

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:  
FISIOLOGIA

Mariana Kras Borges Russo

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA AO CHOQUE TÉRMICO (HSR) E DANO  
OXIDATIVO EM PACIENTES DIABÉTICOS INFECTADOS POR SARS-COV-2**

Porto Alegre

2023

Mariana Kras Borges Russo

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA AO CHOQUE TÉRMICO (HSR) E DANO  
OXIDATIVO EM PACIENTES DIABÉTICOS INFECTADOS POR SARS-COV-2**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de mestre(a) em Fisiologia.

Orientador(a): Dr. Maurício da Silva Krause

Porto Alegre

2023

### CIP - Catalogação na Publicação

Russo, Mariana Kras Borges  
Avaliação da resposta ao choque térmico (HSR) e dano oxidativo em pacientes diabéticos infectados por SARS-COV-2 / Mariana Kras Borges Russo. -- 2023.  
70 f.  
Orientador: Maurício da Silva Krause.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, Porto Alegre, BR-RS, 2023.

1. SARS-CoV-2. 2. Diabetes Mellitus 2. 3. HSP72. 4. Inflamação. 5. Resposta ao choque térmico. I. Krause, Maurício da Silva, orient. II. Título.

Mariana Kras Borges Russo

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA AO CHOQUE TÉRMICO (HSR) E DANO  
OXIDATIVO EM PACIENTES DIABÉTICOS INFECTADOS POR SARS-COV-2**

Dissertação de Mestrado apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título  
de mestre(a) em Fisiologia.

Aprovado em: 25 de Maio de 2023.

**BANCA EXAMINADORA**

Alexandre Luz de Castro – UFRGS

Nome do professor - instituição

Fábio Klamt – UFRGS

Nome do professor - instituição

Alessandra Peres - UFCSPA

Nome do professor - instituição (orientador)

## AGRADECIMENTO

Gostaria de agradecer a todos que compartilharam comigo todas as dificuldades e alegrias dessa trajetória. Primeiramente gostaria de salientar a importância da minha família nesse caminho, minha mãe (Marilu), irmã (Luisa) e namorado (Leonardo). Ter o seu apoio durante essa tomada de decisões foi de extrema importância para mim. Obrigada por entenderem meus momentos de ausência forçada para que pudesse cumprir os meus objetivos, por me ajudarem a enfrentar os momentos de ansiedade e nervosismo, e por acreditarem em mim. Eu amo muito vocês família!

Agradeço ao meu orientador prof. Maurício Krause por abrir as portas do laboratório (mesmo sem me conhecer) e me oportunizar conhecer e dividir a bancada com pessoas tão maravilhosas quanto a Helena e a Layane. Meninas, obrigada por me permitirem fazer parte da vida de vocês, por me escutarem e aconselharem nos momentos difíceis. Vocês duas sem sombra de dúvidas são os meus maiores presentes do mestrado. Fizeram os momentos difíceis se tornarem mais fáceis. Vocês acreditaram em mim quando eu mesma duvidei da minha capacidade. Heleninha, você é uma pessoa incrível, me ensinou desde o “básico” teste da resposta ao choque térmico, ao famoso western blot, sempre com muita paciência e carinho. Lay, você sempre positiva, com ótimos conselhos e uma playlist incrível de pagode, fazendo nos nossos dias na bancada mais alegres. Gurias, obrigada por cada café compartilhado, cada risada e cada abraço. Eu amo muito vocês!

Meus amigos de longa data, Andresa, Bruna, Cynthia, Jaqueline e Lucas. Vocês estão comigo a muitos anos, compartilhamos ao longo da nossa amizade muitas vitórias e agora não seria diferente. Obrigada por estarem comigo na boa e na ruim. Obrigada pelas noites de conversa e boas risadas. Eu sou eternamente grata por tê-los na minha vida. Amo muito vocês! Não posso deixar de agradecer especialmente ao Lucas, por encontrar o PPG Fisiologia e insistir para que eu me inscrevesse no mestrado. Amigo, obrigada por dividir comigo cada momento de luta e glória, mesmo que a distância. Você é uma joia-rara, uma pessoa com coração incrível que me apoiou desde o primeiro segundo, que mesmo com todas as dificuldades ficou feliz pelas minhas conquistas. Obrigada por toda essa jornada! Te amo!

Em resumo, esses agradecimentos são para as pessoas que fizeram a diferença durante esses dois anos, que fizeram deles mais leves e iluminados. Eu amo todos vocês!

## RESUMO

**Introdução:** A pandemia de COVID-19, causada pelo betacoronavírus SARS-CoV-2, em 2019 resultou na morte de 6.886.489 pessoas pelo mundo. Os casos mais graves da doença se desenvolvem pela resposta inflamatória exagerada conhecida como *cytokine storm*. Entre os fatores de risco associado à maior necessidade hospitalização e morbidade da doença se destacam condições crônicas como a hipertensão, diabetes e doenças cardiovasculares. A possível relação entre a COVID-19 e o diabetes está no estado inflamatório crônico de baixo grau presente neste distúrbio metabólico. As proteínas de choque térmico (*Heat Shock Protein* - HSP) são os produtos finais de uma resposta altamente conservada entre as espécies, a resposta ao choque térmico (*Heat Shock Response* – HSR), um importante mecanismo envolvido na proteostase e nos processos anti-inflamatórios. Estudos anteriores de nosso laboratório já demonstraram que a HSR encontra-se reduzida em indivíduos diabéticos, levando a uma piora na resposta de resolução da inflamação e, conseqüentemente a níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias e ao dano oxidativo. Desta forma, o estudo possui como objetivos: (a) medir a concentração de HSP72 extracelular (eHSP72) em pacientes com COVID-19 grave, e comparar com pacientes não-infectados, (b) comparar a resposta ao choque térmico (HSR) entre os pacientes críticos infectados pelo SARS-CoV-2 com e sem diabetes e, (c) comparar a HSR dos pacientes com COVID-19 grave e pacientes não infectados. **Métodos:** Para o presente estudo foram selecionados 60 adultos, de ambos os sexos, gravemente enfermos com insuficiência respiratória aguda, diagnosticados com SARS-CoV-2, internados na Unidade de Terapia Intensiva (UTI) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Foram incluídos dois grupos com indivíduos não-infectados de projetos anteriores para a comparação (saudáveis, n = 19 e pacientes com diabetes, n = 22). Utilizamos amostras de sangue periférico para medir o metabolismo (glicose e HbA1C), estresse oxidativo (lipoperoxidação e carbonilas), eHSP72 e a HSR (*in vitro*). **Resultados:** Os pacientes com COVID-19 grave apresentaram nível de eHSP72 plasmática mais alto em comparação com indivíduos saudáveis e pacientes não-infectados. Os indivíduos com COVID-19 em estado grave apresentaram uma HSR reduzida, além de aumento na peroxidação lipídica e carbonilas. **Conclusões:** Nossos resultados demonstraram que os pacientes com COVID-19 grave possuem eHSP72 elevada e uma HSR reduzida, independentemente da presença de diabetes. Esses resultados auxiliam a explicar a razão da inflamação descontrolada (tempestade de citocinas) presente nesses pacientes e fornece informações sobre o aumento do risco de desenvolvimento de Diabetes Mellitus Tipo 2 após a infecção por SARS-CoV-2.

Palavras-chave: SARS-CoV-2. Diabetes Mellitus Tipo 2. HSP72. Inflamação, Resposta ao Choque térmico.

## ABSTRACT

Introduction: The COVID-19 pandemic, caused by the betacoronavirus SARS-CoV-2, in 2019 led to the death of 6.886.489 people around the world. The most severe cases of the disease develop due to an exaggerated inflammatory response known as a cytokine storm. Among the risk factors associated with greater need for hospitalization and disease morbidity, chronic conditions such as hypertension, diabetes and cardiovascular disease stand out. The possible relationship between COVID-19 and diabetes lies in the chronic low-grade inflammatory state present in this metabolic disorder. Heat Shock Protein (HSP) are the end products of a highly conserved response across species, the Heat Shock Response (HSR), an important mechanism involved in proteostasis and anti-inflammatory processes. . Previous studies from our laboratory have already shown that HSR is reduced in diabetic individuals, leading to a worsening of the inflammation resolution response and, consequently, to elevated levels of pro-inflammatory cytokines and oxidative damage. Thus, the study aims to: (a) measure the concentration of extracellular HSP72 (eHSP72) in patients with severe COVID-19, and compare with uninfected patients, (b) compare the response to heat shock (HSR) between critically ill patients infected with SARS-CoV-2 with and without diabetes, and (c) compare the HSR of patients with severe COVID-19 and uninfected patients. Methods: For the present study, 60 adults of both sexes, seriously ill with acute respiratory failure, admitted to the Intensive Care Unit (ICU) of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre were selected. Two groups of uninfected individuals from previous projects were included for comparison (healthy, n = 19 and patients with diabetes, n = 22). We used peripheral blood samples to measure metabolism (glucose and HbA1C), oxidative stress (lipoperoxidation and carbonyls), eHSP72 and HSR (in vitro). Results: Severe COVID-19 patients had higher plasma eHSP72 levels compared to healthy subjects and uninfected patients. Individuals with severe COVID-19 had a reduced HSR, in addition to an increase in lipid peroxidation and carbonyls. Conclusions: Our results are sad that patients with severe COVID-19 have elevated eHSP72 and a reduced HSR, regardless of the presence of diabetes. These results help to explain the reason for the uncontrolled inflammation (cytokine storm) present in these patients and provide information about the increased risk of developing Type 2 Diabetes Mellitus after a SARS-CoV-2 infection.

Keywords: SARS-CoV-2. Type 2 Diabetes Mellitus. HSP72. Inflammation, Heat Shock Response.



