ Departamento de Clínica Médica do Centro de Ciências da Saúde, Hospital Universitário de Londrina, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brasil.

⁴ ZIK plasmatis, Leibniz Institute for Plasma Science and Technology (INP), Felix-Hausdorff-Str. 2, 17489 Greifswald, Germany;

Autor correspondente: Alessandra Lourenço Cecchini

E-mail: alcecchini@uel.br

Fax: +55 (43) 3371 4267

Phone: +55 (43) 3371 4529

Laboratório de Patologia Molecular, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid, PR445, Km 380 Campus Universitário, Londrina, CEP 86051- 990, Paraná, Brazil.

RESUMO

A COVID-19 é uma doença complexa que afeta o sistema imunológico, causando respostas inflamatórias, estresse oxidativo e danos teciduais. A exacerbação do estresse oxidativo é uma das principais causas de complicações da doença. Nosso estudo visou estabelecer as particularidades clínicas, laboratoriais e de estresse oxidativo em duas coortes de pacientes em tempos diferentes de internação em UTI do Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina, apresentando quadro de COVID-19 durante os anos de 2020 e 2021, e relacionar com o desfecho clínico. Amostras de sangue foram coletadas de 160 pacientes internados em UTI e foram divididos em dois grupos (grupo A = Até 21 dias de internação, grupo B = Mais de 21 dias de internação). Dados clínicos e demográficos foram obtidos a partir dos prontuários eletrônicos. Para avaliar o estresse oxidativo, atividade das enzimas antioxidantes glutathiona reduzida (GSH); Catalase (CAT) e Superóxido Dismutase (SOD); formação de hidroperóxidos de membrana e malondialdeído (MDA) foram medidos. O grupo B apresentou uma redução em parâmetros hematimétricos. Ambos os grupos apresentaram aumentos acentuados nos níveis de Uréia e Creatinina, sendo que o grupo B apresentou níveis significativamente maiores. Os níveis de GSH estavam aumentados no grupo B, assim como marcadores de lipoperoxidação. Observamos um predomínio de óbito em ambos os grupos (67,7% no grupo A e 53,8% no grupo B). Comorbidades como hipertensão arterial sistêmica (HAS), diabetes mellitus (DM), obesidade e doença renal foram as mais prevalentes e associadas a um maior número de óbitos em ambos os grupos. Demonstramos que o período de internação está diretamente relacionado a alterações em parâmetros hematimétricos, de lesão renal e com marcadores de estresse oxidativo. Além disso, a presença das comorbidades mencionadas anteriormente leva os pacientes a terem um desfecho mais grave da doença.

Palavras-chaves: COVID-19. Estresse Oxidativo. Marcadores hematológicos e bioquímicos.

INTRODUÇÃO

A COVID-19 (Corona Virus Disease 19) é uma doença infecciosa respiratória causada pelo SARS-CoV-2 (coronavírus 2 da síndrome respiratória aguda grave). Até meados de junho de 2023, já eram mais de 767 milhões de casos confirmados segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), com mais de 37 milhões de casos, apresentando mais de 698 mil óbitos (WHO, 2022; Brasil, Ministério da Saúde., 2022). A maioria dos pacientes apresentam sintomas leves ou são assintomáticos, porém cerca de 20% desenvolvem pneumonia crítica, necessitando de hospitalização (Tsai PH, et al., 2021). A doença pode evoluir rapidamente para falência de múltiplos órgãos em sintomas graves como dispneia, hipoxemia, síndrome respiratória aguda grave (SRAG), choque séptico e disfunção da coagulação. Esses casos requerem cuidados em Unidade de Terapia Intensiva (UTI) (Cecchini & Cecchini AL., 2020).

Parâmetros clínicos e laboratoriais apresentam grande importância para analisar o desfecho de pacientes internados em UTI. Zanella e colaboradores (2021) demonstraram que durante toda a permanência de pacientes em UTI, os valores diários dos parâmetros clínicos e bioquímicos refletiram disfunção aguda pulmonar, hepática e renal, desequilíbrio ácido-base, comprometimento da coagulação e inflamação sistêmica, os quais foram indicativos da sobrevida subsequente do paciente (Zanella, et al., 2021).

A resposta inata é importante no combate ao SARS-CoV-2 no início da infecção. Mudanças nesses processos podem levar a desequilíbrio imunológico, aumentando a suscetibilidade do hospedeiro e influenciando a gravidade da COVID-19 (Shafqat A, et al., 2022). Células dendríticas, macrófagos e neutrófilos produzem citocinas que geram uma cascata inflamatória via NF- κ B, resultando na tempestade de citocinas (Li Q, et al., 2022). O estresse oxidativo induzido por essas células cria uma explosão respiratória que pode danificar tecidos independentemente do vírus (Cecchini & Cecchini AL., 2020).

O estresse oxidativo é capaz de agir na membrana plasmática de eritrócitos gerando alterações que levam a hemólise em pacientes com COVID-19 (Effenberger-Neidnicht, K., Hartmann, M., 2018). Oliveira e colaboradores (2017) forneceram evidências de que esses eritrócitos alterados são fagocitados

por macrófagos e PMN que quando ativadas, irão liberar mais espécies reativas de oxigênio (ERO) gerando assim um ciclo que permite que a produção de ERO seja contínua (Oliveira YP, et al., 2017). OIagnier e colaboradores demonstraram que o SARS-CoV-2 tem como alvo a via de Nrf2, conseguindo suprimi-la, tendo como resultado a redução do estado antioxidante por inibir a expressão de genes relacionados a enzimas antioxidantes, como SOD, CAT e GPX (OIagnier, et al., 2020; Tsermpini EE, et al., 2022).

Fatores de risco cardiovascular como diabetes mellitus, hipertensão e obesidade se associam com pior prognóstico e internação em UTI. Essas comorbidades também estão relacionadas com níveis basais aumentados de ERO (Delgado RL, Mesta F., 2020; Alam MS, Czajkowsky DM., 2020; Damiano S, et al., 2020). Além disso, complicações trombóticas se apresentam de forma mais acentuada na infecção pelo SARS-CoV-2, como embolia pulmonar e acidente vascular sistêmico, podendo ser fatais (Shade JK, et al., 2022).

Estudos demonstram que pacientes que com Doença Renal Crônica (DCR) apresentam um comprometimento da resposta imune inata, estado pró-inflamatório do organismo e disfunção vascular (Ando, et al., 2006; Syed-Ahmed, Maaz; Narayanan, Mohanram., 2019). Além disso, esses pacientes se encontram mais susceptíveis a doença crítica, ocasionando em falência múltipla de órgãos, trombose e resposta inflamatória aumentada (Flythe JE, et al., 2021).

Nosso estudo visou estabelecer as particularidades clínicas, laboratoriais e de estresse oxidativo em duas coortes de pacientes adultos não vacinados com COVID-19 com diferentes períodos de internação em UTI do Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina, durante os anos de 2020 e 2021, e relacionar com o desfecho clínico.

MATERIAIS E MÉTODOS

Desenho experimental

Para este estudo, foram selecionados 160 pacientes adultos (acima de 18 anos) diagnosticados com COVID-19 e não vacinados, que realizaram mais de

uma coleta sanguínea e exames laboratoriais. A presença de comorbidades foi analisada retrospectivamente para todos os pacientes recrutados, após a sua inclusão no estudo, e não foi utilizado como critério de exclusão ou inclusão. Esses pacientes estavam internados na UTI do Hospital Universitário de Londrina (HU), pertencente à Universidade Estadual de Londrina/PR, no período de 10 de julho de 2020 a 10 de janeiro de 2021. O trabalho foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa envolvendo seres humanos da Universidade Estadual de Londrina sob o número CAAE: 34446720.4.0000.5231 e todos os pacientes ou familiares assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). Os participantes foram divididos em dois grupos com base no tempo de internação, sendo grupo A os pacientes que permaneceram até 21 dias internados (A; n=144) e B os pacientes que ficaram mais de 21 dias internados (B; n=16).

As amostras foram obtidas do sangue periférico por punção arterial na rotina de análise de gasometria arterial e por punção venosa na análise do hemograma e outros parâmetros hematimétricos dos pacientes internados na Unidade Terapia Intensiva (UTI) no Hospital Universitário de Londrina (HU/UEL). Após serem usadas para rotina laboratorial, estas foram armazenadas e transportadas ao laboratório de Fisiopatologia e Radicais Livres da Universidade de Londrina (UEL). As amostras sanguíneas foram utilizadas para análise de parâmetros de estresse oxidativo. Dados clínicos, índices hematimétricos, bioquímicos, gasometria e demográficos (idade, sexo, comorbidades e data do início dos sintomas) foram obtidos a partir dos prontuários eletrônicos para apresentação da característica populacional do estudo.

Coleta de Amostras

As amostras de sangue foram coletadas diretamente no laboratório de Hematologia e Bioquímica do HU/UEL. Tubos de heparina e EDTA foram obtidas dos pacientes internados em UTI, sempre na primeira semana de internação, seguidas por coletas em dias alternados até a alta ou óbito dos pacientes. Os tubos foram centrifugados a 3500 rpm por 5 minutos a 4°C para obtenção de

eritrócitos, plasma, soro. Os eritrócitos foram lavados 3 vezes com 1mL de solução de cloreto de sódio a 0,9% e centrifugado a 3500 rpm por 10 minutos a 4°C. Em seguida, os eritrócitos foram armazenados em solução de Alsever por no máximo 7 dias a uma temperatura controlada de 10°C, a fim de preservar sua integridade para a análise da atividade de Glutathiona reduzida (GSH), Catalase (CAT), Superóxido Dismutase (SOD) e os níveis de hidroperóxidos de membrana. Plasma e soro foram armazenadas em freezer -20°C por até 6 meses para posterior análise dos níveis de citocinas e malondialdeído (MDA).

Parâmetros de estresse oxidativo sistêmico

A proteína total foi medida para expressar os resultados da atividade da GSH, CAT, SOD, Lipoperoxidação de membrana induzida por Terc-Butil. As hemácias foram diluídas 1:800 em água destilada e misturadas com reagente cúprico (1:1), repousando em temperatura ambiente por 10 minutos. Logo após, foi adicionado o reagente Folin e incubado em banho maria durante 10 minutos à uma temperatura de 50°C. As concentrações das amostras foram determinadas (mg), utilizando albumina sérica bovina para a curva de concentração padrão e a absorbância foi lida em espectrofotômetro a 660 nm (Shimadzu UV-1650 PC) (Lowry, 1951 modificado por Miller, 1959).

A atividade da enzima catalase (CAT) foi determinada de acordo com o método descrito por Aebi (1984), que se baseia na decomposição do peróxido de hidrogênio diretamente relacionado à sua absorção em 240 nm espectrofotômetro UV-1650 PC UV-vis (Shimadzu, Kyoto, Japão). As hemácias foram diluídas 1:80 em água destilada e diferentes volumes foram incubados em um sistema incluindo 1 M de tampão TRIS e 200 mM de solução de H₂O₂. Os resultados foram expressos em valores de absorbância por minuto por mililitro de amostra (Vabs min⁻¹ ml⁻¹). A concentração da enzima superóxido dismutase (SOD) foi medida pelo método descrito por Marklund & Marklund (1974) em eritrócitos, baseado na inibição da auto-oxidação do pirogalol. A reação foi medida em espectrofotômetro com leitura cinética a 420nm UV-1650 PC UV-vis (Shimadzu, Kyoto, Japão) a 37° graus Celsius, com tampão TRIS 1 M, pirogalol

e água. Os resultados foram expressos em U SOD/gPT. A concentração de GSH foi determinado nos eritrócitos acordo com Tietze (1968) em espectrofotômetro a 412 nm.

A lipoperoxidação foi determinada por quimiluminescência de acordo com Gonzalez-Flecha et al (1991), com base na oxidação de fosfolipídios presentes na membrana eritrocitária induzida por Terc-Butil hidroperóxido, a reação é avaliada em tempo real por 40 minutos. Os eritrócitos foram diluídos 1:1200 em tampão fosfato monobásico 10 mM, pH 7,4 NaCl 0,9%. A reação foi iniciada com adição do Terc-Butil e a curva analisados no luminômetro (Berthols Technologies; Lumat 3; LB 9508) e os resultados foram expressos pico de emissão, velocidade e área sob a curva.

A quantidade de MDA, um produto da peroxidação lipídica, foi determinado seguindo a técnica descrita por Victorino et al. (2013) em um cromatógrafo líquido de alta performance (HPLC-Shimadzu 20AT). As leituras foram feitas a 535 nm, durante 11 minutos de corrida, com vazão de 0,8 mL/minuto, e os resultados foram expressos em nM de MDA.

Análise hematimétrica, leucograma, bioquímica e de gasometria arterial

Para análise de dados hematimétricos, leucograma, resultados bioquímicos e gasometria arterial, foi utilizada uma abordagem de dados obtidos a partir de amostras de sangue colhidas através de punção venosa e arterial, onde os resultados foram analisados a partir do prontuário desses pacientes disponíveis no sistema HU/UEL. As análises hematimétrica, incluindo hemograma e leucograma, foram utilizados para avaliar as possíveis alterações na composição sanguínea dos pacientes e sua relação com as características clínicas e patológicas. Parâmetros bioquímicos auxiliaram na avaliação da função hepática, renal, desequilíbrios eletrolíticos, estado nutricional e inflamatório. A gasometria arterial foi realizada para a avaliação do equilíbrio ácido-base e da função respiratória dos pacientes.

Além disso, foram coletadas informações detalhadas sobre as características demográficas, clínicas e patológicas dos pacientes por meio de análise de prontuários disponíveis no sistema HU/UEL.

Análise estatística

Variáveis contínuas foram apresentadas em números absolutos e porcentagens, e relacionados usando o teste qui-quadrado de Pearson e quando aplicável o teste exato de Fisher performado no SPSS versão 24.0 (SPSS; Chicago, IL, USA). Para as análises dos parâmetros de estresse oxidativo os dados foram analisados usando o GraphPad Prism (version 6; San Diego, CA, USA). Para verificar a normalidade dos dados o teste de Kolmogorov-Smirnov foi aplicado. Para a comparação estatística entre os grupos o t-test de student foi utilizado para dados paramétricos e o teste de Mann-Whitney para os dados não paramétricos. Dados não paramétricos são expressos por medianas. Para todas as análises foi adotado um valor de $p < 0.05$ para ser considerado estatisticamente relevante.

RESULTADOS

Os dados apresentados nas tabelas abaixo foram obtidos a partir de diversos períodos da internação dos pacientes e foram organizados em dois grupos. O grupo A consiste em pacientes que ficaram internados por até 21 dias, totalizando um total de 144 pacientes. Já o grupo B é composto por pacientes que ficaram internados por mais de 21 dias, totalizando 16 pacientes.

As tabelas 1 e 2 apresentam as características demográficas, clínicas e patológicas apresentadas pelos pacientes do estudo. Na tabela 1 demonstra quantidade e porcentagem de pacientes que apresentam determinada comorbidade e se ela se correlaciona com o período de internação, onde apenas a doença renal se apresentou significativamente correlacionada com o período de internação. E na tabela 2, apresenta-se a quantidade de pacientes que tinham determinada comorbidade em cada grupo e se esses pacientes tiveram alta ou vieram a óbito.

Tabela 1. Características demográficas, clínicas e patológicas entre os grupos.

		Grupo A N = 144		Grupo B N = 16		P valor
Idade	Média±SD	56,5±12,7		62,4±14,6		0,085
Sexo	Masculino	85	60,1%	11	76,9%	0,375
	Feminino	59	39,9%	5	23,1%	
Desfecho	Alta	47	32,3%	6	46,2%	0,308
	Óbito	97	67,7%	10	53,8%	
HAS	Sim	75	55,7%	8	46,2%	0,506
	Não	69	44,3%	8	53,8%	
DM	Sim	57	38,0%	4	38,5%	0,972
	Não	97	62,0%	12	61,5%	
Obesidade	Sim	62	37,2%	13	84,6%	0,141
	Não	82	62,8%	3	15,4%	
D.Cardiovascular	Sim	59	37,3%	10	46,2%	0,529
	Não	85	62,7%	6	53,8%	
D.Renal	Sim	11	7,0%	4	30,8%	0,017*
	Não	133	93,0%	12	69,2%	
D.Respiratória	Sim	16	10,1%	0	7,7%	0,621
	Não	128	89,9%	16	92,3%	
Câncer	Sim	3	1,9%	1	0,0%	0,788
	Não	141	98,1%	15	100,0%	
Hipotireoidismo	Sim	12	7,6%	0	46,2%	0,656
	Não	132	92,4%	16	53,8%	
Hipertireoidismo	Sim	1	1,3%	0	0,0%	0,853
	Não	143	98,7%	16	100,0%	
Depressão	Sim	1	1,3%	0	0,0%	0,853
	Não	143	98,7%	16	100,0%	
D. Autoimune	Sim	4	2,5%	0	0,0%	0,727
	Não	140	97,5%	16	100,0%	
Tabagismo	Tabagista	12	8,0%	1	0,0%	0,090
	Ex-Tabagista	21	17,5%	1	7,7%	
	Não	111	74,5%	14	92,3%	

A: Pacientes com até 21 dias de internação; B: Pacientes com mais de 21 dias de internação;

SD: Desvio padrão; HAS: Hipertensão arterial sistêmica; DM: Diabetes Mellitus; D.

Cardiovascular: Doença cardiovascular; D. Renal: Doença renal; D. Respiratória: Doença

respiratória; D. Autoimune: Doença Autoimune; estatisticamente considerado significativo p-

valor <0.05*.

Tabela 2. Distribuição das comorbidades e desfecho em pacientes adultos não vacinados com COVID-19 internados por menos e mais de 21 dias

Comorbidades	Grupo A			Grupo B		
	N	Alta	Óbito	N	Alta	Óbito
HAS	75	13	62	8	4	4
DM	57	15	42	4	1	3
Obesidade	62	18	44	13	6	7
D.Cardiovascular	59	16	43	10	4	6
D.Renal	11	1	10	4	2	2
D. Respiratória	16	9	7	0	0	0
Câncer	3	0	3	1	1	0
Hipotireoidismo	12	3	9	0	0	0
Hipertireoidismo	1	0	1	0	0	0
Depressão	1	1	0	0	0	0
D. Autoimune	4	2	2	0	0	0
Tabagista	12	2	10	1	0	1
Ex-Tabagista	21	11	10	1	0	1

A: Pacientes com até 21 dias de internação; B: Pacientes com mais de 21 dias de internação; HAS: Hipertensão arterial sistêmica; DM: Diabetes Mellitus; D. Cardiovascular: Doença cardiovascular; D. Renal: Doença renal; D. Respiratória: Doença respiratória; D. Autoimune: Doença Autoimune.

A tabela 3 apresenta os dados hematimétricos, nos quais foram observadas diferenças estatísticas significativas entre os dois grupos nos parâmetros de hemácias, hemoglobina, hematócrito e CHCM. Enquanto os níveis de CHCM estão dentro dos valores de referência, os valores de hemácias, hemoglobina e o hematócrito estão abaixo dos níveis de referência, sendo ainda mais baixos no grupo B em comparação ao grupo A. Ambos os grupos apresentam anemia, porém o grupo A exibe um quadro leve, enquanto o grupo B apresenta um quadro anêmico moderado a grave. Ao analisar as

características das hemácias com base no volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), observa-se que esses parâmetros estão dentro dos valores de referência, indicando a normalidade dessas características.

Tabela 3. Comparação da média dos valores hematimétricos entre os grupos A e B de pacientes não vacinados com COVID-19 internados por menos e mais de 21 dias.

	Grupo A N = 144	Erro padrão	Grupo B N = 16	Erro padrão	P valor
Hemácias (4,3 a 5,7 milhões/ μ L)	3,77	0,04	2,81	0,03	< 0,05
Hemoglobina (13,5 a 17,5 g/dL)	11,46	0,18	8,07	0,85	< 0,05
Hematócrito (38 a 50%)	34,16	1,21	24,90	1,01	<0,05
VCM (80 a 100fL)	90,06	2,76	92,12	2,31	0,17
HCM (26 a 34 pg)	29,92	0,18	29,13	0,23	0,66
CHCM (31 a 35 g/dL)	33,14	0,06	32,68	0,23	<0,05
RDW (10 a 16%)	14,54	0,16	15,20	0,51	0,22

A: Pacientes com até 21 dias de internação; B: Pacientes com mais de 21 dias de internação; VCM: Volume corpuscular médio; HCM: Hemoglobina corpuscular média; CHCM: Concentração de hemoglobina corpuscular média; RDW: Red cell Distribution Width; μ L: Microlitro; g/dL: Gramas por decilitro; fL: Fentolitro; pg: Picogramas. Estatisticamente considerado significativo p-valor <0.05.

Os resultados referentes ao leucograma e plaquetograma estão demonstrados na tabela 4. Esses parâmetros não demonstraram diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos, todavia, é possível notar que os níveis de leucócitos totais estão aumentados em ambos os grupos em comparação com os valores de referência, sendo esse aumento mais acentuado no grupo B. Níveis de linfócitos estão um pouco abaixo da normalidade em ambos os grupos.

Tabela 4. Comparação da média dos valores de leucograma e plaquetograma entre os grupos A e B de pacientes não vacinados com COVID-19 internados por menos e mais de 21 dias: Análise de diferenças significativas.

	Grupo A N = 144	Erro padrão	Grupo B N = 16	Erro padrão	P valor
Leucócitos (4000 a 10000 μ L)	12802	1741,7	16409	1814,20	0,0575
Neutrófilos (2000 a 7500 μ L)	7428	102,60	7207	97,40	0,3524
Linfócitos (1000 a 2900 μ L)	841,30	40,35	844,40	94,70	0,6797
Monócitos (200 a 800 μ L)	522,90	0,18	557,50	0,94	0,9616
Plaquetas (150 a 400 mil/ μ L)	257,80	9,38	297,80	21,56	0,4147

A: Pacientes com até 21 dias de internação; B: Pacientes com mais de 21 dias de internação; μ L: Microlitro; mil/ μ L: Mililitro por microlitro. Estatisticamente considerado significativo p-valor <0.05.

Dados relacionados com as provas bioquímicas estão apresentados na tabela 5. Diferenças significativas foram encontradas nos marcadores de função renal ureia e creatinina e também no TAP (Tempo de atividade de protombina). Ambos os grupos apresentam níveis de glicose, PCR (Proteína C Reativa) e dímero D muito acima dos valores de referência, enquanto os níveis de ferro se encontram diminuídos, sendo menor no grupo A.

Tabela 5. Comparação da média dos valores de parâmetros bioquímicos entre os grupos A e B de pacientes não vacinados com COVID-19 internados por menos e mais de 21 dias.

	Grupo A N = 144	Erro padrão	Grupo B N = 16	Erro padrão	P valor
Glicose (60 a 95 mg/dL)	162,60	6,20	164,10	22,64	0,76
Uréia (15-38 mg/dL)	98,94	4,73	124,80	11,07	<0,05
Creatinina (0,80-1,30 mg/dL)	1,89	0,11	3,31	0,45	<0,05
Bilirrubina total (<1,2 mg/dL)	0,56	0,02	0,39	0,03	0,41
Sódio (136 a 145 mEq/L)	137,50	0,56	135,20	1,32	0,17
Potássio (3,50 a 5,10 mEq/L)	4,17	0,06	4,37	0,24	0,33
Magnésio (1,9 a 2,5 mg/ dL)	2,27	0,04	2,17	0,08	0,35
Fósforo (2,5 e 4,5 mg/dL)	4,28	0,19	4,46	0,51	0,75
Cálcio (1,17 a 1,32 mmol/L)	1,08	0,01	1,09	0,03	0,67
Proteína C Reativa (até 3,00 mg/l)	130,10	7,68	140,00	15,00	0,31
Lactato (0,5 a 2,20 mmol/L)	2,17	0,06	1,95	0,18	0,38
Dímero D (500 ng/mL)	1080	137,10	1042	184,60	0,91
Ferro (66 a 175 µg/dL)	24,33	5,01	46,00	10,84	0,12
TAP (10 a 14seg)	13,48	0,19	32,16	6,82	<0,05
TTPA (20 a 40 seg)	34,40	1,30	47,42	3,68	0,29

A: Pacientes com até 21 dias de internação; B: Pacientes com mais de 21 dias de internação; TAP: Tempo de Protrombina; TTPA: Tempo de Tromboplastina Parcialmente Ativada; mg/dL: Miligrama por decilitro; mEq/L: Miliequivalentes por litro; mg/L: Miligramas por litro; mmol/L: Milimol por litro; seg: Segundos; µg/dL: Micrograma por decilitro; estatisticamente considerado significativo p-valor <0.05.

A tabela 6 mostra aos dados referentes à análise da gasometria, no qual não foi observado diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos. A gasometria apresenta leves alterações como aumento na pCO₂ no grupo B, diminuição no pO₂ no grupo A e diminuição na saturação de O₂ em ambos os grupos.

Tabela 6. Comparação da média dos valores de gasometria arterial entre os grupos A e B de pacientes não vacinados com COVID-19 internados por menos e mais de 21 dias.