## LISTA DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| Figura 1 – Possíveis cenários para a origem do SARS-CoV-2 .....   | 16 |
| Figura 2 – Resposta ao choque térmico no estado saudável e no estado resistente à insulina.....   | 26 |
| Figura 3 – Comparação plasmática de eHSP72 entre pacientes críticos com COVID-19 com e sem diabetes .....   | 34 |
| Figura 4 – Comparação da concentração plasmática de eHSP72 entre pacientes críticos com COVID-19, indivíduos saudáveis não infectados e pacientes não infectados com diabete.....                                       | 35 |
| Figura 5 – Comparação da resposta ao choque térmico entre pacientes críticos infectados com COVID-19 com e sem diabetes, indivíduos saudáveis não infectados com COVID-19 e diabéticos não infectados com COVID-19..... | 36 |
| Figura 6 – Comparação de dano lipídico entre pacientes críticos com COVID-19 com e sem diabetes, e indivíduos não infectados por COVID-19.....  | 37 |
| Figura 7 – Comparação de dano a proteínas entre pacientes críticos com COVID-19 com e sem diabetes, e indivíduos não infectados por COVID-19.....   | 38 |
| Figura 8 – Possível papel da eHSP72 elevada e HSR mais baixo na infecção por SARS-CoV-2 e diabetes: uma hipótese integrativa.....   | 41 |

## **LISTA DE TABELAS**

|  |    |
|--|----|
| Tabela 1 – Características dos sujeitos..... | 32 |
| Tabela 2 – Características dos sujeitos..... | 33 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACE-2: Enzima Conversora de Angiotensina-2

Alpha-CoV: Alphacoronavírus

AngII: Angiotensina II

Beta-CoV: Betacoronavírus

COVID-19: Doença do coronavírus

DCs: Células dendríticas

Delta-CoV: Deltacoronavírus

DM2: Diabetes Mellitus Tipo 2

DNA: Desoxirribonucleicos

eHSP70: Proteína de choque térmico 70 extracelular (*Heat Shock Protein 70 extracellular*)

ERNs: Espécies Reativas de Nitrogênio

EROS: Espécies Reativas de Oxigênio

Gama-CoV: Gammacoronavírus

GLUT 4: Transportador de glicose 4

GSK-3 $\beta$ : Glicogênio sintase quinase-3 $\beta$

HbA1C: Hemoglobina glicada

HCPA: Hospital de Clínicas de Porto Alegre

HSF1: Fator de choque térmico 1 (*Heat Shock Factor 1*)

HSP70: Proteína de choque térmico 70 (*Heat Shock Protein 70*)

HSP72: Proteína de choque térmico 72 (*Heat Shock Protein 72*)

HSP73: Proteína de choque térmico 73 (*Heat Shock Protein 73*)

HSR: Resposta ao choque térmico (*Heat Shock Response*)

iHSP70: Proteína de choque térmico 70 intracelular (*Heat Shock Protein 70 intracellular*)

IL-1: Interleucina 1

IL-1 $\beta$ : Interleucina 1 $\beta$

IL-6: Interleucina 6

IRS: Receptor de insulina

IRS-1: Receptor de insulina da proteína de transdução de sinal

JNK: c-Jun N-terminal cinase

NF- $\kappa$ B: Fator Nuclear  $\kappa$ B

NK: Células *Natural Killers*

NO: Óxido nítrico

OMS: Organização Mundial da Saúde

OxPL: Fosfolipídios oxidados

RBD: Domínio de ligação ao receptor

RE: Retículo endoplasmático

SARS: Síndrome Respiratória Aguda Grave

SARS-CoV: Vírus responsável pela Síndrome Respiratória Aguda Grave

SARS-CoV-2: Vírus responsável pela Síndrome Respiratória Aguda Grave Coronavírus 2

SDRA: Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo

SIRT1: Sirtuina 1

TLR: Receptor Toll-Like

TLR2: Receptor Toll-Like 2

TLR4: Receptor Toll-Like 4

TNF- $\alpha$ : Fator de Necrose Tumoral  $\alpha$

UPR: Proteína desdobrada/mal dobradas

UTI: Unidade de Terapia Intensiva

VM: Ventilação mecânica

## SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO .....   | 14 |
| 2. JUSTIFICATIVA.....   | 27 |
| 3. HIPÓTESE .....   | 27 |
| 3.1. Hipótese nula .....  | 27 |
| 3.2. Hipótese alternativa .....   | 27 |
| 4. OBJETIVO .....   | 27 |
| 4.1. Objetivo Geral .....   | 27 |
| 4.2. Objetivo Específico.....   | 27 |
| 5. MATERIAIS E MÉTODOS .....  | 28 |
| 5.1. Seleção da amostra.....  | 28 |
| 5.2. Procedimentos e coleta de sangue .....   | 28 |
| 5.3. Cálculo amostral .....   | 29 |
| 5.4. Teste de resposta ao choque térmico .....  | 29 |
| 5.5. Quantificação de hsp72 extracelular .....  | 30 |
| 5.6. Avaliação da peroxidação lipídica.....   | 30 |
| 5.7. Quantificação do dano a proteínas.....   | 30 |
| 5.8. Quantificação de proteínas plasmática.....   | 31 |
| 5.9. Análise estatística .....  | 31 |
| 5.10. Aspectos éticos .....   | 32 |
| 6. RESULTADOS.....  | 32 |
| 6.1. Características dos pacientes .....  | 32 |
| 6.2. Caracterização dos grupos.....   | 33 |
| 6.3. Concentração plasmática de hsp 72 extracelular em paciente em estado grave com covid-19..... | 34 |
| 6.4. Comparação plasmática de hsp72 entre diferentes grupos .....                                 | 35 |
| 6.5. Comparação da resposta ao choque térmico .....   | 36 |
| 6.6. Dano oxidativo .....   | 37 |
| 7. DISCUSSÃO .....  | 38 |
| 8. CONCLUSÃO .....  | 43 |
| <u>REFERÊNCIAS</u> .....  | 43 |

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. VISÃO GERAL DA COVID-19

Ao final do ano de 2019 ocorreu um surto de pneumonia de origem desconhecida em Wuhan (China). Posteriormente, no início de 2020, descobriu-se por meio de RT-PCR e filogenia que o patógeno responsável se tratava de um Betacoronavírus com estrutura de domínio de ligação ao receptor semelhante à do SARS-CoV (responsável pela Síndrome Respiratória Aguda Grave – SARS) (BARTLETT, 2004; GRASSELLI *et al.*, 2020; LU *et al.*, 2020), sendo nomeado como Síndrome Respiratória Aguda Grave Coronavírus 2 (SARS-CoV-2 ou 2019-nCoV) pela Organização Mundial da Saúde (OMS), causando a doença do coronavírus (COVID-19) (ZHENG *et al.*, 2020). O novo coronavírus se espalhou por aproximadamente 200 países e territórios levando a OMS a decretar estado de pandemia (YUKI; FUJIOGI; KOUTSOGIANNAKI, 2020)

A COVID-19 é transmitida por meio de gotículas respiratórias e contato direto, apresentando alta capacidade de transmissão e amplo espectro de manifestações clínicas como ocorrências assintomáticas, febre, tosse, pneumonia viral grave com insuficiência respiratória e morte. Dentro as complicações mais frequentes estão a sepse, síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA), insuficiência cardíaca, choque séptico e falência múltipla de órgãos. Assim, entre os fatores de risco associados à maior probabilidade de hospitalização e mortalidade da doença estão à idade avançada e presença de condições crônicas (hipertensão, diabetes, doenças cardiovasculares, ect.) (GUAN *et al.*, 2020; HUANG *et al.*, 2020; LU *et al.*, 2020; ZHOU, F. *et al.*, 2020).

Até o dia 26 de março de 2023, mundialmente 761.321.408 pessoas foram infectadas com a COVID-19, sendo que destas 6.886.489 pessoas vieram a óbito em decorrência da doença (WHO ET AL, 2021). No Brasil em específico, foram diagnosticados 37.319.254 casos e 700.556 óbitos desde o começo da pandemia, os quais são distribuídos desigualmente entre suas regiões, de forma que a região Sudeste apresenta maior número de casos (14.855.889), seguida da região Sul (7.928.381), Nordeste (7.7336.349), Centro-Oeste (4.305.185) e Norte (2.893.450). Entretanto, quando comparado o número de mortes devido à COVID-19 há alteração do *ranking* por regiões, ficando: Sudeste (337.243), Nordeste (134.846), Sul (110.800), Centro-Oeste (66.073) e Norte (51.594) (SAÚDE, [s. d.]).