	Grupo A N = 144	Erro padrão	Grupo B N = 16	Erro padrão	P valor
pH (7,35 a 7,45)	7,35	0,01	7,34	0,03	0,90
pCO ₂ (35 a 45 mmHg)	46,68	1,06	51,63	3,06	0,15
pO ₂ (80 a 110 mmHg)	76,62	2,08	88,88	8,55	0,19
HCO ₃ (23 a 26 mEq/L)	24,96	0,44	26,46	1,07	0,33
CO ₂ Total (22 a 28 mM/L)	26,31	0,45	28,91	1,37	0,14
SAT O ₂ % (95 a 100%)	93,16	0,41	93,00	1,40	0,95

A: Pacientes com até 21 dias de internação; B: Pacientes com mais de 21 dias de internação; mmHg: Milímetros de mercúrio; mEq/L: Miliequivalentes por litro; mM/L: Milimolar por litro; pH: Potencial hidrogeniônico; SAT: Saturação. Estatisticamente considerado significativo p-valor <0.05*.

Os parâmetros oxidativos apresentados na tabela 7 e na figura 1 demonstraram diferenças significativas entre os grupos A e B com relação a GSH, pico máximo alcançado pela curva de lipoperoxidação, velocidade de subida de curva de lipoperoxidação e níveis de MDA, sendo que todos esses parâmetros são maiores no grupo B.

Tabela 7. Comparação da média dos valores de parâmetros de estresse oxidativo entre os grupos A e B de pacientes não vacinados com COVID-19 internados por menos e mais de 21 dias.

	Grupo A N = 144	Erro padrão	Grupo B N = 16	Erro padrão	P valor
Catalase (abs/min*mgPT ⁻¹)	18,37	2,31	29,61	2,80	0,16
SOD (U SOD/gPT)	0,54	0,01	0,49	0,04	0,44
GSH (µM GSH/mgPT)	476,7	23,62	669,70	36,44	<0,05
LOOH (AUC)	60089	3379	70331	4608	0,22
LOOH pico (URL/mgPT)	2679	134,50	3598	228,31	<0,05
LOOH velocidade (URL/mgPT.min ⁻¹)	61,16	6,54	315,6	10,56	<0,05
nM MDA	97,67	5,08	212,4	10,94	<0,05

A: Pacientes com até 21 dias de internação; B: Pacientes com mais de 21 dias de internação; SOD: Superóxido Dismutase; GSH: Glutaciona reduzida; LOOH: Lipoperoxidação; AUC: Area sob a curva; URL/mgPT: Unidade relativa de Luz por miligrama de proteína total; nM MDA: Nanomolar de malondialdeido. Estatisticamente considerado significativo p-valor <0.05*.

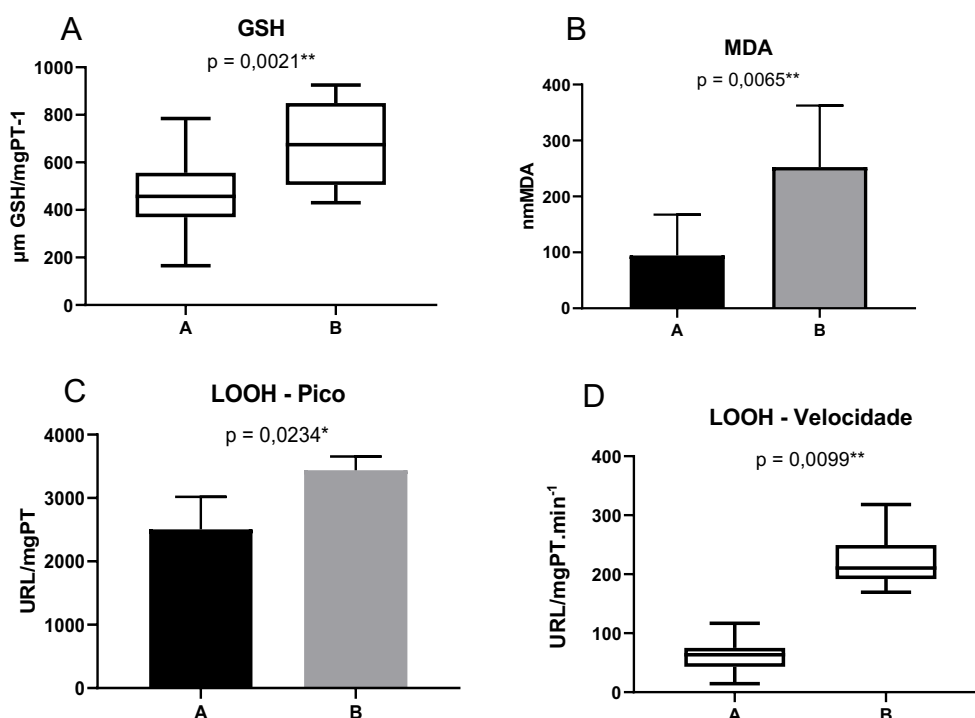


Figura 1: Análise de parâmetros oxidativos; A: Níveis de Glutaciona reduzida; B: Níveis de malondialdeido; C: Pico máximo alcançado pela curva de lipoperoxidação em eritrócitos; D: Velocidade de subida da curva de lipoperoxidação em eritrócitos. Estatisticamente considerado significativo p-valor <0.05*.

Discussão

Nossos resultados evidenciaram que a duração da internação hospitalar está associada a alterações nos parâmetros hematológicos, marcadores de lesão renal e estresse oxidativo. Essas descobertas indicam uma relação direta com o tempo de internação e o curso da doença, sugerindo que a evolução e a condição dos pacientes durante a internação desempenham papel crucial nas manifestações dessas alterações.

A presença de anemia geralmente agrava a gravidade das doenças respiratórias. Estudos documentam uma associação entre doenças respiratórias combinadas com anemia e desfechos desfavoráveis, incluindo aumento da mortalidade (Reade MC, et al., 2010; Doshi SM, et al., 2011). A anemia está relacionada ao distúrbio da homeostase do ferro encontrados em pacientes graves ou críticos (Lanser L, et al., 2021). Em condições infecciosas ou inflamatórias, como a COVID-19, assim como em casos de obesidade e diabetes, ocorre um aumento na transcrição da hepcidina, um importante hormônio envolvido no metabolismo do ferro, principalmente estimulada pela interleucina-6 (Cavezzi A, et al., 2020). Isso resulta na inibição da entrada de ferro no compartimento plasmático a partir de três principais fontes: Absorção dietética no duodeno, liberação do ferro reciclado de macrófagos e liberação de ferro armazenado nos hepatócitos (Camaschella C, et al., 2020). A redução da disponibilidade de ferro para as células compromete sua função metabólica, resultando em hipóxia e má formação de eritrócitos, o que contribui para processos de geração de hemólise (Grygorczyk R, et al., 2017).

Diabetes, hipertensão e obesidade são comorbidades que estão relacionadas com um estado pró-inflamatório e pró-oxidante de baixo grau do organismo (Senoner T, Dichtl W., 2019). Quando associada à infecção por SARS-CoV-2, observa-se um pior prognóstico nesses pacientes (Petrie JR, et al., 2018; Moreno-Fernandez, et al., 2022). Esse fato é corroborado com estudos anteriores, que demonstram em seus estudos que diabetes, hipertensão e

obesidade são as comorbidades mais comuns na morte de pacientes por COVID-19 (Richardson S, et al., 2020; Djaharuddin I, et al., 2021).

Os maiores níveis de ureia e creatinina têm se mostrado marcadores significativos associados à gravidade da infecção, uma vez que seus níveis estão correlacionados com a lesão renal (Van der Slikke EC, et al., 2020) evento comum em pacientes que apresentam longos períodos de internação. Uma metanálise, conduzida por Wang e colaboradores (2020) demonstrou que pacientes com diagnóstico de doença renal tiveram um risco mais elevado de desenvolver a forma grave da COVID-19 (Wang, et al., 2020).

A expressão de ECA2 nos podócitos torna os glomérulos renais um alvo direto da infecção, o que pode levar a lesões renais agudas e disfunção renal. Pacientes com doença renal crônica requerem atenção especial durante a internação, pois apresentam maior risco de complicações cardiovasculares e prognóstico negativo de sobrevivência com SARS (ChuKH, et al., 2005). Nossos resultados sobre a presença de doença renal corroboram com os de Flythe e colaboradores (2021), que em um estudo de coorte retrospectivo utilizando mais de 4200 pacientes internados em UTI dos EUA, demonstraram taxas mais altas de mortalidade entre aqueles que tinham doença renal prévia à infecção (Flythe JE, et al., 2021).

A estrutura dos eritrócitos pode sofrer alterações durante o processo infeccioso devido à produção de ERO. Essas espécies são geradas pelo sistema imunológico em resposta à entrada e replicação do vírus nas vias aéreas, desencadeando a primeira linha de defesa do sistema imunológico inato nos estágios iniciais da infecção. Como já demonstrado, quando ERO estão presentes na corrente sanguínea, elas são capazes de induzir a hemólise de eritrócitos, resultando na liberação de ferro livre (Oliveira YP, et al., 2017). Em pacientes graves, observa-se níveis mais baixos de ferro livre, pois o ferro liberado pela hemólise dos eritrócitos é consumido na reação de Fenton, gerando o radical hidroxila, a ERO mais reativa (Yan F, et al., 2022).

Com relação aos parâmetros de estresse oxidativo, os menores níveis de GSH evidenciados no grupo A, corroborando com estudos anteriores que

demonstraram piores cursos da doença associados com uma depleção do GSH, sendo associado com maiores taxas de mortalidade (Yahaya Muhammad, et al., 2021; Kumar P, et al., 2021; Hosakote YM, et al., 2009). Entretanto, é importante observar que o grupo B, apesar de apresentar maiores níveis de GSH em comparação com o grupo A, também demonstrou níveis mais elevados de lipoperoxidação, tanto em estágios iniciais quanto tardios. Isso indica que, mesmo estando em um estágio mais avançado da infecção e internação, esses aumentos na defesa antioxidante do organismo, como o GSH, são considerados como um mecanismo compensatório diante do aumento do estresse oxidativo (Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C., 2008).

Altos níveis de MDA mostraram prever piores resultados clínicos em pacientes com doenças relacionadas ao estilo de vida, como diabetes, síndrome metabólica e doença cardiovascular (Zhang P, et al., 2020; Skalicky J, et al., 2008; Sasaki K, et al., 2021). Nossos resultados corroboram com um relato anterior de Avila-Nava (2022), que demonstrou níveis elevados de MDA em pacientes com COVID-19. Esses resultados sugerem uma superprodução de radicais livres durante a infecção, o que, por sua vez, pode levar à destruição das membranas lipídicas (Avila-Nava, et al., 2022).

A cascata de eventos gerada após o reconhecimento do vírus pode criar um ciclo de retroalimentação, culminando em uma deterioração do quadro clínico. Essa deterioração, quando combinada com outros fatores presentes nos pacientes, pode evoluir para um caso grave (Meizlish ML, et al., 2021). O reconhecimento do vírus via receptor ECA2 ocorre primordialmente em células do epitélio alveolar e brônquicas, onde esses receptores são altamente expressos. Após a entrada viral serão criadas novas partículas virais, e partir de então o sistema imune atua reconhecendo epítomos via receptores Toll-like 3, 7 e 8 principalmente (Manik M, Singh RK., 2022). Essa interação é capaz de estimular o fator de transcrição NF- κ B e o fator regulador de interferon (IRF) culminando em produção de IFN tipo I, esses processos induzem a expressão de citocinas pró-inflamatórias e espécies reativas de oxigênio (El-Zayat, et al., 2019; Magro G., 2020; Chen Y, Zhou Z, Min W., 2018). A produção de citocinas pró-inflamatórias podem aumentar marcadores do estresse oxidativo via

ativação de neutrófilos, macrófagos e células endoteliais. Matthew e colaboradores (2021) demonstraram que a ativação de neutrófilos e do sistema imune inato precedem o início da doença grave, podendo liberar proteínas com funções antimicrobianas e inflamatórias, contribuindo para danos na vasculatura e pulmões (Meizlish ML, et al., 2021). Essa interação entre citocinas pró-inflamatórias e estresse oxidativo pode levar a danos e falência de diversos órgãos. Esse ciclo se perpetua e aumenta cada vez mais espécies são geradas (Takada, et al., 2003).