### 1.1.1. Teorias de origem

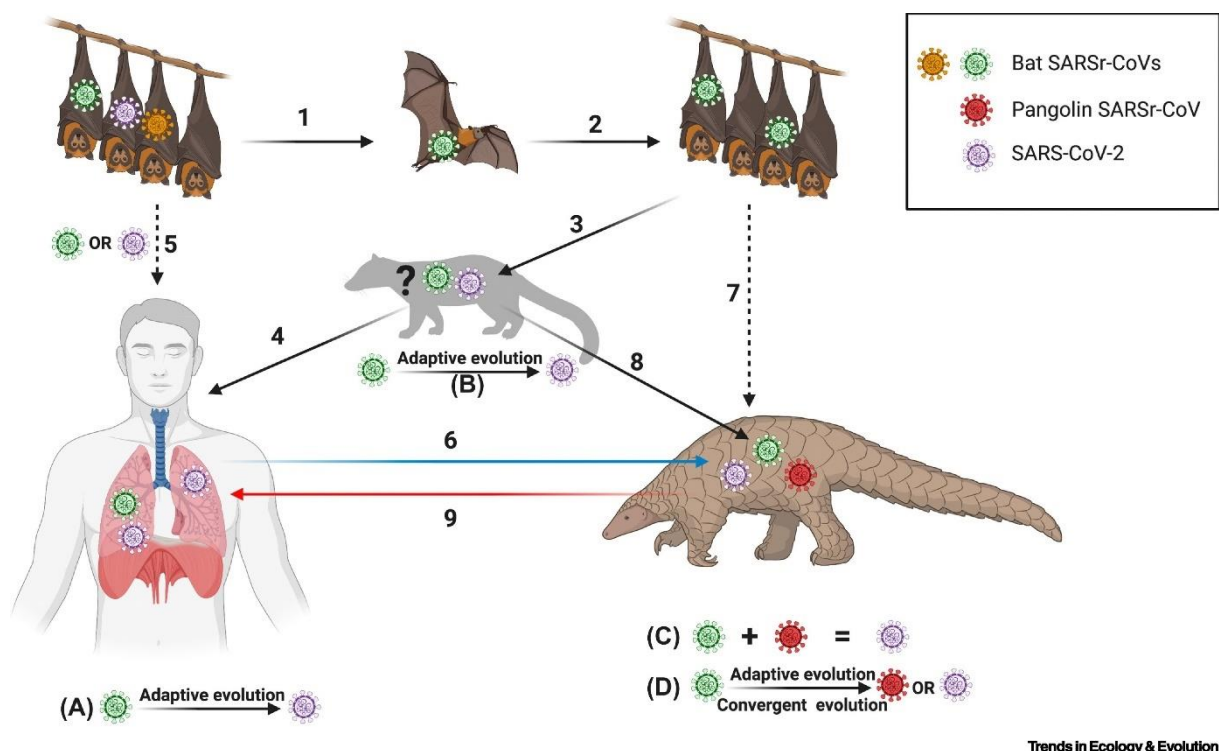
Os coronavírus são vírus encontrados em diversas espécies de animais e podem ou não causar doenças em seus hospedeiros. Eles são divididos em quatro gêneros distintos dependendo de sua caracterização genética e sorológica, sendo eles: *Alphacoronavirus* (alpha-CoV), *Betacoronavirus* (beta-CoV), *Gammacoronavirus* (gama-CoV) e *Deltacoronavirus* (delta-CoV) (DE GROOT RJ, BAKER SC, BARIC R, ENJUANES L, GORBALENYA AE, HOLMES KV, PERLMAN S, POON L, ROTTIER PJM, TALBOT PJ, WOO PCY, 2011). Dentre esses gêneros, os mais comuns em mamíferos são o alpha-CoV e o beta-CoV (WERTHEIM *et al.*, 2013). Outra característica importante dos coronavírus é a sua alta taxa de recombinação. A recombinação pode ocorrer quando animais que abrigam diferentes coronavírus entram em contato próximo ou trocam vírus, podendo haver a recombinação em diversas cepas, levando a diferenciação (SINGH; YI, 2021). Em decorrência da alta recombinação do coronavírus, inicialmente foram levantadas algumas teorias de possíveis origens do betacoronavírus SARS-CoV-2. Como demonstrado por ANDERSEN *et al.* (2020) não há nenhum sinal de manipulação genética humana, uma vez que as características do vírus demonstram que o mesmo não é derivado de nenhum backbone de vírus usado anteriormente. Entretanto, a origem e a via de transmissão zoonótica do vírus permanecem no campo da especulação (BANERJEE *et al.*, 2021).

No início de 2021 pesquisadores na China isolaram e sequenciaram o genoma do SARS-CoV-2 permitindo a sua comparação com outras sequências de coronavírus. Durante essas comparações pode ser visto que 96% do genoma do novo coronavírus é idêntico ao genoma do coronavírus de morcego (WU *et al.*, 2020; ZHOU, P. *et al.*, 2020). Essa alta compatibilidade entre os genomas indicam a fonte evolutiva da COVID-19, ou seja, o coronavírus de morcegos pode ser um clado que evoluiu de forma independente de um ancestral comum com o SARS-CoV-2 entre os anos de 1948 e 1982 (BONI *et al.*, 2020). Entretanto, ainda não se sabe qual a rota de transmissão da COVID-19, se a mesma ocorreu de morcegos para humanos de forma direta ou por meio de uma espécie animal intermediária (BANERJEE *et al.*, 2021).

Em uma das hipóteses levantadas o SARS-CoV-2 apresentaria como hospedeiro reservatório os morcegos e como hospedeiro intermediário pangolins malaios (*Manis javanica*). O pangolin (mamíferos da ordem *Pholidota*) é uma das espécies de mamíferos mais traficada ilegalmente, sendo suas escamas são usadas na medicina tradicional chinesa e sua carne como fonte de alimento. Em amostras de pangolins coletadas entre 2017 e 2019 por meio de operações anti-contrabando no sul da China e em um centro de resgate da vida selvagem foram

identificadas duas sublinhagens de coronavírus relacionadas ao SARS-CoV-2 (LAM *et al.*, 2020; XIAO *et al.*, 2020).

Outro fator interessante que corrobora com a teoria dos pangolins como hospedeiro intermediário é a divergência no domínio de ligação ao receptor (RBD) da cepa RaTG13 (96% semelhante a cepa SARS-CoV-2) encontrada em morcegos *Rhinolophus affinis*, quando comparado ao SARS-CoV-2, o que sugere que ele pode não se ligar eficientemente a enzima conversora de angiotensina-2 (ACE-2) humano (ANDERSEN *et al.*, 2020; ZHOU, P. *et al.*, 2020). Em contrapartida, o coronavírus de um pangolim tem o RBD 97,4% idêntico ao RBD do SARS-CoV-2 (LAM *et al.*, 2020; XIAO *et al.*, 2020). Esses achados sugerem que o SARS-CoV-2 pode ter adquirido o RBD do coronavírus de pangolins por meio da recombinação ou desenvolvido essa semelhança por meio de evolução convergente (BANERJEE *et al.*, 2021). Entretanto, como demonstrado por BANERJEE *et al.*, (2021) (Figura 1) está é apenas uma das diversas teorias levantadas sobre a origem do novo coronavírus SARS-CoV-2.



**Figura 1.** Possíveis cenários para a Origem do SARS-CoV-2. Os coronavírus relacionados à SARS (SARSr-CoVs) têm circulado em espécies selecionadas de morcegos. É possível que o SARS-CoV-2 permaneça desconhecido em morcegos (1). Os morcegos podem espalhar CoVs dentro das populações de morcegos sem causar sinais clínicos de doença (2). Devido a fatores desconhecidos, os morcegos podem ocasionalmente liberar CoVs. Os SARSr-CoVs de morcego podem infectar humanos diretamente (5) ou por meio de um hospedeiro intermediário (3 e 4) e selecionar cepas adaptadas a humanos, como SARS-CoV-2, por meio da evolução adaptativa (5;



cenário A). Um SARSr-CoV de morcego poderia ter evoluído para SARS-CoV-2 em morcegos antes de se espalhar para humanos (5). Alternativamente, os SARSr-CoVs de morcego podem infectar outras espécies intermediárias de mamíferos que ainda precisam ser descobertas (3) e o vírus pode sofrer evolução adaptativa nesses animais (cenário B). Espécies de vírus com aptidão aprimorada, como SARS-CoV-2, podem infectar humanos que estão em contato próximo com o hospedeiro animal intermediário (4). Os pangolins podem ter sido infectados com um SARSr-CoV de morcego, diretamente (7) ou por meio de um hospedeiro intermediário não descoberto (8), levando a eventos de recombinação entre SARSr-CoVs de pangolim existentes e SARSr-CoVs de morcego para gerar SARS-CoV-2 (cenário C). O vírus recombinado poderia ter se espalhado para os humanos (9). Alternativamente, os pangolins podem ter sido infectados com SARSr-CoVs de morcegos (6 ou 7), seguidos de evolução adaptativa ou convergente (cenário D) para gerar SARSr-CoVs e/ou SARS-CoV-2 de pangolins. Figura criada com BioRender.com e retirada de BANERJEE *et al.* (2021).

### 1.1.2. Mecanismo de invasão às células hospedeiras

Os coronavírus são formados por quatro proteínas estruturais: *Spike* (S), membrana, envelope e nucleocapsídeo (YUKI; FUJIOGI; KOUTSOGIANNAKI, 2020). A *Spike* é uma glicoproteína transmembrana que medeia a entrada viral na célula hospedeira. Ela é composta por duas subunidades: S1 que se liga á célula dos hospedeiro; e S2 que é responsável pela fusão das membranas (CHEN *et al.*, 2020; LETKO; MARZI; MUNSTER, 2020; YUKI; FUJIOGI; KOUTSOGIANNAKI, 2020). As proteínas *Spike* recobrem o SARS-CoV-2 e apresentam na subunidade S1 um domínio de ligação ao receptor (RBD) otimizado que se liga ao receptor da enzima conversora de angiotensina-2 (ACE-2), uma proteína de membrana inativadora da angiotensina II (AngII), encontrada no coração, pulmões (pneumócitos tipo I e II), rins e trato gastrointestinal humano, gerando uma interação mais forte (ANDERSEN *et al.*, 2020; CHEN *et al.*, 2020; HAMMING *et al.*, 2004; HIRANO; MURAKAMI, 2020; LETKO; MARZI; MUNSTER, 2020; VAN DEN BRAND *et al.*, 2014)

O ciclo de vida dos vírus no hospedeiro consistem em 5 etapas: fixação, penetração, biossíntese, manutenção e liberação (YUKI; FUJIOGI; KOUTSOGIANNAKI, 2020). Como descrito anteriormente, o SARS-CoV-2 utiliza o mesmo receptor de entrada celular que o vírus SARS-CoV, a ACE-2 (ZHOU, P. *et al.*, 2020). Assim, a proteína *Spike* vai participar dos processos de fixação (subunidade S1) e penetração (subunidade S2) do vírus SARS-CoV-2 por meio de sua ligação com a ACE-2, permitindo que o genoma viral adentre a célula (CHEN *et al.*, 2020).

A ACE-2 é altamente expressa nas células epiteliais pulmonares (HAMMING *et al.*, 2004), o que coincide com as lesões pulmonares iniciais frequentemente observadas. As células epiteliais, macrófagos alveolares e células dendríticas (DCs) são elementos essenciais na defesa

inata contra infecções respiratórias (YOSHIKAWA *et al.*, 2009) uma vez que as DCs e os macrófagos podem fagocitar células epiteliais apoptóticas infectadas e apresentar o antígeno às células T. Assim, as células T CD4<sup>+</sup> vão ativar as células B promovendo a produção de anticorpos específicos do vírus e as células T CD8<sup>+</sup> vão matar as células infectadas pelo vírus (CHANNAPPANAVAR; ZHAO; PERLMAN, 2014). Assim, a infecção gerada pela COVID-19 ativa as imunidades inata e adaptativa, causando a chamada “tempestade de citocinas”. Esta tempestade é caracterizada pelo aumento excessivo e descontrolado de citocinas pró-inflamatórias, levando ao quadro de hiperinflamação, falência múltipla de órgãos (MEHTA *et al.*, 2020; ZHANG, W. *et al.*, 2020) e linfopenia nos pacientes (ZHENG *et al.*, 2020; ZHOU, F. *et al.*, 2020).

## 1.2. TEMPESTADE DE CITOCINAS

A tempestade de citocinas é caracterizada por um estado de liberação descontrolada de uma variedade de citocinas inflamatórias sistêmicas (levando ao estado de hiperinflamação) e pela hiperativação de células imunes, sendo intimamente relacionada ao mau prognóstico em casos de COVID-19. Essa liberação descontrolada e a hiperativação têm início na ligação da proteína *Spike* com a ACE-2 por meio de eventos moleculares e da internalização da ACE-2 (down regulation) mediada pelo vírus (FAJGENBAUM; JUNE, 2020; KUBA *et al.*, 2005; MAHMUDPOUR *et al.*, 2020; YANG *et al.*, 2021).

A tempestade de citocinas abrange vários distúrbios de desregulação imune caracterizados por sintomas constitucionais, inflamação sistêmica e disfunção de múltiplos órgãos que podem levar a falência de múltiplos órgãos. As citocinas por si só possuem tempo de meia-vida curto, o que impede efeitos fora do tecido linfóide e locais de inflamação. Entretanto, sua produção sustentada, como no caso da tempestade de citocinas, leva a níveis circulantes elevados, levando a hiperinflamação (FAJGENBAUM; JUNE, 2020).

Como já descrito, a entrada do vírus SARS-CoV-2 nas células epiteliais respiratórias provoca uma resposta imune inicial com produção de citocinas inflamatórias juntamente com a fraca resposta de interferon (IFN) (HUSSMAN, 2020). Afim de esclarecer o mecanismo da produção exacerbada de citocinas, HIRANO e MURAKAMI (2020) descreveram um possível mecanismo da tempestade de citocinas causada pela via da angiotensina 2 (AngII) na COVID-19. Nesse mecanismo, o próprio SARS-CoV-2 ativa o fator nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), e o aumento plasmático de AngII gerado pela *down regulation* da ACE-2 induz citocinas pró-inflamatórias,

incluindo o TNF- $\alpha$  e IL-6, além de ativar o amplificador de IL-6 que por sua vez ativa o NF- $\kappa$ B (feedback positivo). Assim, a própria inflamação pulmonar grave pode induzir a desregulação da via renina-angiotensina, seguida pelo desenvolvimento da síndrome do desconforto respiratório agudo.

Entretanto, esse modelo descrito elucidada apenas um dos possíveis caminhos para a tempestade de citocinas na COVID-19, visto que a mesma é composta por uma rede complexa de quatro eixos moleculares: downregulation de ACE-2 levando a uma desregulação do sistema renina-angiotensina-aldosterona (eixo ACE/AngII/AT1R); atenuação do receptor Mas (eixo ACE2/MasR); aumento da ativação de bradicinina (eixo ACE2/bradicinina B1R/DABK); e ativação do sistema complemento incluindo componentes C5a e C5b-9 (MAHMUDPOUR *et al.*, 2020). Assim, todos esses mecanismos convergem para a elevação dos níveis de fatores inflamatórios como IL-1 $\beta$ , IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  (HUANG *et al.*, 2020). Além disso, os níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias juntamente com a ativação imune inata, estão associadas ao desenvolvimento do estresse oxidativo, levando a morte celular (CHERNYAK *et al.*, 2020).

### 1.3. ESTRESSE OXIDATIVO E COVID-19

O estresse oxidativo (EO) é caracterizado como o desequilíbrio entre as espécies reativas de oxigênio (EROS) (pró-oxidantes) e antioxidantes, pendendo para pró-oxidante, levando a oxidação de lipídeos, proteínas e ácidos desoxirribonucleicos (DNA) (LIEBERT; JONES, 2006; SIES, 1997). Em condições fisiológicas, a oxidação de proteínas é em grande parte reversível. Entretanto, em condições patológicas associadas ao estresse oxidativo, como no caso da COVID-19, a oxidação pode ser irreversível, levando conseqüentemente a morte celular (TOUYZ *et al.*, 2018).

As EROS são moléculas e átomos instáveis que fazem ligações de oxirredução com outros átomos e moléculas, afim de se estabilizarem (FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, 1997). Elas são originadas de por todos tipos celulares, como por exemplo musculatura lisa vascular, células endoteliais e células mononucleares (HIGASHI *et al.*, 2009). Quando produzidas em grandes quantidades, as EROS podem acarretar distúrbios (FINKEL, 2011). Todavia, as EROS regulam diversas funções biológicas como por exemplo sobrevivência celular, a estimulação do fator de crescimento, proliferação e diferenciação, e geração da resposta inflamatória/imune (FINKEL, 2011; MITTLER, 2017; YANG *et al.*, 2013). Assim, o

estresse oxidativo induz a proliferação celular, hipertrofia, apoptose e inflamação por meio da ativação de várias cascatas de sinalização e fatores de transcrição redox-sensíveis. Porém, qualquer interrupção no equilíbrio entre pró-oxidante e antioxidantes leva ao estresse oxidativo e ao subsequente dano celular (CHERNYAK *et al.*, 2020; YANG *et al.*, 2013) nas células musculares lisas vasculares, endoteliais e miocárdicas por meio de alterações de genes redox, além de sobrecarga de cálcio intracelular e fragmentação do DNA (HIGASHI *et al.*, 2009).

A pneumonia viral causada pela infecção de SARS-CoV-2 induz a superativação da resposta imune nos tecidos pulmonares por meio da replicação viral, sendo quase sempre acompanhado de estresse oxidativo. Entretanto, até o momento ainda não está claro se o COVID-19 desencadeia o estresse oxidativo no epitélio das vias aéreas (CHERNYAK *et al.*, 2020). Ainda assim, IMAI *et al.* (2008) observou que há uma alta taxa de produção de OxPL (fosfolipídeos oxidados) em exsudatos inflamatórios que revestem os espaços das áreas lesadas, pneumócitos e macrófagos alveolares de humanos infectados por SARS, além da formação de malondialdeído (produto da degradação da peroxidação lipídica). Eles relatam ainda que a produção de EROS e de OxPL local, gerados pelo processo de estresse oxidativo, não são apenas um subproduto do processo da doença pulmonar, mas controlam a gravidade da doença.

Durante a infecção, as células endoteliais ativadas secretam citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas que recrutam células imunes para o local da inflamação (CHERNYAK *et al.*, 2020). Entre as citocinas pró-inflamatórias secretadas, está o TNF- $\alpha$ , o qual ativa o fator de transcrição NF- $\kappa$ B, responsável por controlar a expressão de metaloproteinases de matriz (MMPs) que quebram e ativam diversas citocinas pró-inflamatórias como, IL-1 $\beta$ , TNF e TGF $\beta$ 1. Além disso, o NF- $\kappa$ B controla a expressão de IL-6 (CHERNYAK *et al.*, 2020; PARKS; WILSON; LÓPEZ-BOADO, 2004).

#### 1.4. DIABETES COMO FATOR DE RISCO PARA A COVID-19

Algumas condições coexistentes como hipertensão, diabetes e obesidade são associados a casos mais graves de COVID-19. A relação entre quadros críticos de COVID-19 e a diabetes está possivelmente no estado inflamatório crônico presente nestes pacientes, aumentando o risco de infecções (ENGLMEIER, 2020; FAJGENBAUM; JUNE, 2020; MULLER *et al.*, 2005), podendo levar a sepse (FRYDRYCH *et al.*, 2018).

O Diabetes Mellitus Tipo 2 (DM2) é caracterizado por diferentes graus de resistência à insulina e deficiência relativa na secreção desse hormônio. A resistência à insulina ocorre por meio da diminuição no número de receptores de insulina, da falha na ligação hormônio-receptor, ou falha na translocação de GLUT 4 para a membrana (CRUZ *et al.*, 2013). Esta resistência está intimamente associada a capacidade do estresse oxidativo e estado inflamatório de gerar apoptose e disfunções nas células  $\beta$ -pancreáticas (MAEDLER *et al.*, 2002; POLLACK *et al.*, 2016; XIE *et al.*, 2018).

O estado inflamatório crônico ocorre por meio da produção contínua de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- $\alpha$  e IL-6 secretadas por macrófagos. Essas citocinas em específico atuam se ligando aos receptores de insulina, interrompendo as vias de sinalização, causando resistência à insulina (SOKOLOVA *et al.*, 2019; XIE *et al.*, 2018). Além disso, o aumento dos níveis glicêmicos e de ácidos graxos livres na DM2 induzem a uma característica pró-inflamatória em macrófagos que residem ou invadem o tecido adiposo, ilhotas pancreáticas e na vasculatura (EHSES *et al.*, 2007; NGUYEN *et al.*, 2007; VANDANMAGSAR *et al.*, 2011), além de induzir ao estresse oxidativo, provocando uma resposta inflamatória e, conseqüentemente, o aumento da secreção de IL-1 $\beta$  (BÖNI-SCHNETZLER *et al.*, 2008; MAEDLER *et al.*, 2002; ZHOU *et al.*, 2010). A IL-1 $\beta$  por sua vez, amplifica ainda mais a inflamação por meio da autorregulação dependente do NF- $\kappa$ B, aumentando a expressão de citocinas e quimiocinas, e o recrutamento de células imunes, (BÖNI-SCHNETZLER *et al.*, 2008; NGUYEN *et al.*, 2007), gerando um ciclo vicioso sustentado.