Uma vez iniciado esse ciclo, a produção de espécies reativas de oxigênio gerada será maior que a quantidade de antioxidante que as células conseguem conter, ocasionando no estresse oxidativo. Sem a presença de quantidades suficientes de SOD, Catalase e Glutathione, as espécies reativas ficam livres para atuar nas estruturas celulares ocasionando em hemólise, culminando na redução de aporte sanguíneo para os tecidos (Cuadrado A, et al., 2018). De forma crucial para a patogênese da doença, a via NRF2 se encontra suprimida em pacientes com COVID-19, diminuindo as defesas oxidantes e pró-resolução da inflamação desses pacientes (Cuadrado A, et al., 2020).

CONCLUSÃO

Este estudo investigou o tempo de permanência em UTI como determinante no desfecho para [óbito ou alta de pacientes com COVID-19. Nossos resultados indicam que a presença de comorbidades está associada a uma maior taxa de mortalidade. Além disso, pacientes com maior tempo de internação apresentaram níveis mais elevados de Ureia e Creatinina. Os parâmetros hematológicos revelaram que o tempo de internação se correlaciona com os piores casos de anemia. Além disso, observou-se que os parâmetros de estresse oxidativo estão alterados de acordo com o tempo de interção. Essas descobertas destacam a importância da gestão adequada de comorbidades, monitoramento renal e hematológico, além da atenção ao estresse oxidativo em pacientes com COVID-19 internados em UTI

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 1984; 105:121-6. doi: 10.1016/s0076-6879(84)05016-3. PMID: 6727660.

Alam MS, Czajkowsky DM. SARS-CoV-2 infection and oxidative stress: Pathophysiological insight into thrombosis and therapeutic opportunities. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2022 Feb; 63:44-57. doi: 10.1016/j.cytogfr.2021.11.001. Epub 2021 Nov 15. PMID: 34836751; PMCID: PMC8591899.

Ando, M; Shibuya, A; Tsuchiya, K; Akiba, T; Nitta, K (2006). Reduced expression of Toll-like receptor 4 contributes to impaired cytokine response of monocytes in uremic patients., 70(2), 358–362. doi:10.1038/sj.ki.5001548

Araf, Y, et al. Omicron variant of SARS-CoV-2: Genomics, transmissibility, and responses to current COVID-19 vaccines. *Medical Virology* 2021.

Avila-Nava A, Pech-Aguilar AG, Lugo R, Medina-Vera I, Guevara-Cruz M, Gutiérrez-Solis AL. Oxidative Stress Biomarkers and Their Association with Mortality among Patients Infected with SARS-CoV-2 in Mexico. *Oxid Med Cell Longev.* 2022 Jun 17;2022:1058813. doi: 10.1155/2022/1058813. PMID: 35746958; PMCID: PMC9210126.

Brasil, Ministério da Saúde. Banco de dados do Sistema Único de Saúde-DATASUS. Disponível em <http://www.datasus.gov.br> (Acessado em 12 de dezembro de 2022)

Cadet J, Davies KJA, Medeiros MH, Di Mascio P, Wagner JR. Formation and repair of oxidatively generated damage in cellular DNA. *Free Radic Biol Med.* 2017 Jun;107:13-34. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.12.049. Epub 2017 Jan 2. PMID: 28057600; PMCID: PMC5457722.

Cárdenas-Rodríguez N, Bandala C, Vanoye-Carlo A, Ignacio-Mejía I, Gómez-Manzo S, Hernández-Cruz EY, Pedraza-Chaverri J, Carmona-Aparicio L, Hernández-Ochoa B. Use of Antioxidants for the Neuro-Therapeutic

Management of COVID-19. *Antioxidants* (Basel). 2021 Jun 17;10(6):971. doi: 10.3390/antiox10060971. PMID: 34204362; PMCID: PMC8235474.

Carod-Artal FJ. Post-COVID-19 syndrome: epidemiology, diagnostic criteria and pathogenic mechanisms involved. *Rev Neurol* 2021;72 (11):384-396 doi: 10.33588/rn.7211.2021230

Cao, X. COVID-19: immunopathology and its implications for therapy. *Nat Rev Immunol* 20, 269–270 (2020). doi: 10.1038/s41577-020-0308-3.

Camaschella C, Nai A, Silvestri L. Iron metabolism and iron disorders revisited in the hepcidin era. *Haematologica*. 2020 Jan 31;105(2):260-272. doi: 10.3324/haematol.2019.232124. PMID: 31949017; PMCID: PMC7012465.

Cavalcanti LF, Chagas Silva I, do Nascimento THD, de Melo J, Grion CMC, Cecchini AL, Cecchini R. Decreased plasma H₂O₂ levels are associated with the pathogenesis leading to COVID-19 worsening and mortality. *Free Radic Res*. 2022 Nov-Dec;56(11-12):740-748. doi: 10.1080/10715762.2023.2174021. Epub 2023 Feb 1. PMID: 36708322.

Cavezzi A, Troiani E, Corrao S. COVID-19: hemoglobin, iron, and hypoxia beyond inflammation. A narrative review. *Clin Pract*. 2020 May 28;10(2):1271. doi: 10.4081/cp.2020.1271. PMID: 32509258; PMCID: PMC7267810.

Cecchini R., Cecchini AL., SARS-CoV-2 infection pathogenesis is related to oxidative stress as a response to aggression. Elsevier 2020, v 14 outubro de 2020.

Cevik, M., Kuppalli, K., Kindrachuk, J., & Peiris, M. (2020). Virology, transmission, and pathogenesis of SARS-CoV-2. *BMJ*, m3862. doi:10.1136/bmj.m3862

Chen Y, Zhou Z, Min W. Mitochondria, Oxidative Stress and Innate Immunity. *Front Physiol*. 2018 Oct 18;9:1487. doi: 10.3389/fphys.2018.01487. PMID: 30405440; PMCID: PMC6200916.

Cheng Y, Luo R, Wang K, Zhang M, Wang Z, Dong L, Li J, Yao Y, Ge S, Xu G. Kidney disease is associated with in-hospital death of patients with COVID-19. *Kidney Int.* 2020 May;97(5):829-838. doi: 10.1016/j.kint.2020.03.005. Epub 2020 Mar 20. PMID: 32247631; PMCID: PMC7110296.

Chernyak BV, Popova EN, Prikhodko AS, Grebenchikov OA, Zinovkina LA, Zinovkin RA. COVID-19 and Oxidative Stress. *Biochemistry (Mosc.)*. 2020 Dec;85(12):1543-1553. doi: 10.1134/S0006297920120068. PMID: 33705292; PMCID: PMC7768996.

Choi JH, Choi SH, Yun KW. Risk Factors for Severe COVID-19 in Children: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Korean Med Sci.* 2022 Feb 7;37(5):e35. doi: 10.3346/jkms.2022.37.e35. PMID: 35132841; PMCID: PMC8822112.

Chu KH, Tsang WK, Tang CS, Lam MF, Lai FM, To KF, Fung KS, Tang HL, Yan WW, Chan HW, Lai TS, Tong KL, Lai KN. Acute renal impairment in coronavirus-associated severe acute respiratory syndrome. *Kidney Int.* 2005 Feb;67(2):698-705. doi: 10.1111/j.1523-1755.2005.67130.x. PMID: 15673319; PMCID: PMC7112337.

Conselho Nacional de Secretários de Saúde (CONASS) e Conselho Nacional de Secretarias Municipais de Saúde (CONASEMS). COVID-19: Guia orientador para enfrentamento no Brasil. 4. Ed. Brasília: CONASS, CONASEMS, 2021. Disponível em https://www.conasems.org.br/wp-content/uploads/2021/04/Covid-19_guia_orientador_4ed.pdf Acesso em: 28 fev. 2023.

Cuadrado A, Manda G, Hassan A, Alcaraz MJ, Barbas C, Daiber A, Ghezzi P, León R, López MG, Oliva B, Pajares M, Rojo AI, Robledinos-Antón N, Valverde AM, Guney E, Schmidt HHHW. Transcription Factor NRF2 as a Therapeutic Target for Chronic Diseases: A Systems Medicine Approach. *Pharmacol Rev.* 2018 Apr;70(2):348-383. doi: 10.1124/pr.117.014753. PMID: 29507103.

Cuadrado A, Pajares M, Benito C, Jiménez-Villegas J, Escoll M, Fernández-Ginés R, Garcia Yagüe AJ, Lastra D, Manda G, Rojo AI, Dinkova-Kostova AT. Can Activation of NRF2 Be a Strategy against COVID-19? *Trends Pharmacol*

Sci. 2020 Sep;41(9):598-610. doi: 10.1016/j.tips.2020.07.003. Epub 2020 Jul 14. PMID: 32711925; PMCID: PMC7359808.

Damiano S, Sozio C, La Rosa G, Santillo M. NOX-Dependent Signaling Dysregulation in Severe COVID-19: Clues to Effective Treatments. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020 Dec 15;10:608435. doi: 10.3389/fcimb.2020.608435. PMID: 33384971; PMCID: PMC7769936.

Delgado-Roche L, Mesta F. Oxidative Stress as Key Player in Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus (SARS-CoV) Infection. *Arch Med Res.* 2020 Jul;51(5):384-387. doi: 10.1016/j.arcmed.2020.04.019. Epub 2020 Apr 30. PMID: 32402576; PMCID: PMC7190501.

Deponte, M. (2013). Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1830(5), 3217–3266. doi: 10.1016/j.bbagen.2012.09.018

Dessie ZG, Zewotir T. Mortality-related risk factors of COVID-19: a systematic review and meta-analysis of 42 studies and 423,117 patients. *BMC Infect Dis.* 2021 Aug 21;21(1):855. doi: 10.1186/s12879-021-06536-3. PMID: 34418980; PMCID: PMC8380115.

DiNicolantonio JJ, McCarty M. Thrombotic complications of COVID-19 may reflect an upregulation of endothelial tissue factor expression that is contingent on activation of endosomal NADPH oxidase. *Open Heart.* 2020 Jun;7(1):e001337. doi: 10.1136/openhrt-2020-001337. PMID: 32532805; PMCID: PMC7298678.

Dixon AE, Peters U. The effect of obesity on lung function. *Expert Rev Respir Med.* 2018 Sep;12(9):755-767. doi: 10.1080/17476348.2018.1506331. Epub 2018 Aug 14. PMID: 30056777; PMCID: PMC6311385.

Djharuddin I, Munawwarah S, Nurulita A, Ilyas M, Tabri NA, Lihawa N. Comorbidities and mortality in COVID-19 patients. *Gac Sanit.* 2021;35 Suppl 2:S530-S532. doi: 10.1016/j.gaceta.2021.10.085. PMID: 34929892; PMCID: PMC8677356.

Doshi SM, Rueda AM, Corrales-Medina VF, Musher DM. Anemia and community-acquired pneumococcal pneumonia. *Infection*. 2011 Aug;39(4):379-83. doi: 10.1007/s15010-011-0122-8. Epub 2011 May 10. PMID: 21556973.

Dworzański J, Strycharz-Dudziak M, Kliszczewska E, Kielczykowska M, Dworzańska A, Drop B, Polz-Dacewicz M. Glutathione peroxidase (GPx) and superoxide dismutase (SOD) activity in patients with diabetes mellitus type 2 infected with Epstein-Barr virus. *PLoS One*. 2020 Mar 25;15(3):e0230374. doi: 10.1371/journal.pone.0230374. PMID: 32210468; PMCID: PMC7094858.

Ebrahimi M, Norouzi P, Aazami H, Moosavi-Movahedi AA. Review on oxidative stress relation on COVID-19: Biomolecular and bioanalytical approach. *Int J Biol Macromol*. 2021 Oct 31;189:802-818. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.08.095. Epub 2021 Aug 18. PMID: 34418419; PMCID: PMC8372478.

Effenberger-Neidnicht, K., Hartmann, M. Mechanisms of Hemolysis During Sepsis. *Inflammation* 41, 1569–1581 (2018). <https://doi.org/10.1007/s10753-018-0810-y>

Ejaz H, Alsrhani A, Zafar A, Javed H, Junaid K, Abdalla AE, Abosalif KOA, Ahmed Z, Younas S. COVID-19 and comorbidities: Deleterious impact on infected patients. *J Infect Public Health*. 2020 Dec;13(12):1833-1839. doi: 10.1016/j.jiph.2020.07.014. Epub 2020 Aug 4. PMID: 32788073; PMCID: PMC7402107.

El-Zayat, Salwa Refat; Sibaii, Hiba; Mannaa, Fathia A. (2019). Toll-like receptors activation, signaling, and targeting: an overview. *Bulletin of the National Research Centre*, 43(1), 187–. doi:10.1186/s42269-019-0227-2

Fiolet T, Kherabi Y, MacDonald CJ, Ghosn J, Peiffer-Smadja N. Comparing COVID-19 vaccines for their characteristics, efficacy and effectiveness against SARS-CoV-2 and variants of concern: a narrative review. *Clin Microbiol Infect*. 2022 Feb;28(2):202-221. doi: 10.1016/j.cmi.2021.10.005. Epub 2021 Oct 27. PMID: 34715347; PMCID: PMC8548286.

Flythe JE, Assimon MM, Tugman MJ, Chang EH, Gupta S, Shah J, Sosa MA, Renaghan AD, Melamed ML, Wilson FP, Neyra JA, Rashidi A, Boyle SM, Anand S, Christov M, Thomas LF, Edmonston D, Leaf DE; STOP-COVID Investigators. Characteristics and Outcomes of Individuals With Pre-existing Kidney Disease and COVID-19 Admitted to Intensive Care Units in the United States. *Am J Kidney Dis.* 2021 Feb;77(2):190-203.e1. doi: 10.1053/j.ajkd.2020.09.003. Epub 2020 Sep 19. PMID: 32961244; PMCID: PMC7501875.

Forman HJ, Zhang H, Rinna A. Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Mol Aspects Med.* 2009 Feb-Apr;30(1-2):1-12. doi: 10.1016/j.mam.2008.08.006. Epub 2008 Aug 30. PMID: 18796312; PMCID: PMC2696075.

Frisoni P, Neri M, D'Errico S, Alfieri L, Bonuccelli D, Cingolani M, Di Paolo M, Gaudio RM, Lestani M, Marti M, Martelloni M, Moreschi C, Santurro A, Scopetti M, Turriziani O, Zanon M, Scendoni R, Frati P, Fineschi V. Cytokine storm and histopathological findings in 60 cases of COVID-19-related death: from viral load research to immunohistochemical quantification of major players IL-1 β , IL-6, IL-15 and TNF- α . *Forensic Sci Med Pathol.* 2022 Mar;18(1):4-19. doi: 10.1007/s12024-021-00414-9. Epub 2021 Aug 31. Erratum in: *Forensic Sci Med Pathol.* 2021 Dec 15;: PMID: 34463916; PMCID: PMC8406387.

Fu J, Kong J, Wang W, Wu M, Yao L, Wang Z, Jin J, Wu D, Yu X. The clinical implication of dynamic neutrophil to lymphocyte ratio and D-dimer in COVID-19: A retrospective study in Suzhou China. *Thromb Res.* 2020 Aug;192:3-8. doi: 10.1016/j.thromres.2020.05.006. Epub 2020 May 6. PMID: 32407937; PMCID: PMC7201241.

Gain C, Song S, Angtuaco T, Satta S, Kelesidis T. The role of oxidative stress in the pathogenesis of infections with coronaviruses. *Front Microbiol.* 2023 Jan 13;13:1111930. doi: 10.3389/fmicb.2022.1111930. PMID: 36713204; PMCID: PMC9880066.

Gonzalez Flecha B, Llesuy S, Boveris A. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, and

muscle. *Free Radic Biol Med*. 1991;10(2):93-100. doi: 10.1016/0891-5849(91)90002-k. PMID: 1849867

Grygorczyk R, Orlov SN. Effects of Hypoxia on Erythrocyte Membrane Properties-Implications for Intravascular Hemolysis and Purinergic Control of Blood Flow. *Front Physiol*. 2017 Dec 22;8:1110. doi: 10.3389/fphys.2017.01110. PMID: 29312010; PMCID: PMC5744585.

Guimarães TC, Marques BBF, Tinoco JMM, Porto LCMS, Tinoco EMB, Fischer RG. SARS-COV-2 detection in saliva and nasopharyngeal swabs using RT-PCR was similar. *Braz Dent J*. 2022 Mar-Apr;33(2):68-72. doi: 10.1590/0103-6440202204591. PMID: 35508038; PMCID: PMC9645155.

Guloyan V, Oganesian B, Baghdasaryan N, Yeh C, Singh M, Guilford F, Ting YS, Venketaraman V. Glutathione Supplementation as an Adjunctive Therapy in COVID-19. *Antioxidants (Basel)*. 2020 Sep 25;9(10):914. doi: 10.3390/antiox9100914. PMID: 32992775; PMCID: PMC7601802.

Henkel, Ralf. (2010). ROS and sperm DNA integrity – Implications of male accessory gland infections. 10.3109/9781841847474-37.

Hodgson K, Morris J, Bridson T, Govan B, Rush C, Ketheesan N. Immunological mechanisms contributing to the double burden of diabetes and intracellular bacterial infections. *Immunology*. 2015 Feb;144(2):171-85. doi: 10.1111/imm.12394. PMID: 25262977; PMCID: PMC4298412.

Hosakote YM, Liu T, Castro SM, Garofalo RP, Casola A. Respiratory syncytial virus induces oxidative stress by modulating antioxidant enzymes. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2009 Sep;41(3):348-57. doi: 10.1165/rcmb.2008-0330OC. Epub 2009 Jan 16. PMID: 19151318; PMCID: PMC2742754.

Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, Zhang L, Fan G, Xu J, Gu X, Cheng Z, Yu T, Xia J, Wei Y, Wu W, Xie X, Yin W, Li H, Liu M, Xiao Y, Gao H, Guo L, Xie J, Wang G, Jiang R, Gao Z, Jin Q, Wang J, Cao B. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet*. 2020 Feb

15;395(10223):497-506. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30183-5. Epub 2020 Jan 24. Erratum in: *Lancet*. 2020 Jan 30;: PMID: 31986264; PMCID: PMC7159299.

Huber, Paula C.; Almeida, Wanda P.; Fátima, Ângelo de (2008). Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. *Química Nova*, 31(5), 1170–1179. doi:10.1590/S0100-40422008000500046

Jaiswal N, Bhatnagar M, Shah H. N-acetylcysteine: A potential therapeutic agent in COVID-19 infection. *Med Hypotheses*. 2020 Nov;144:110133. doi: 10.1016/j.mehy.2020.110133. Epub 2020 Jul 24. PMID: 32758904; PMCID: PMC7380211.

Jankun J, Landeta P, Pretorius E, Skrzypczak-Jankun E, Lipinski B. Unusual clotting dynamics of plasma supplemented with iron(III). *Int J Mol Med*. 2014 Feb;33(2):367-72. doi: 10.3892/ijmm.2013.1585. Epub 2013 Dec 11. PMID: 24337469.

Jones DP. Radical-free biology of oxidative stress. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2008 Oct;295(4):C849-68. doi: 10.1152/ajpcell.00283.2008. Epub 2008 Aug 6. PMID: 18684987; PMCID: PMC2575825.

Jones, D. P. (2006). Redefining Oxidative Stress. *Antioxidants & Redox Signaling*, 8(9-10), 1865–1879. doi:10.1089/ars.2006.8.1865

Jorge-Aarón RM, Rosa-Ester MP. N-acetylcysteine as a potential treatment for COVID-19. *Future Microbiol*. 2020 Jul;15:959-962. doi: 10.2217/fmb-2020-0074. Epub 2020 Jul 14. PMID: 32662664; PMCID: PMC7359418.

Kardos J, Héja L, Simon Á, Jablonkai I, Kovács R, Jemnitz K. Copper signalling: causes and consequences. *Cell Commun Signal*. 2018 Oct 22;16(1):71. doi: 10.1186/s12964-018-0277-3. Erratum in: *Cell Commun Signal*. 2018 Nov 12;16(1):80. PMID: 30348177; PMCID: PMC6198518.

Kawai T, Autieri MV, Scalia R. Adipose tissue inflammation and metabolic dysfunction in obesity. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2021 Mar 1;320(3):C375-C391.

doi: 10.1152/ajpcell.00379.2020. Epub 2020 Dec 23. PMID: 33356944; PMCID: PMC8294624.

Khanfar A, Al Qaroot B. Could glutathione depletion be the Trojan horse of COVID-19 mortality? *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2020 Dec;24(23):12500-12509. doi: 10.26355/eurrev_202012_24046. PMID: 33336769.

Kreutz R, Algharably EAE, Azizi M, Dobrowolski P, Guzik T, Januszewicz A, Persu A, Prejbisz A, Riemer TG, Wang JG, Burnier M. Hypertension, the renin-angiotensin system, and the risk of lower respiratory tract infections and lung injury: implications for COVID-19. *Cardiovasc Res.* 2020 Aug 1;116(10):1688-1699. doi: 10.1093/cvr/cvaa097.

Kumar P, Osahon O, Vides DB, Hanania N, Minard CG, Sekhar RV. Severe Glutathione Deficiency, Oxidative Stress and Oxidant Damage in Adults Hospitalized with COVID-19: Implications for GlyNAC (Glycine and N-Acetylcysteine) Supplementation. *Antioxidants (Basel).* 2021 Dec 27;11(1):50. doi: 10.3390/antiox11010050. PMID: 35052554; PMCID: PMC8773164.

Laforge M, Elbim C, Frère C, Hémadi M, Massaad C, Nuss P, Benoliel JJ, Becker C. Tissue damage from neutrophil-induced oxidative stress in COVID-19. *Nat Rev Immunol.* 2020 Sep;20(9):515-516. doi: 10.1038/s41577-020-0407-1. Erratum in: *Nat Rev Immunol.* 2020 Aug 10;: PMID: 32728221; PMCID: PMC7388427.

Lage SL, Amaral EP, Hilligan KL, Laidlaw E, Rupert A, Namasivayan S, Rocco J, Galindo F, Kellogg A, Kumar P, Poon R, Wortmann GW, Shannon JP, Hickman HD, Lisco A, Manion M, Sher A, Sereti I. Persistent Oxidative Stress and Inflammasome Activation in CD14^{high}CD16⁻ Monocytes From COVID-19 Patients. *Front Immunol.* 2022 Jan 14; 12:799558. doi: 10.3389/fimmu.2021.799558. PMID: 35095880; PMCID: PMC8795739.

Lanser L, Burkert FR, Bellmann-Weiler R, Schroll A, Wildner S, Fritsche G, Weiss G. Dynamics in Anemia Development and Dysregulation of Iron Homeostasis in Hospitalized Patients with COVID-19. *Metabolites.* 2021 Sep

25;11(10):653. doi: 10.3390/metabo11100653. PMID: 34677368; PMCID: PMC8540370.

Li CH, Chiou HC, Lin MH, Kuo CH, Lin YC, Lin YC, Hung CH, Kuo CH. Immunological map in COVID-19. *J Microbiol Immunol Infect*. 2021 Aug;54(4):547-556. doi: 10.1016/j.jmii.2021.04.006. Epub 2021 May 12. PMID: 34023234; PMCID: PMC8114810.

Li Q, Wang Y, Sun Q, Knopf J, Herrmann M, Lin L, Jiang J, Shao C, Li P, He X, Hua F, Niu Z, Ma C, Zhu Y, Ippolito G, Piacentini M, Estaquier J, Melino S, Weiss FD, Andreano E, Latz E, Schultze JL, Rappuoli R, Mantovani A, Mak TW, Melino G, Shi Y. Immune response in COVID-19: what is next? *Cell Death Differ*. 2022 Jun;29(6):1107-1122. doi: 10.1038/s41418-022-01015-x. Epub 2022 May 17. PMID: 35581387; PMCID: PMC9110941.

Li X, Xu S, Yu M, Wang K, Tao Y, Zhou Y, Shi J, Zhou M, Wu B, Yang Z, Zhang C, Yue J, Zhang Z, Renz H, Liu X, Xie J, Xie M, Zhao J. Risk factors for severity and mortality in adult COVID-19 inpatients in Wuhan. *J Allergy Clin Immunol*. 2020 Jul;146(1):110-118. doi: 10.1016/j.jaci.2020.04.006. Epub 2020 Apr 12. PMID: 32294485; PMCID: PMC7152876.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951 Nov;193(1):265-75. PMID: 14907713.

Lushchak VI. Classification of oxidative stress based on its intensity. *EXCLI J*. 2014 Aug 26;13:922-37. PMID: 26417312; PMCID: PMC4464080.

Ma Z, Ni G, Damania B. Innate Sensing of DNA Virus Genomes. *Annu Rev Virol*. 2018 Sep 29;5(1):341-362. doi: 10.1146/annurev-virology-092917-043244. PMID: 30265633; PMCID: PMC6443256.

Magro G. SARS-CoV-2 and COVID-19: Is interleukin-6 (IL-6) the 'culprit lesion' of ARDS onset? What is there besides Tocilizumab? SGP130Fc. *Cytokine X*. 2020 Jun;2(2):100029. doi: 10.1016/j.cyttox.2020.100029. Epub 2020 May 14. PMID: 32421092; PMCID: PMC7224649.