A hiperglicemia gera, ainda, um aumento na produção de EROS por meio de diversas vias (DREWS; KRIPPEIT-DREWS; DUÏFER, 2010; FINKEL, 2011; ZHANG, P. *et al.*, 2020). Com o aumento dos níveis de EROS há também o aumento nos níveis de marcadores de danos ao DNA induzidos por estresse oxidativo e redução dos níveis de enzimas antioxidantes (OGUNTIBEJU, 2019). As células  $\beta$  são extremamente sensíveis ao estresse oxidativo, uma vez que possuem baixa capacidade antioxidante. Assim, as moléculas oxidantes atuam no metabolismo celular (indução de eventos-chave para a apoptose) e aumentam a expressão de antioxidantes o que acarreta a atenuação dos efeitos do estresse oxidativo na função das células  $\beta$  por meio da regulação positiva de enzimas antioxidantes. Como citado anteriormente, as células fagocíticas também geram dano oxidativo às células  $\beta$  por meio das EROs, espécies reativas de nitrogênio (ERNs) e citocinas produzidas e liberadas por elas (DREWS; KRIPPEIT-DREWS; DUÏFER, 2010).

Desta forma, a DM2 é composta por diferentes alterações metabólicas que acarretam a resistência à insulina, havendo diversas vias causais metabólicas. Além da produção de citocinas pró-inflamatórias e do estresse oxidativo já comentadas, a DM2 afeta também vias de resolução da inflamação, como a resposta ao choque térmico (*Heat Shock Response – HSR*) (KRAUSE *et al.*, 2015b).

### 1.5. HSP70 E INFLAMAÇÃO

A HSR é um mecanismo de defesa contra o estresse celular não letal (oxidativo, térmico, isquêmico, metabólico, etc), que é iniciado pela ativação do fator de transcrição *heat shock factor 1* (HSF1) (DE LEMOS MULLER *et al.*, 2019; KRAUSE *et al.*, 2015b). A ativação da HSR ocorre logo após os primeiros sinais inflamatórios, como o aumento da temperatura (local ou sistêmica) corporal, estimulando a produção rápida das proteínas de choque térmico (*Heat Shock Protein – HSP*), com ênfase na HSP72 (DE LEMOS MULLER *et al.*, 2019; KRAUSE *et al.*, 2015b; KRAUSE *et al.*, 2015c; SINGH; HASDAY, 2013).

As HSP são divididas por famílias de peso molecular. A HSP70 são as proteínas de choque térmico mais abundantes e sensíveis, aumentando seu conteúdo celular em até 2% durante o estresse. Essa família é constituída por proteínas com peso molecular de 70 a 78 kDa, possuindo como principais membros: as HSP72 (72 kDa), forma induzida por estresse, e as HSP73 (73 kDa), forma expressas constitutivamente. Durante a HSR as HSP70 evitam as interações inadequadas, formação de agregados de proteínas e degradação de proteínas lesadas, além de auxiliarem no redobramento de proteínas novas. Elas possuem ainda um potente efeito anti-inflamatório intracelular, atribuído a sua capacidade de interação com o complexo NF- $\kappa$ B, o associando com seu inibidor I $\kappa$ B, impedindo a transcrição de citocinas pró-inflamatórias e melhorando a sensibilidade à insulina (BORGES *et al.*, 2013; KRAUSE *et al.*, 2015b; NOBLE; MILNE; MELLING, 2008; TANG *et al.*, 2013). Além das funções descritas acima, a HSP72 atua ainda na inibindo a ativação da JNK (ARCHER; VON SCHULZE; GEIGER, 2018) (impedindo a fosforilação dos receptores de insulina) (KRAUSE *et al.*, 2015c) e o estresse oxidativo, combatendo o aumento da síntese de EROS, oxidação de proteínas, oxidação do DNA e peroxidação lipídica, gerados pela diabetes, inibindo a apoptose e a inflamação (KARUNAKARAN; PARK, 2013; KRAUSE *et al.*, 2015b). Entretanto, o efeito anti-inflamatório das HSP70 é dependente do local onde elas se encontram. Desta formas as HSP70 intracelular (iHSP70) são associadas ao efeito anti-inflamatório, enquanto as HSP70 presentes

no meio extracelular (eHSP70) estão relacionadas a função pró-inflamatória, gerando uma inflamação local e sistêmica (KRAUSE *et al.*, 2015c).

As HSP70 podem ser secretada na forma livre ou em vesículas (exossomos) por diversos tipos de células (CALDERWOOD; GONG; MURSHID, 2016), além de vazarem para fora de células que sofrem morte necrótica, mas não apoptótica. No meio extracelular, as eHSP70 interagem com células efetoras imunes, como por exemplo células dendríticas e células *natural killers* (NK), orquestrando a resposta imune (BASU *et al.*, 2000; BOTZLER *et al.*, 1998), e estimulam a liberação citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-12 por macrófagos (ASEA *et al.*, 2000; BASU *et al.*, 2000; JOHNSON; FLESHNER, 2006), o recrutamento de células NK (HORN *et al.*, 2007), a capacidade neutrofílica (ORTEGA *et al.*, 2009) e quimiotaxia (ORTEGA *et al.*, 2006). Desta forma, as eHSP70 atuam como moléculas associadas a danos padrões (DAMPs), ligando-se à receptores de reconhecimento de padrão (PRR), como por exemplo o receptor *Toll-like 2* (TLR2) e 4 (TLR4), desencadeando cascatas de sinalização inflamatórias que ativam a proteína NF- $\kappa$ B, induzindo mudanças na expressão gênica e iniciando a resposta imune inata (CALDERWOOD; GONG; MURSHID, 2016; CALDERWOOD; MURSHID; GONG, 2012; DE MAIO, 2011). Assim, as HSP70 atuam como um sinal de perigo para o sistema imune, ativando os mecanismos imunes inatos e inflamatórios antes do contato com o antígeno (FLESHNER; CAMPISI; JOHNSON, 2003).

## 1.6. HSP70 E DIABETES

A expressão e a liberação das proteínas de choque térmico é um importante mecanismo inflamatório (HIRSCH; HECK, 2022). Entretanto, indivíduos com DM2 apresentam alteração da HSR (razão eHSP72/iHSP72), a qual é associada ao estado inflamatório crônico. Sendo assim, apresentam níveis elevados de eHSP72 (efeito pró-inflamatório) quando comparados com indivíduos saudáveis (MAHMOUD *et al.*, 2018) e diminuição de iHSP72 (BRUCE *et al.*, 2003; DE LEMOS MULLER *et al.*, 2018; KURUCZ *et al.*, 2002; RODRIGUES-KRAUSE *et al.*, 2012).

As eHSP72 presentes no plasma se ligam as células por meio dos receptores TLR2 e TLR4 (CALDERWOOD; GONG; MURSHID, 2016; CALDERWOOD; MURSHID; GONG, 2012; DE MAIO, 2011; SEARS; KIM, 2010). O TLR4 é um importante mediador da resistência à insulina, contribuindo para a resistência por meio de sua ativação por ligantes exógenos ou endógenos. Quando ativado, ele excita por diferentes vias as quinases pró-inflamatórias JNK

(isoformas 1, 2 e 3), IKK e NF- $\kappa$ B, inibindo a fosforilação do receptor de insulina (IRS) e estimulando a transcrição de genes pró-inflamatórios (citocinas, quimiocinas e EROs) dessensibilizando à insulina também dentro da própria célula alvo e em outras células (efeito parácrino e sistêmico). Além disso, a ativação do TLR4 ativa vias de produção excessiva de óxido nítrico (NO) (KRAUSE *et al.*, 2015b; KRAUSE *et al.*, 2015c; SEARS; KIM, 2010).

Embora muitos mecanismo possam contribuir para o desenvolvimento da resistência à insulina, a JNK exerce um papel central nessa condição (DE OLIVEIRA *et al.*, 2022). Isso porque a ativação das isoformas JNK1 e JNK2 induzem três mecanismos que resultam na resistência à insulina, sendo eles: (a) fosforilação do receptor de insulina da proteína de transdução de sinal (IRS-1), (b) promoção da inflamação metabólica através da ativação de macrófagos, (c) e regulação negativa do eixo PPAR $\alpha$ -FGF21 (SOLINAS; BECATTINI, 2017). A ativação da JNK leva, ainda, ao aumento da produção de EROS (KRAUSE *et al.*, 2015c), influenciando positivamente a inflamação via NF- $\kappa$ B, gerando mais inflamação, EROS e eHSP70, sustentando o ciclo vicioso inflamatório (DE OLIVEIRA *et al.*, 2022). A ativação das vias NF- $\kappa$ B e JNK levam também a inibição da sinalização da Akt permitindo a ativação de glicogênio sintase quinase-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ), um importante inibidor da ativação do HSF1, reduzindo a síntese de HSPs (CANGERI DI NASO *et al.*, 2015). Essa redução leva uma resposta reduzida a estresses não letais, deixando a célula mais suscetível a danos provenientes de espécies reativas (EROS e ERNS), os quais possuem níveis elevados em indivíduos com hiperglicemia (glicotoxicidade) e inflamação, como no estado da DM2.

Devido ao aumento na demanda de insulina causada pela hiperglicemia crônica na DM2, as células  $\beta$  apresentam aumento de síntese proteica podendo levar a resposta de proteína desdobrada/mal dobradas (UPR) e ao estresse do reticulo endoplasmático (RE). Porém, como os níveis de eHSP70 estão reduzidos, o suprimento de chaperonas para o enovelamento apropriado de proteínas recém-sintetizada não é o suficiente, causando disfunção das células  $\beta$ , perpetuação da inflamação e aumento do risco de apoptose (HUANG; XIE; LIU, 2014). Desta forma, a liberação de eHSP70 leva a redução dos níveis da HSR, disfunções metabólicas e perda de integridade celular (KRAUSE *et al.*, 2014; KRAUSE, *et al.*, 2015c).