Manik M, Singh RK. Role of toll-like receptors in modulation of cytokine storm signaling in SARS-CoV-2-induced COVID-19. *J Med Virol*. 2022 Mar;94(3):869-877. doi: 10.1002/jmv.27405. Epub 2021 Oct 26. PMID: 34672376; PMCID: PMC8662021.

Marklund S, Marklund G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem*. 1974 Sep 16;47(3):469-74. doi: 10.1111/j.1432-1033.1974.tb03714.x. PMID: 4215654.

Martinez-Rojas MA, Vega-Vega O, Bobadilla NA. Is the kidney a target of SARS-CoV-2? *Am J Physiol Renal Physiol*. 2020 Jun 1;318(6):F1454-F1462. doi: 10.1152/ajprenal.00160.2020. Epub 2020 May 15. PMID: 32412303; PMCID: PMC7303722.

Mason RJ. Pathogenesis of COVID-19 from a cell biology perspective. *Eur Respir J*. 2020 Apr 16;55(4):2000607. doi: 10.1183/13993003.00607-2020. PMID: 32269085; PMCID: PMC7144260.

McKenna E, Wubben R, Isaza-Correa JM, Melo AM, Mhaonaigh AU, Conlon N, O'Donnell JS, Ní Cheallaigh C, Hurley T, Stevenson NJ, Little MA, Molloy EJ. Neutrophils in COVID-19: Not Innocent Bystanders. *Front Immunol*. 2022 Jun 1;13:864387. doi: 10.3389/fimmu.2022.864387. PMID: 35720378; PMCID: PMC9199383.

Meizlish ML, Pine AB, Bishai JD, Goshua G, Nadelmann ER, Simonov M, Chang CH, Zhang H, Shallow M, Bahel P, Owusu K, Yamamoto Y, Arora T, Atri DS, Patel A, Gbyli R, Kwan J, Won CH, Dela Cruz C, Price C, Koff J, King BA, Rinder HM, Wilson FP, Hwa J, Halene S, Damsky W, van Dijk D, Lee AI, Chun HJ. A neutrophil activation signature predicts critical illness and mortality in COVID-19. *Blood Adv*. 2021 Mar 9;5(5):1164-1177. doi: 10.1182/bloodadvances.2020003568. PMID: 33635335; PMCID: PMC7908851.

Miao L, St Clair DK. Regulation of superoxide dismutase genes: implications in disease. *Free Radic Biol Med*. 2009 Aug 15;47(4):344-56. doi:

10.1016/j.freeradbiomed.2009.05.018. Epub 2009 May 25. PMID: 19477268; PMCID: PMC2731574.

Miller AF. Superoxide dismutases: ancient enzymes and new insights. *FEBS Lett.* 2012 Mar 9;586(5):585-95. doi: 10.1016/j.febslet.2011.10.048. Epub 2011 Nov 10. PMID: 22079668; PMCID: PMC5443681.

Miller, G.L. Protein determination for large numbers of samples. *Analytical Chemistry* 1959, 31, 964-964. doi: 10.1021/ac60149a611.

Moreno-Fernandez J, Ochoa J, Ojeda ML, Nogales F, Carreras O, Díaz-Castro J. Inflammation and oxidative stress, the links between obesity and COVID-19: a narrative review. *J Physiol Biochem.* 2022 Aug;78(3):581-591. doi: 10.1007/s13105-022-00887-4. Epub 2022 Mar 22. PMID: 35316507; PMCID: PMC8938224.

Moussa, Z.; M.A. Judeh, Z.; A. Ahmed, S. Nonenzymatic Exogenous and Endogenous Antioxidants. *Free Radical Medicine and Biology*, 2019.

Muhammad Y, Kani YA, Iliya S, Muhammad JB, Binji A, El-Fulaty Ahmad A, Kabir MB, Umar Bindawa K, Ahmed A. Deficiency of antioxidants and increased oxidative stress in COVID-19 patients: A cross-sectional comparative study in Jigawa, Northwestern Nigeria. *SAGE Open Med.* 2021 Feb 1;9:2050312121991246. doi: 10.1177/2050312121991246. PMID: 33614035; PMCID: PMC7871282.

Musatov, A., & Robinson, N. C. (2012). Susceptibility of mitochondrial electron-transport complexes to oxidative damage. Focus on cytochrome c oxidase. *Free Radical Research*, 46(11), 1313–1326. doi:10.3109/10715762.2012.717273

Nguyen GT, Green ER, Mecsas J. Neutrophils to the ROScue: Mechanisms of NADPH Oxidase Activation and Bacterial Resistance. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017 Aug 25;7:373. doi: 10.3389/fcimb.2017.00373. PMID: 28890882; PMCID: PMC5574878.

Olagnier D, Farahani E, Thyrssted J, Blay-Cadanet J, Herengt A, Idorn M, Hait A, Hernaez B, Knudsen A, Iversen MB, Schilling M, Jørgensen SE, Thomsen M, Reinert LS, Lappe M, Hoang HD, Gilchrist VH, Hansen AL, Ottosen R, Nielsen CG, Møller C, van der Horst D, Peri S, Balachandran S, Huang J, Jakobsen M, Svenningsen EB, Poulsen TB, Bartsch L, Thielke AL, Luo Y, Alain T, Rehwinkel J, Alcamí A, Hiscott J, Mogensen TH, Paludan SR, Holm CK. SARS-CoV2-mediated suppression of NRF2-signaling reveals potent antiviral and anti-inflammatory activity of 4-octyl-itaconate and dimethyl fumarate. *Nat Commun.* 2020 Oct 2;11(1):4938. doi: 10.1038/s41467-020-18764-3. Erratum in: *Nat Commun.* 2020 Oct 21;11(1):5419. PMID: 33009401; PMCID: PMC7532469.

Oliveira YP, Pontes-de-Carvalho LC, Couto RD, Noronha-Dutra AA. Oxidative stress in sepsis. Possible production of free radicals through an erythrocyte-mediated positive feedback mechanism. *Braz J Infect Dis.* 2017 Jan-Feb;21(1):19-26. doi: 10.1016/j.bjid.2016.11.004. Epub 2016 Dec 1. PMID: 27916603; PMCID: PMC9425491.

Park, M., Cook, A. R., Lim, J. T., Sun, Y., & Dickens, B. L. (2020). A Systematic Review of COVID-19 Epidemiology Based on Current Evidence. *Journal of Clinical Medicine*, 9(4), 967. doi:10.3390/jcm9040967

Petrie JR, Guzik TJ, Touyz RM. Diabetes, Hypertension, and Cardiovascular Disease: Clinical Insights and Vascular Mechanisms. *Can J Cardiol.* 2018 May;34(5):575-584. doi: 10.1016/j.cjca.2017.12.005. Epub 2017 Dec 11. PMID: 29459239; PMCID: PMC5953551.

Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C. Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int J Biomed Sci.* 2008 Jun;4(2):89-96. PMID: 23675073; PMCID: PMC3614697.

Polonikov A. Endogenous Deficiency of Glutathione as the Most Likely Cause of Serious Manifestations and Death in COVID-19 Patients. *ACS Infect Dis.* 2020 Jul 10;6(7):1558-1562. doi: 10.1021/acsinfectdis.0c00288. Epub 2020 May 28. PMID: 32463221; PMCID: PMC7263077.

Qin M, Cao Z, Wen J, Yu Q, Liu C, Wang F, Zhang J, Yang F, Li Y, Fishbein G, Yan S, Xu B, Hou Y, Ning Z, Nie K, Jiang N, Liu Z, Wu J, Yu Y, Li H, Zheng H, Li J, Jin W, Pang S, Wang S, Chen J, Gan Z, He Z, Lu Y. An Antioxidant Enzyme Therapeutic for COVID-19. *Adv Mater.* 2020 Oct;32(43):e2004901. doi: 10.1002/adma.202004901. Epub 2020 Sep 13. PMID: 32924219.

Qin Z, Reszka KJ, Fukai T, Weintraub NL. Extracellular superoxide dismutase (ecSOD) in vascular biology: an update on exogenous gene transfer and endogenous regulators of ecSOD. *Transl Res.* 2008 Feb;151(2):68-78. doi: 10.1016/j.trsl.2007.10.003. Epub 2007 Nov 8. PMID: 18201674; PMCID: PMC4230486.

Rajpal, Aman; Rahimi, Leili; Ismailâ-Beigi, Faramarz. Factors Leading to High Morbidity and Mortality of COVID 19 in Patients with Type 2 Diabetes. *Journal of Diabetes*, 2020, doi:10.1111/1753-0407.13085

Reade MC, Weissfeld L, Angus DC, Kellum JA, Milbrandt EB. The prevalence of anemia and its association with 90-day mortality in hospitalized community-acquired pneumonia. *BMC Pulm Med.* 2010 Mar 16;10:15. doi: 10.1186/1471-2466-10-15. PMID: 20233445; PMCID: PMC2848211.

Reuter, S., Gupta, S. C., Chaturvedi, M. M., & Aggarwal, B. B. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked?. *Free radical biology & medicine*, v.49(11), p.1603–1616, 2010.

Richardson S, Hirsch JS, Narasimhan M, Crawford JM, McGinn T, Davidson KW; the Northwell COVID-19 Research Consortium; Barnaby DP, Becker LB, Chelico JD, Cohen SL, Cookingham J, Coppa K, Diefenbach MA, Dominello AJ, Duer-Hefele J, Falzon L, Gitlin J, Hajizadeh N, Harvin TG, Hirschwerk DA, Kim EJ, Kozel ZM, Marrast LM, Mogavero JN, Osorio GA, Qiu M, Zanos TP. Presenting Characteristics, Comorbidities, and Outcomes Among 5700 Patients Hospitalized With COVID-19 in the New York City Area. *JAMA.* 2020 May 26;323(20):2052-2059. doi: 10.1001/jama.2020.6775. Erratum in: *JAMA.* 2020 May 26;323(20):2098. PMID: 32320003; PMCID: PMC7177629.

Rizzo P, Vieceli Dalla Sega F, Fortini F, Marracino L, Rapezzi C, Ferrari R. COVID-19 in the heart and the lungs: could we "Notch" the inflammatory storm? *Basic Res Cardiol*. 2020 Apr 9;115(3):31. doi: 10.1007/s00395-020-0791-5. PMID: 32274570; PMCID: PMC7144545.

Sasaki K, Shoji T, Kabata D, Shintani A, Okute Y, Tsuchikura S, Shimomura N, Tsujimoto Y, Nakatani S, Mori K, Shioi A, Inaba M, Emoto M. Oxidative Stress and Inflammation as Predictors of Mortality and Cardiovascular Events in Hemodialysis Patients: The DREAM Cohort. *J Atheroscler Thromb*. 2021 Mar 1;28(3):249-260. doi: 10.5551/jat.56069. Epub 2020 Aug 1. PMID: 32741893; PMCID: PMC8049144.

Senoner T, Dichtl W. Oxidative Stress in Cardiovascular Diseases: Still a Therapeutic Target? *Nutrients*. 2019 Sep 4;11(9):2090. doi: 10.3390/nu11092090. PMID: 31487802; PMCID: PMC6769522.

Sestili P, Fimognari C. Paracetamol-Induced Glutathione Consumption: Is There a Link With Severe COVID-19 Illness? *Front Pharmacol*. 2020 Oct 7;11:579944. doi: 10.3389/fphar.2020.579944. PMID: 33117175; PMCID: PMC7577213.

Shafqat A, Shafqat S, Salameh SA, Kashir J, Alkattan K, Yaqinuddin A. Mechanistic Insights Into the Immune Pathophysiology of COVID-19; An In-Depth Review. *Front Immunol*. 2022 Mar 24;13:835104. doi: 10.3389/fimmu.2022.835104. PMID: 35401519; PMCID: PMC8989408.

Shade JK, Doshi AN, Sung E, Popescu DM, Minhas AS, Gilotra NA, Aronis KN, Hays AG, Trayanova NA. Real-Time Prediction of Mortality, Cardiac Arrest, and Thromboembolic Complications in Hospitalized Patients With COVID-19. *JACC Adv*. 2022 Jun;1(2):100043. doi: 10.1016/j.jacadv.2022.100043. Epub 2022 May 8. PMID: 35756388; PMCID: PMC9080121.

Shi X, Zhang Y, Zheng J, Pan J. Reactive oxygen species in cancer stem cells. *Antioxid Redox Signal*. 2012 Jun 1;16(11):1215-28. doi: 10.1089/ars.2012.4529. Epub 2012 Mar 9. PMID: 22316005; PMCID: PMC3324813.

Sies, H. (1997). Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology*, 82(2), 291–295. doi:10.1113/expphysiol.1997.sp004024

Sies, H.; Cadenas, E. Oxidative stress: damage to intact cells and organs. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences*, v. 311, n. 1152, p. 617-631, 1985

Skalicky J, Muzakova V, Kandar R, Meloun M, Rousar T, Palicka V. Evaluation of oxidative stress and inflammation in obese adults with metabolic syndrome. *Clin Chem Lab Med*. 2008;46(4):499-505. doi: 10.1515/CCLM.2008.096. PMID: 18298345.

Sodhi, C. P., Wohlford-Lenane, C., Yamaguchi, Y., Prindle, T., Fulton, W. B., Wang, S. & Jia, H. (2018). Attenuation of pulmonary ACE2 activity impairs inactivation of des-Arg9 bradykinin/BKB1R axis and facilitates LPS-induced neutrophil infiltration. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 314(1), L17-L31.

Suhail S, Zajac J, Fossum C, Lowater H, McCracken C, Severson N, Laatsch B, Narkiewicz-Jodko A, Johnson B, Liebau J, Bhattacharyya S, Hati S. Role of Oxidative Stress on SARS-CoV (SARS) and SARS-CoV-2 (COVID-19) Infection: A Review. *Protein J*. 2020 Dec;39(6):644-656. doi: 10.1007/s10930-020-09935-8. Epub 2020 Oct 26. PMID: 33106987; PMCID: PMC7587547.

Su WL, Lin CP, Hang HC, Wu PS, Cheng CF, Chao YC. Desaturation and heme elevation during COVID-19 infection: A potential prognostic factor of heme oxygenase-1. *J Microbiol Immunol Infect*. 2021 Feb;54(1):113-116. doi: 10.1016/j.jmii.2020.10.001. Epub 2020 Oct 16. PMID: 33176981; PMCID: PMC7566820.

Syed-Ahmed, Maaz; Narayanan, Mohanram (2019). Immune Dysfunction and Risk of Infection in Chronic Kidney Disease. *Advances in Chronic Kidney Disease*, 26(1), 8–15. doi:10.1053/j.ackd.2019.01.004

Taheri M, Bahrami A, Habibi P, Nouri F. A Review on the Serum Electrolytes and Trace Elements Role in the Pathophysiology of COVID-19. *Biol Trace Elem Res*.

2021 Jul;199(7):2475-2481. doi: 10.1007/s12011-020-02377-4. Epub 2020 Sep 8. PMID: 32901413; PMCID: PMC7478435.

Takada, Y., Mukhopadhyay, A., Kundu, G. C., Mahabeleshwar, G. H., Singh, S., & Aggarwal, B. B. (2003). Hydrogen Peroxide Activates NF- κ B through Tyrosine Phosphorylation of I κ B α and Serine Phosphorylation of p65. *Journal of Biological Chemistry*, 278(26), 24233–24241. doi:10.1074/jbc.m212389200

Tang XD, Ji TT, Dong JR, Feng H, Chen FQ, Chen X, Zhao HY, Chen DK, Ma WT. Pathogenesis and Treatment of Cytokine Storm Induced by Infectious Diseases. *Int J Mol Sci*. 2021 Nov 30;22(23):13009. doi: 10.3390/ijms222313009. PMID: 34884813; PMCID: PMC8658039.

Tsai PH, Lai WY, Lin YY, Luo YH, Lin YT, Chen HK, Chen YM, Lai YC, Kuo LC, Chen SD, Chang KJ, Liu CH, Chang SC, Wang FD, Yang YP. Clinical manifestation and disease progression in COVID-19 infection. *J Chin Med Assoc*. 2021 Jan 1;84(1):3-8. doi: 10.1097/JCMA.0000000000000463. PMID: 33230062.

Tsermpini EE, Glamočlija U, Ulucan-Karnak F, Redenšek Trampuž S, Dolžan V. Molecular Mechanisms Related to Responses to Oxidative Stress and Antioxidative Therapies in COVID-19: A Systematic Review. *Antioxidants (Basel)*. 2022 Aug 19;11(8):1609. doi: 10.3390/antiox11081609. PMID: 36009328; PMCID: PMC9405444.

Van der Slikke EC, Star BS, de Jager VD, Leferink MBM, Klein LM, Quinten VM, Olgers TJ, Ter Maaten JC, Bouma HR. A high urea-to-creatinine ratio predicts long-term mortality independent of acute kidney injury among patients hospitalized with an infection. *Sci Rep*. 2020 Sep 24;10(1):15649. doi: 10.1038/s41598-020-72815-9. PMID: 32973256; PMCID: PMC7515888.

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.

Victorino VJ, Panis C, Campos FC, Cayres RC, Colado-Simão AN, Oliveira SR, Herrera AC, Cecchini AL, Cecchini R. Decreased oxidant profile and increased antioxidant capacity in naturally postmenopausal women. *Age (Dordr)*. 2013 Aug;35(4):1411-21. doi: 10.1007/s11357-012-9431-9. Epub 2012 May 28. PMID: 22645022; PMCID: PMC3705106.

Violi F, Oliva A, Cangemi R, Ceccarelli G, Pignatelli P, Carnevale R, Cammisotto V, Lichtner M, Alessandri F, De Angelis M, Miele MC, D'Ettorre G, Ruberto F, Venditti M, Pugliese F, Mastroianni CM. Nox2 activation in Covid-19. *Redox Biol*. 2020 Sep;36:101655. doi: 10.1016/j.redox.2020.101655. Epub 2020 Jul 25. PMID: 32738789; PMCID: PMC7381406.

Vorobjeva NV, Chernyak BV. NETosis: Molecular Mechanisms, Role in Physiology and Pathology. *Biochemistry (Mosc)*. 2020 Oct;85(10):1178-1190. doi: 10.1134/S0006297920100065. PMID: 33202203; PMCID: PMC7590568.

Wang B, Luo Q, Zhang W, Yu S, Cheng X, Wang L, Chen X, Chen Y. The Involvement of Chronic Kidney Disease and Acute Kidney Injury in Disease Severity and Mortality in Patients with COVID-19: A Meta-Analysis. *Kidney Blood Press Res*. 2021;46(1):17-30. doi: 10.1159/000512211. Epub 2020 Dec 22. PMID: 33352576; PMCID: PMC7900473.

World Health Organization. Infection prevention and control during health care when novel coronavirus (nCoV) infection is suspected (2020). Available at: [https://www.who.int/publications-detail/infection-prevention-and-control-during-health-care-when-novel-coronavirus-\(ncov\)-infection-is-suspected-20200125](https://www.who.int/publications-detail/infection-prevention-and-control-during-health-care-when-novel-coronavirus-(ncov)-infection-is-suspected-20200125) (Accessed Dezember 10, 2022).

World Health Organization. WHO Coronavirus Disease (COVID-19) Dashboard | WHO Coronavirus Disease (COVID-19) Dashboard (2020). Available at: <https://covid19.who.int/> (Accessed Dezember 10, 2022)

World Health Organization. (2011). Haemoglobin concentrations for the diagnosis of anaemia and assessment of severity. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/85839>

Yan F, Li K, Xing W, Dong M, Yi M, Zhang H. Role of Iron-Related Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction in Cardiovascular Diseases. *Oxid Med Cell Longev*. 2022 Sep 7;2022:5124553. doi: 10.1155/2022/5124553. PMID: 36120592; PMCID: PMC9473912.

Yu W, Rohli KE, Yang S, Jia P. Impact of obesity on COVID-19 patients. *J Diabetes Complications*. 2021 Mar;35(3):107817. doi: 10.1016/j.jdiacomp.2020.107817. Epub 2020 Nov 26. PMID: 33358523; PMCID: PMC7690270

Yuan T, Yang T, Chen H, Fu D, Hu Y, Wang J, Yuan Q, Yu H, Xu W, Xie X. New insights into oxidative stress and inflammation during diabetes mellitus-accelerated atherosclerosis. *Redox Biol*. 2019 Jan;20:247-260. doi: 10.1016/j.redox.2018.09.025. Epub 2018 Oct 19. PMID: 30384259; PMCID: PMC6205410.

Zanella A, Florio G, Antonelli M, Bellani G, Berselli A, Bove T, Cabrini L, Carlesso E, Castelli GP, Cecconi M, Citerio G, Coloretti I, Corti D, Dalla Corte F, De Robertis E, Foti G, Fumagalli R, Girardis M, Giudici R, Guiotto L, Langer T, Mirabella L, Pasero D, Protti A, Ranieri MV, Rona R, Scudeller L, Severgnini P, Spadaro S, Stocchetti N, Viganò M, Pesenti A, Grasselli G; COVID-19 Italian ICU Network. Time course of risk factors associated with mortality of 1260 critically ill patients with COVID-19 admitted to 24 Italian intensive care units. *Intensive Care Med*. 2021 Sep;47(9):995-1008. doi: 10.1007/s00134-021-06495-y. Epub 2021 Aug 9. PMID: 34373952; PMCID: PMC8351771.

Zhang J, Taylor EW, Bennett K, Saad R, Rayman MP. Association between regional selenium status and reported outcome of COVID-19 cases in China. *Am J Clin Nutr*. 2020 Jun 1;111(6):1297-1299. doi: 10.1093/ajcn/nqaa095. PMID: 32342979; PMCID: PMC7197590.

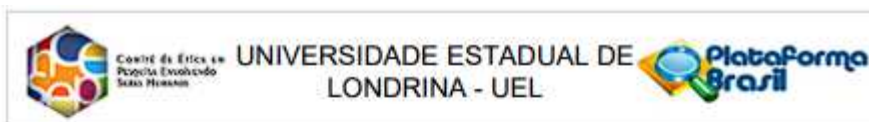
Zhang J, Wu J, Sun X, Xue H, Shao J, Cai W, Jing Y, Yue M, Dong C. Association of hypertension with the severity and fatality of SARS-CoV-2 infection: A meta-analysis. *Epidemiol Infect*. 2020 May 28;148:e106. doi: 10.1017/S095026882000117X. PMID: 32460927; PMCID: PMC7270484.

Zhang P, Li T, Wu X, Nice EC, Huang C, Zhang Y. Oxidative stress and diabetes: antioxidative strategies. *Front Med.* 2020 Oct;14(5):583-600. doi: 10.1007/s11684-019-0729-1. Epub 2020 Apr 4. PMID: 32248333.

Zheng C, Shao W, Chen X, Zhang B, Wang G, Zhang W. Real-world effectiveness of COVID-19 vaccines: a literature review and meta-analysis. *Int J Infect Dis.* 2022 Jan;114:252-260. doi: 10.1016/j.ijid.2021.11.009. Epub 2021 Nov 17. PMID: 34800687; PMCID: PMC8595975.

Zhou Y, Chi J, Lv W, Wang Y. Obesity and diabetes as high-risk factors for severe coronavirus disease 2019 (Covid-19). *Diabetes Metab Res Rev.* 2021 Feb;37(2):e3377. doi: 10.1002/dmrr.3377. Epub 2020 Jul 20. PMID: 32588943; PMCID: PMC7361201.

Zhou, F., Yu, T., Du, R., Fan, G., Liu, Y., Liu, Z., Cao, B. (2020). Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *The Lancet*, 395(10229), 1054–1062. doi:10.1016/s0140-6736(20)30566-3



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Perfil redox e inflamatório sistêmicos, metabolismo do ferro e parâmetros clínicos em pacientes com síndrome do desconforto respiratório agudo associada ou não ao COVID-19 (provável ou confirmada) em tratamento ou não.