### 1.7. HSR, DIABETES E COVID-19

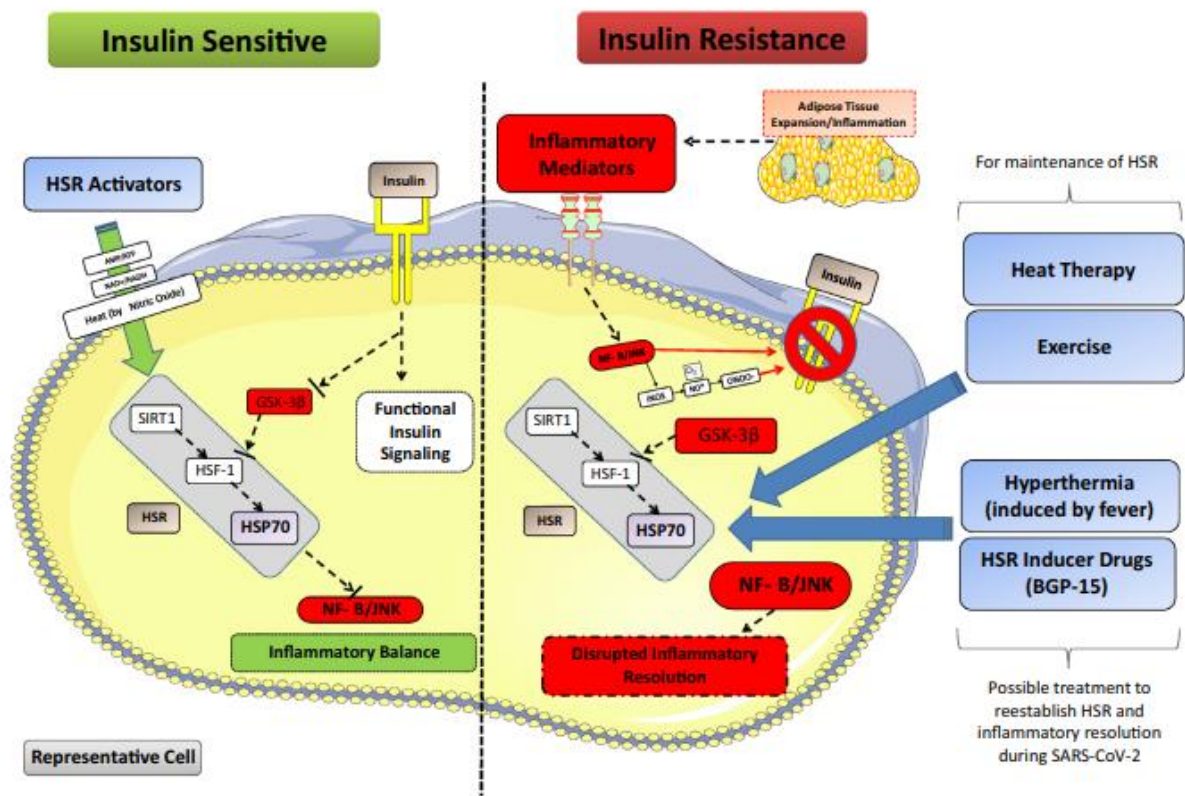
Entre os grupos de risco para o desenvolvimento da COVID-19 grave estão doenças crônicas como hipertensão, diabetes e doenças cardiovasculares (GRASSELLI *et al.*, 2020;



ZHOU, F. *et al.*, 2020). É interessante salientar que todos apresentam resistência à insulina (NEWSHOLME *et al.*, 2010). No caso de indivíduos diabéticos, sua maior propensão a hospitalização e mortalidade pode estar relacionada com o comprometimento da resposta imune causada pela disfunção metabólica crônica (BENFIELD; JENSEN; NORDESTGAARD, 2007; EMERGING; FACTORS, 2011; FRYDRYCH *et al.*, 2018). Um ponto comum sugerido entre doenças metabólicas e a COVID-19 é o estado inflamatório e a incapacidade de induzir sua resolução (KRAUSE; GERCHMAN; FRIEDMAN, 2020).

A HSR é uma importante via na proteostase e adaptação ao estresse normal (DE LEMOS MULLER *et al.*, 2019). Porém, indivíduos com doenças metabólicas, como o diabetes, essa resposta está reduzida (DE LEMOS MULLER *et al.*, 2018). Desta forma, estes indivíduos apresentam uma resposta à inflamação prejudicada, permitindo que a inflamação se espalhe por todos os tecidos, aumentando a taxa de complicações de pacientes, como os infectados por SARS-CoV-2 (DE LEMOS MULLER *et al.*, 2018; KRAUSE *et al.*, 2015b). Isso ocorre porque nesses indivíduos há uma sinalização de insulina prejudicada, resultando na manutenção da função da enzima GSK-3 $\beta$  e inibição da ativação do HSF1, que tem como efeito a redução da HSR (BIJUR; DE SARNO; JOPE, 2000; CANGERI DI NASO *et al.*, 2015; DE LEMOS MULLER *et al.*, 2018; RODRIGUES-KRAUSE *et al.*, 2012). Além disso, diabéticos apresentam uma inflamação de baixo grau, ou seja, os níveis de mediadores inflamatórios como, TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$ , ficam cronicamente elevados (SOKOLOVA *et al.*, 2019; XIE *et al.*, 2018).

A infecção por SARS-CoV-2 ativa a resposta imune adaptativa e inata, levando a tempestade de citocinas (MEHTA *et al.*, 2020; ZHANG, W. *et al.*, 2020). A alta expressão de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- $\alpha$ , levam a ativação da JNK, que por sua vez leva a inativação de receptores de insulina (CHUNG *et al.*, 2008) e, eventualmente, à resistência à insulina (NEWSHOLME *et al.*, 2010). A expressão de TNF- $\alpha$  também ativa proteínas e enzimas que iniciam a produção de EROS e ERNS (NEWSHOLME; KRAUSE, 2012). Além disso, a expressão de TNF- $\alpha$  e ativação da JNK, seja pela infecção por SARS-CoV-2 ou pela inflamação de baixo grau presente nos diabéticos, pode reprimir transitoriamente a ativação do HSF1 e fosforilar o HSF1 em seu domínio regulador, causando sua supressão (DAI *et al.*, 2000). Assim, tanto diabéticos quanto infectados por SARS-CoV-2 possuem mecanismo que atuam sobre a sinalização insulínica, levando a uma resistência à insulina prejudicando a resolução da inflamação por meio da diminuição da HSR (Figura 2).



**Figura 2.** Resposta ao choque térmico no estado saudável e no estado resistente à insulina. No estado sensível à insulina, a ativação da sinalização da insulina levará à inibição da enzima GSK-3 $\beta$  (por fosforilação). Nesse caso, a ativação do HSR, quando estimulado, é normal e o HSP72 pode manter a inibição do NF- $\kappa$ B, portanto, um equilíbrio inflamatório. A obesidade (expansão do tecido adiposo) e a inatividade física iniciam uma inflamação crônica de baixo grau que se espalha para todos os tecidos. Os mediadores inflamatórios (citocinas, ligantes de TLR e outros) podem induzir a ativação de NF- $\kappa$ B e JNK, levando à superprodução de EROS/ERNS (pelo aumento da atividade e expressão de enzimas inflamatórias) e inibição da sinalização da insulina. Na presença de resistência à insulina, GSK-3 $\beta$  torna-se ativado e inibe a atividade e expressão de HSF1, resultando em um HSR atenuado. Nessa circunstância, a não inibição do NF- $\kappa$ B resulta na amplificação da inflamação e a não resolução, causando um ciclo inflamatório vicioso. A terapia de calor (imersão em água quente ou sauna) e o exercício podem ativar a HSR e melhorar a sinalização e a inflamação da insulina. Duas possíveis terapias alternativas que podem ser aplicadas para restaurar a HSR e reduzir a inflamação em pacientes infectados com SARS-CoV-2 são o uso racional de drogas antipiréticas (permitindo aumentos de temperatura, melhorando assim a HSR) e o uso de drogas ativadoras de HSR, como o BGP-15. Figura e legenda retiradas de KRAUSE; GERCHMAN; FRIEDMAN, (2020).

## **2. JUSTIFICATIVA**

Considerando o papel fundamental da HSR (com o aumento consequente das HSP72) na resolução da inflamação e o fato desta estar reduzida em indivíduos com resistência à insulina, este estudo teve como objetivo principal testar a HSR em pacientes diabéticos infectados com SARS-CoV-2 e compará-la com a de indivíduos sem diabetes. Os dados apresentados nessa dissertação estão publicados no periódico *Bioolecules* (BORGES RUSSO *et al.*, 2022) (Anexo I).

## **3. HIPÓTESE**

### **3.1. HIPÓTESE NULA**

Os pacientes diabéticos infectados por SARS-CoV-2 terão menor resposta ao choque térmico e maior conteúdo de eHSP72.

### **3.2. HIPÓTESE ALTERNATIVA**

Os pacientes diabéticos infectados por SARS-CoV-2 não terão menor resposta ao choque térmico e maior conteúdo de eHSP72.

## **4. OBJETIVO**

### **4.1. OBJETIVO GERAL**

Comparar a avaliação da Resposta ao Choque Térmico (HSR) e marcadores de dano oxidativo em pacientes com SARS-CoV-2 com e sem diabetes tipo 2, admitidos na unidade de terapia intensiva (UTI) no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) gravemente enfermos com amostras congeladas de indivíduos com e sem diabetes tipo 2 não infectados com SARS-CoV-2 de estudos anteriores.

### **4.2. OBJETIVO ESPECÍFICO**

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- a) Quantificar a concentração de HSP72 extracelular;

- b) Avaliar a resposta ao choque térmico dos pacientes;
- c) Avaliar a peroxidação lipídica no plasma;
- d) Mensurar o dano a proteínas plasmáticas.

## 5. MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1. SELEÇÃO DA AMOSTRA

Neste estudo foram admitidos pacientes internados na Unidade de Terapia Intensiva (UTI) do Hospital de clínicas de Porto Alegre (HCPA) e submissão a intubação orotraqueal e ventilação mecânica (VM) com tempo inferior a 48h. Os pacientes deveriam ter idade  $\geq 18$  anos, serem infectados por SARS-CoV-2 confirmada através do ensaio de Reações da Cadeia em Polimerase (RT-PCR) a partir de esfregaços nasais e faríngeos. Os critérios de exclusão foram: doença renal crônica em diálise; cirrose Child-Pugh B ou C; uso de corticosteróides crônicos; hipercortisolismo; insuficiência adrenal; transplante de órgãos sólidos; cirurgia gástrica ou ressecção do intestino delgado (incluindo cirurgia bariátrica); diminuição da absorção intestinal; expectativa de vida inferior a 24h; gravidez ou amamentação; e participação de grupos de intervenção de outros estudos.

### 5.2. PROCEDIMENTOS E COLETA DE SANGUE

Após a admissão, intubação e ventilação, os responsáveis pelos possíveis pacientes do estudo foram contatados. Havendo a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo II) pelo representante legal, até 72h após a admissão na UTI foram realizadas coletas de amostras de sangue por meio de cateteres centrais e armazenadas em tubos Vacutainer™ revestidos com EDTA em três tubos individuais, utilizando técnicas assépticas padrão. Após a coleta, um tubo foi separado para a análise de eHSP72, TBARS, carbonilas e proteínas no plasma basal. Os outros dois tubos foram incubados a 37° ou 42°C a realização do teste de resposta ao choque térmico e posterior retirada do plasma para a medida de eHSP72 liberada em cada temperatura. Para a obtenção do plasma, o sangue foi centrifugado a 1502 g por 10min a 4°C. O plasma coletado foi acondicionado em *ependorfs* de 1,5 mL em ultrafreezer com temperatura de -80°C para posterior análise. Já as características básicas dos pacientes, como idade, sexo, comorbidades e medicamentos utilizados foram coletadas dos prontuários médicos eletrônicos e da família do paciente quando necessário. A definição do

diabetes se deu por meio de diagnóstico pré-venoso, uso atual de medicamentos antihiperlipidêmicos, ou um valor de hemoglobina glicada (HbA1c) de admissão (A1C)  $\geq 6,5\%$  (48 mmol/mol). Sendo que a HbA1c foi medida por HPLC (variante II Turbo) e expressa como porcentagem da hemoglobina total para HbA1c. Além disso, para fins de comparação entre grupos, foram utilizadas ainda amostras congeladas de indivíduos saudáveis e com diabetes tipo 2 de estudos anteriores (DE LEMOS MULLER *et al.*, 2018; FAYH *et al.*, 2018; RODRIGUES-KRAUSE *et al.*, 2012). Desta forma, foram originados 4 grupos: Control (grupo controle não infectado, n = 19) (C), Diabetics (diabetes não infectado, n = 22) (DMT2), COVID-19 Control (n = 27) (CC) e COVID-19 Diabetics (n = 32) (DMT2+COVID). Todos os grupos foram analisados utilizando a mesma metodologia.

### 5.3. CÁLCULO AMOSTRAL

O presente trabalho foi realizado com um grupo de pacientes recrutados do trabalho guarda-chuva “Efeito de anormalidades metabólicas sobre a morbimortalidade relacionada a infecção pelo SARS-CoV-2 em pacientes internados em hospital de referência para o estado do Rio Grande do Sul”, do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Este, utilizou tamanho amostral de 420 pacientes (pacote *EnvStats*, versão 2.3.1, software R, para detectar diferença na mortalidade entre grupos, UTI sem diabetes  $\times$  UTI com diabetes, com um poder de 80% e um erro de 5%, considerando 10% como faltando devido a erros de dosagem). No presente projeto, para a avaliação da HSR, eHSP72 e dano oxidativo, foram coletadas amostras de sangue de 60 pacientes consecutivos.

### 5.4. TESTE DE RESPOSTA AO CHOQUE TÉRMICO

O teste de resposta ao choque térmico foi realizado conforme descrito por DE LEMOS MULLER *et al.* (2018). Assim, após a coleta, os tubos contendo o sangue total dos pacientes foram imediatamente incubados a duas temperaturas 37°C (temperatura controle) e 42°C (temperatura de estresse térmico) durante 2 h em banho-maria, com agitação leve a cada 15 min. Após a incubação, o sangue total foi centrifugado a 1502 g por 10 min, permitindo a separação do plasma para a análise direta de HSP72 extracelular. Para demonstrar a resposta ao choque térmico (HSR), será utilizado o delta da concentração de HSP72 entre sangue incubado a 37°C e a 42°C.

### 5.5. QUANTIFICAÇÃO DE HSP72 EXTRACELULAR

Para a quantificação das proteínas de choque térmico de 72 kDa extracelular foi utilizado um kit de *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) (EKS-715, Stressgen, Victoria, BC, Canadá), conforme descrito anteriormente (KRAUSE *et al.*, 2014). Para a quantificação da concentração de HSP72 foi utilizada uma curva padrão a partir de diluições conhecidas de HSP72. Tanto as amostras, quanto a curva padrão foram lidas em uma leitora de microplacas (Multiskan Go, ThermoScientific, Waltham, MA, EUA) a 450nm.

### 5.6. AVALIAÇÃO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

A peroxidação lipídica foi avaliada conforme descrito por DE SOUZA *et al.*, (2018), sendo utilizado o princípio a reação entre as extremidades aldeídicas dos lipoperóxidos com o ácido tiobarbitúrico (TBA). Desta forma, para a quantificação foram utilizadas substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Para tanto, as amostras de plasma foram centrifugadas a 12060rpm a 4°C por 10min, após foi retirado 250µL de sobrenadante da amostra centrifugada, acrescido 10µL de butilhidroxitolueno (BHT) a 4,5mM e 200µL de ácido tricloroacético (TCA) a 30%. Após, a solução de amostra mais reagentes, foi colocada em banho-maria fervente por 15min, centrifugada a 15.000 g em temperatura ambiente por 2 min. 400µL de sobrenadante foram retirados desta solução, sendo adicionado 400µL de TBA 0,73% e posto em banho-maria fervente por 30min. As amostras retiradas do banho-maria foram pipetadas em duplicatas (200 µL em cada poço) em placa de 96 poços, sendo lidas a 540 nm em leitor de microplacas (Multiskan Go, ThermoScientific, Waltham, MA, EUA). O resultado da concentração de MDA na amostra foi dado em nmol/mL.

### 5.7. QUANTIFICAÇÃO DO DANO A PROTEÍNAS

O dano as proteínas foi medido por meio da técnica de carbonila, sendo quantificado por meio de espectrofotometria como anteriormente descrito (DALLE-DONNE *et al.*, 2003). Desta forma, foram utilizados 2 *ependorfs* (branco e teste) contendo 500µL de amostra, sendo adicionado em cada *ependorf* 500µL de TCA 40% e posteriormente agitados no vórtex e incubados em gelo por 30min. Após a incubação foram centrifugados a 15.000 g por 5 min a 4°C, descartados os sobrenadantes e ressuspendidos os pellets, adicionando-se 500µL de HCl 2N no *ependorf* do branco e DNPH 10 mM no *ependorf* de teste. Por seguinte, ambos

*ependorfs* foram incubados por 1h, sendo vortexados a cada 10min. Após o tempo de incubação, foi acrescido ao conteúdo dos *ependorfs* 500 $\mu$ L de TCA 40%, seguido de agitação, centrifugação a 15.000 g por 5min a 4°C e descarte de sobrenadante. A seguir foi adicionado 800 $\mu$ L de TCA 20%, seguido de centrifugação e descarte de sobrenadante. Depois foram realizadas três lavagens com solução etanol/ácido de etila (1:1). Após as lavagens, os *pellets* foram ressuspensos e dissolvidos em cloridrato de guanidina (6M) a 37°C, sendo incubado em banho-maria a 37°C por 15 min passando no vórtex a cada minuto. Após, as amostras foram lidas as absorbâncias em 366nm utilizando cubeta de quartzo. Assim, primeiramente foi lido o branco/controle e depois o teste da amostra. O dano as proteínas foram expressos em nmol/mg de proteína.

## 5.8. QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS PLASMÁTICA

A quantificação de proteínas do plasma sanguíneo foi realizada por meio da técnica de Bradford (BRADFORD, 1976). Assim, as amostras (diluição 1:80) e a curva padrão foram pipetadas (10 $\mu$ L) em duplicata em placa de 96 poços, sendo acrescido a cada poço 200 $\mu$ L de solução de cor. Após foi realizada a leitura da absorbância da placa em leitor de microplacas (Multiskan Go, ThermoScientific, Waltham, MA, EUA) a 595nm. A leitura de absorbância foi utilizada para calcular a concentração de proteína na amostra, usando como referência a curva padrão. A quantificação de proteínas foi utilizada para calcular o dano as proteínas, por meio da técnica de carbonila.

## 5.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis categóricas foram expressas em porcentagem. Dependendo da distribuição da variável, os dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão (DP) ou mediana [P25-P75]. Os grupos foram comparados utilizando análise de variância unidirecional com o teste de Kruskal-Wallis seguido de pós-hoc de Bonferroni, ou teste de qui-quadrado, conforme o caso. Os valores foram considerados estatisticamente significativos quando  $p \leq 0,05$ . As análises estatísticas foram realizadas usando SPSS, versão 23.0 (Armonk, NY, EUA). O coeficiente de correlação de ordem de classificação ( $r$ ) de Spearman foi utilizado para determinar a correlação entre eHSP72 e HSR.

## 5.10. ASPECTOS ÉTICOS

Este estudo teve a aprovação do Comitê de Ética do Hospital de Clínicas de Porto Alegres (CAAE 32962620600005327 e FIPE-HCPA 2020-0218) e os procedimentos do estudo ocorreram de acordo com a Declaração de Helsinque.

## 6. RESULTADOS

### 6.1. CARACTERÍSTICAS DOS PACIENTES

Como demonstra a Tabela 1, as características gerais dos pacientes com COVID-19 em estágio grave. Não foi vista diferença significativa para idade, peso e índice de massa corporal (IMC) entre os pacientes críticos com COVID-19 (controle infectado versus diabetes infectado). Porém, assim como esperado, a glicemia e o HbA1C foram maiores no grupo DMT2+COVID.

**Tabela 1.** Características dos sujeitos.

| Características do Paciente | COVID-19 Control<br>(n = 27) | COVID-19 Diabetics<br>(n = 32) | <i>p</i> Valor    |
|-----------------------------|------------------------------|--------------------------------|-------------------|
| Sexo (M/F)                  | (13/14)                      | (18/14)                        |                   |
| Idade (anos)                | 58.2 ± 13.5                  | 63.5 ± 11.2                    | <i>p</i> = 0.522  |
| Massa corporal (Kg)         | 90.8 ± 18.42                 | 89.3 ± 20                      | <i>p</i> = 0.762  |
| IMC (KG/m <sup>2</sup> )    | 33 ± 6.7                     | 33.6 ± 7.9                     | <i>p</i> = 0.631  |
| Glicemia (mg/dL)            | 171 ± 48                     | 235 ± 79 <sup>#</sup>          | <i>p</i> = 0.006  |
| HbA1C (%)                   | 5.9 ± 0.5                    | 8.9 ± 2.2 <sup>#</sup>         | <i>p</i> < 0.0001 |

<sup>#</sup> Quando há diferença entre os grupos COVID-19 Control e COVID-19 Diabetics. Dados expressos como números absolutos, média ± DP.