Pesquisador: Alessandra Lourenço Cecchini Armani

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 34446720.4.0000.5231

Instituição Proponente: CCB - Departamento de Ciências Patológicas

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.148.409

Apresentação do Projeto:

*O COVID-19 é uma síndrome respiratória causada pela infecção pelo coronavírus 2 da síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV-2) com sinais e sintomas que se assemelham a uma gripe que evolui para uma síndrome respiratória aguda. De início indistinguível, SARS por outras etiologias e COVID-19 podem evoluir para quadros graves, mas que apresentam particularidades. A literatura mostra que o estresse oxidativo desempenha um papel vital em doenças virais, influencia a replicação viral, o metabolismo celular e tem um efeito tóxico nos tecidos do hospedeiro. Um dos mecanismos compensatórios hematopoiéticos da hipóxia provocada pela insuficiência respiratória em pacientes com síndrome respiratória aguda grave de qualquer etiologia, é a diminuição da hepcidina a qual induz a mobilização do ferro para a corrente sanguínea para que seja transportado pela transferrina e seja disponibilizado para a síntese de hemoglobina. Além disso, a ferritina, a proteína envolvida no armazenamento intracelular de ferro e conhecida como proteína de fase aguda, é aumentada no plasma de pacientes com SARS. Durante a infecção viral, o estresse oxidativo inicia transcrição e modula a ativação de mediadores da inflamação como citocinas (fator de necrose tumoral (TNF) e interleucina-1 (IL-1)) que são citocinas pró-oxidantes que geram espécies reativas de oxigênio (ERO) gerando um ciclo vicioso. A resposta imune / inflamatória exacerbada tem sido associada à infecção pelo SARS-CoV-2. Além disso foi descrita uma redução

Endereço: LABESC - Sala 14
Bairro: Campus Universitário
UF: PR **Município:** LONDRINA **CEP:** 86.057-970
Telefone: (43)3371-6455 **E-mail:** cep268@uel.br



Center de Ética em
Pesquisa Evandro
Sérgio Mariani

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
LONDRINA - UEL



Continuação do Parecer: 4.148.409

significativa de células T auxiliares (Th) e Treg, especialmente em pacientes com COVID-19 em estado grave. O fator de transcrição FOXP3 tem papel crucial na regulação do desenvolvimento e na função das células T regulatórias, sendo que alterações na sequência gênica do FOXP3 podem levar à expressão anormal dessa proteína, prejudicando a função das Tregs e predispondo o indivíduo a diversas doenças. Neste projeto, pretende-se investigar o papel do estresse oxidativo, o metabolismo do ferro, perfil de marcadores inflamatórios e a possível presença de polimorfismo em citocina nos pacientes com SARS associado ou não com COVID-19 (confirmados ou não) em diferentes tempos clínicos, internados no Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina, bem como a correlação com o seu estado clínico para o estabelecimento do prognóstico destes pacientes. Serão analisados todos os pacientes internados Hospital Universitário que apresentem síndrome do desconforto respiratório agudo grave sendo por COVID-19 confirmado ou não ou de outra natureza. Pacientes que já estão internados pelo mesmo quadro arrolados ou não em outros ensaios clínicos também poderão ser convidados a participar deste estudo. Após concordarem em participar do estudo, e tendo assinado o termo de consentimento livre e esclarecido, os pacientes poderão participar do presente projeto. O número de pacientes recrutados será por amostra de conveniência até no máximo 300 pacientes. Na oportunidade da coleta de sangue da rotina clínica (rotina solicitada pela equipe médica que acompanha a doença do paciente) serão coletados 3 tubos a mais (EDTA, heparina e soro), com capacidade de aproximadamente 5mL cada, que serão encaminhados ao Laboratório de Patologia Molecular Coordenado pela professora Dra. Alessandra Lourenço Cecchini Armani e ao Laboratório de Genética Molecular e Imunologia coordenado pela professora Doutora Karen Brajão de Oliveira no Departamento de Ciências Patológicas da UEL. Esta coleta será limitada a, no máximo, uma vez ao dia e apenas quando existir a necessidade da equipe médica em realizar exames adicionais no paciente. Não será realizada coleta de sangue exclusiva para o estudo, sem que seja necessária uma coleta de sangue solicitada pela equipe médica para a análise do quadro clínico do paciente. Na primeira coleta para a pesquisa serão coletados 3 tubos (5mL cada), todas as demais serão 2 tubos (5mL cada). Todas as amostras serão analisadas para o perfil oxidativo, inflamatório e do ferro do sujeito em análise. A Profa. Dra. Cintia Magalhaes Carvalho Grion será responsável pela triagem dos pacientes e acompanhamento destes pacientes no HU. O atendimento médico será realizado de acordo com o protocolo da instituição pela equipe profissional local. O projeto também tem como objetivo analisar o prontuário destes pacientes para eventual associação da evolução com comorbidades pré-existentes e para a melhor caracterização do estado geral com o registro dos exames de

Endereço: LABESC - Sala 14

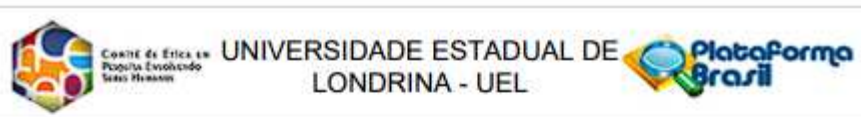
Bairro: Campus Universitário

UF: PR **Município:** LONDRINA

Telefone: (43)3371-5455

CEP: 86.057-970

E-mail: cep268@uel.br



Confirmação do Parecer: 4.148.409

acompanhamento rotineiramente realizados durante a internação. O projeto foi desenhado para se investigar o papel do estresse oxidativo e do metabolismo do ferro bem como o perfil de marcadores inflamatórios nos pacientes com SARS associado ou não com COVID-19 (confirmados ou não) em diferentes tempos clínicos, internados no Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina, bem como a correlação com o seu estado clínico para o estabelecimento do prognóstico destes pacientes. Hipótese: Há alteração no metabolismo do ferro, em citocinas pró-inflamatória e polimorfismo na FOXP3, sendo estes, em conjunto ou isoladamente, responsáveis pelo prognóstico dos pacientes com síndrome respiratória aguda grave relacionada ou não ao SARS-coV-2. Serão realizados os ensaios para caracterização do perfil oxidativo, metabolismo do ferro e perfil inflamatório. O DNA será separado e será realizada a análise do polimorfismo e rs3761548 de FOXP3. Também, informações do prontuário do paciente será utilizada para que correlações, associações e análises sobre a evolução da doença sejam possíveis. Critério de Inclusão: Todos os pacientes que apresentarem SARS por qualquer etiologia e forem internados no Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina. Critério de Exclusão: Aqueles que não forem internados e não apresentarem diagnóstico de SARS.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: Determinar o perfil do redox e inflamatório sistêmicos, metabolismo do ferro, realizar a análise do polimorfismo de FOXP3 e parâmetros clínicos em pacientes com síndrome do desconforto respiratório agudo grave associada ou não ao COVID-19 (provável ou confirmada).

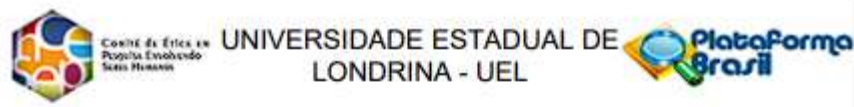
Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo a pesquisadora "os riscos são inerentes a prática de coleta sanguínea que o paciente já terá que ser submetido, sendo estes: hematoma, dor ou vermelhidão no local de retirada. Todos estes já sendo atendidos e amparados pela própria equipe do hospital. Quanto a coleta de dados do paciente do prontuário, os riscos são mínimos, pois serão trados com sigilo e divulgados de forma agrupada sem que seja possível a identificação dos pacientes. Os pesquisadores irão desenvolver a pesquisa de acordo com as normas vigentes com o intuito de minimizar os riscos e estarão à disposição do participante caso seja necessário. Os benefícios não serão imediatos nem diretos, porém serão indiretos quando pudermos compreender melhor a patogênese das doenças respiratórias graves aguda de diversas etiologias e pudermos compará-las.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa é relevante.

Endereço: LABESC - Sala 14
 Bairro: Campus Universitário CEP: 86.057-970
 UF: PR Município: LONDRINA
 Telefone: (43)3371-5455 E-mail: cep268@uel.br



Continuação do Parecer: 4.148.409

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

pesquisadora apresentou folha de rosto assinada pelo vice chefe do Departamento de Ciências Patológicas, autorização da instituição co-participante, cronograma adequado e orçamento detalhado de R\$ 19.917,34, justificando que todos os reagentes e materiais listados já foram adquiridos para a execução de outros projetos em andamento nos laboratórios listados. O TCLE foi apresentado em forma de convite e está adequado. Foi anexado também o termo de confidencialidade e sigilo sob assinatura. Os riscos e benefícios foram elencados adequadamente nas informações básicas e no TCLE. Embora a pesquisadora tenha respondido "NÃO" no item "Haverá retenção de amostras para armazenamento em banco?" nas informações básicas, no TCLE consta: "Após as análises, as amostras serão armazenadas no Laboratório de Genética Molecular e Imunologia e Patologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina para realização de futuras pesquisas (mas o senhor será consultado novamente sobre sua participação nestes estudos futuros)."

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

1. Como haverá retenção de amostras, a pesquisadora deverá anexar a Declaração de Responsabilidade para Biorrepositório (Uso Material Biológico Humano) que se encontra no site: <http://www.uel.br/comites/cepesh/pages/documentos-para-apreciacao-etica.php>

Resposta: A pesquisadora anexou a declaração dos 2 laboratórios citados.

2. Fazer a correção nas informações básicas no item: "Haverá retenção de amostras para armazenamento em banco?" de "NÃO" para "SIM".

Resposta: A pesquisadora fez a correção solicitada nas informações básicas.

Considerações Finais a critério do CEP:

Prezado(a) Pesquisador(a),

Este é seu parecer final de aprovação, vinculado ao Comitê de Ética em Pesquisas Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina. É sua responsabilidade apresenta-Lo aos órgãos e/ou instituições pertinentes.

Ressaltamos, para início da pesquisa, as seguintes atribuições do pesquisador, conforme Resolução CNS 466/2012 e 510/2016:

A responsabilidade do pesquisador é indelegável e indeclinável e compreende os aspectos éticos e legais, cabendo-lhe:

- conduzir o processo de Consentimento e de Assentimento Livre e Esclarecido;
- apresentar dados solicitados pelo sistema CEP/CONEP a qualquer momento;

Endereço: LABESC - Sala 14
 Bairro: Campus Universitário
 UF: PR Município: LONDRINA CEP: 86.057-970
 Telefone: (43)3371-5455 E-mail: cep268@uel.br



Conselho de Ética em
Pesquisa Evoluindo
Sempre Humano

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
LONDRINA - UEL



Continuação do Parecer: 4.148.409

- desenvolver o projeto conforme delineado, justificando, quando ocorridas, a sua mudança ou interrupção;
- elaborar e apresentar os relatórios parciais e final;
- manter os dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda e responsabilidade, por um período mínimo de 5 (cinco) anos após o término da pesquisa;
- encaminhar os resultados da pesquisa para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores e pessoal técnico integrante do projeto;
- justificar fundamentadamente, perante o sistema CEP/CONEP, interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Coordenação CEP/UEL

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1564978.pdf	08/07/2020 16:38:17		Aceito
Outros	CartaRespostaCEP.pdf	08/07/2020 16:37:53	Alessandra Lourenço Cecchini Armani	Aceito
Declaração de Pesquisadores	declaBioKaren.pdf	08/07/2020 16:32:18	Alessandra Lourenço Cecchini Armani	Aceito
Declaração de Pesquisadores	declaBioAle.pdf	08/07/2020 16:32:07	Alessandra Lourenço Cecchini Armani	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Brochura.pdf	01/07/2020 19:02:23	Alessandra Lourenço Cecchini Armani	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_PACIENTES.pdf	01/07/2020 18:57:10	Alessandra Lourenço Cecchini Armani	Aceito
Orçamento	ORCAMENTO.pdf	01/07/2020 18:56:22	Alessandra Lourenço Cecchini Armani	Aceito
Brochura Pesquisa	PROJETOFINAL.pdf	01/07/2020 18:54:35	Alessandra Lourenço Cecchini Armani	Aceito

Endereço: LABESC - Sala 14

Bairro: Campus Universitário

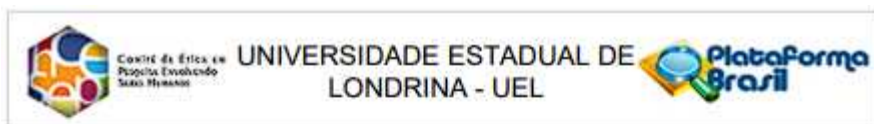
UF: PR

Município: LONDRINA

Telefone: (43)3371-5455

CEP: 86.057-970

E-mail: cep268@uel.br



Continuação do Parecer: 4.148.409

Declaração de Instituição e Infraestrutura	ParecerHU.pdf	01/07/2020 18:43:19	Alessandra Lourenço Cecchini Armani	Aceito
Cronograma	Cronograma.pdf	01/07/2020 18:40:36	Alessandra Lourenço Cecchini Armani	Aceito
Outros	Termo_Sigilo_confidencialidade.pdf	16/06/2020 14:29:23	Alessandra Lourenço Cecchini Armani	Aceito
Folha de Rosto	FolhadeRostoA.pdf	16/06/2020 10:44:19	Alessandra Lourenço Cecchini Armani	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

LONDRINA, 10 de Julho de 2020

Assinado por:
Adriana Lourenço Soares Russo
(Coordenador(a))

Endereço: LABESC - Sala 14
 Bairro: Campus Universitário
 UF: PR Município: LONDRINA CEP: 86.057-970
 Telefone: (43)3371-5455 E-mail: cep268@uel.br