## 6.2. CARACTERIZAÇÃO DOS GRUPOS

A Tabela 2 apresenta as características dos sujeitos de cada grupo. Nela é possível identificar que os pacientes infectados mesmo sem um diagnóstico prévio de diabetes e HbA1C < 6,5% apresentaram hiperglicemia significativa. Este fato se deve muito provavelmente à hiperglicemia de estresse (> 140 mg/mL). Junto a isto, os pacientes infectados pelo SARS-CoV-2 com diabetes também apresentaram valores mais altos de glicose sérica quando comparados a indivíduos não infectados com diabetes. Além disso, os pacientes em estado grave com COVID-19 apresentaram IMC mais alto, o que demonstra prevalência a obesidade, independente da presença ou não de diabetes. Essa prevalência pode indicar a presença de resistência a insulina, podendo explicar também a hiperglicemia e os níveis de HbA1C dentro deste grupo.

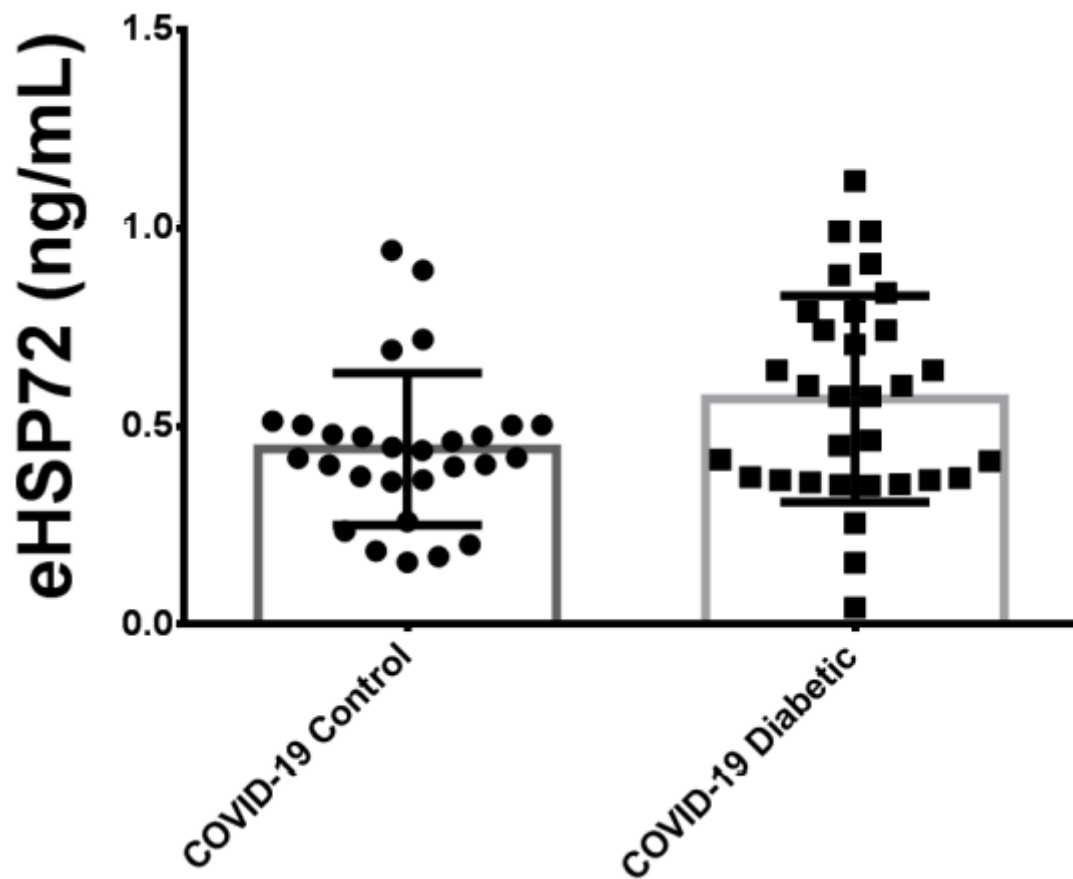
**Tabela 2.** Características dos sujeitos.

| Características do Paciente | Control<br>(n = 19) | Diabetics<br>(n = 22) | COVID-19 Control<br>(n =27) | COVID-19 Diabetics<br>(n = 32) |
|-----------------------------|---------------------|-----------------------|-----------------------------|--------------------------------|
| Sexo (M/F)                  | -                   | -                     | (13/14)                     | (18/14)                        |
| Idade (anos)                | 54.5 ± 8.3          | 68.9 ± 7.8            | 58.2 ± 13.5                 | 63.5 ± 11.2                    |
| Massa corporal (Kg)         | 68.1 ± 9.3          | 79.12 ± 10.8          | 90.8 ± 18.42*               | 89.3 ± 20*                     |
| Altura (m)                  | 1.63 ± 0.08         | 1.66 ± 0.8            | 1.66 ± 0.1                  | 1.67 ± 0.1                     |
| IMC (Kg/m <sup>2</sup> )    | 25.6 ± 2.5          | 28.7 ± 3.1            | 33 ± 6.7*                   | 33.6 ± 7.9*                    |
| Glicemia (mg/dL)            | 102.5 ± 12.4        | 133.1 ± 21.4          | 171.1 ± 48.38*†             | 235.7 ± 79.4*‡                 |
| HbA1C (%)                   | -                   | 6.75 ± 0.6            | 5.94 ± 0.51                 | 8.9 ± 2.2 ‡                    |

\* Quando diferente do grupo controle não infectado. † Quando diferente do grupo diabetics. ‡ Quando diferente do grupo COVID-19 control. Dados expressos como número absoluto ou média ± DP.

### 6.3. CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE HSP 72 EXTRACELULAR EM PACIENTE EM ESTADO GRAVE COM COVID-19

Não foram encontradas diferenças estatísticas entre pacientes críticos com COVID-19 para eHSP72 ( $0,453 \pm 0,202$  vs.  $0,547 \pm 0,253$  ng/mL) (Figura 2). Curiosamente, foi detectada uma correlação positiva entre eHSP72 e HbA1C ( $r = 0,394$ ,  $p = 0,0042$ ) em pacientes gravemente enfermos com COVID-19.

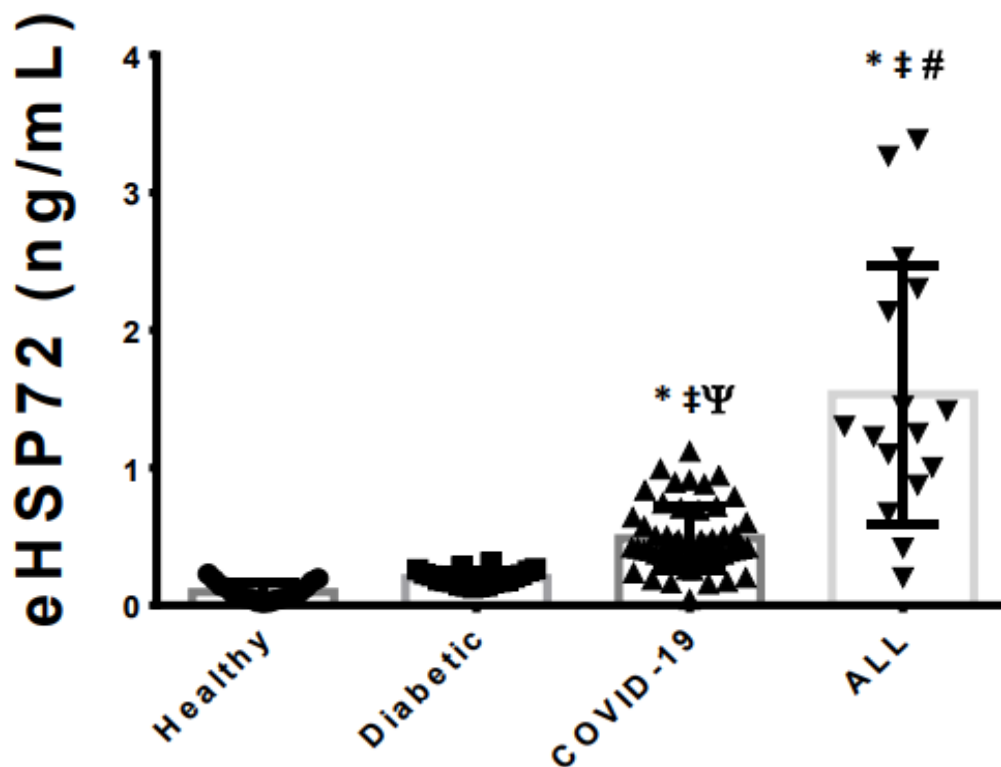


**Figura 3.** Comparação plasmática de eHSP72 entre pacientes críticos com COVID-19 com e sem diabetes.

#### 6.4. COMPARAÇÃO PLASMÁTICA DE HSP72 ENTRE DIFERENTES GRUPOS

Como era esperado haver uma diferença entre os níveis de eHSP72 entre os grupos COVID-19 e DMTS+COVID-19, decidimos comparar os resultados com outros grupos de estudos anteriores. Assim, para fins de comparação com uma condição já conhecida pela inflamação e elevada concentração plasmática de eHSP72, incluímos o grupo C (n = 19), DMT2 (n = 22) e um grupo com crianças/adolescentes com leucemia linfoblástica aguda (ALL) (n = 16), . Como demonstrado na Figura 4, utilizamos a comparação entre quatro grupos. Desta forma, houve a união entre os pacientes críticos infectados por SARS-CoV-2 (com e sem diabetes), formando o grupo COVID-19.

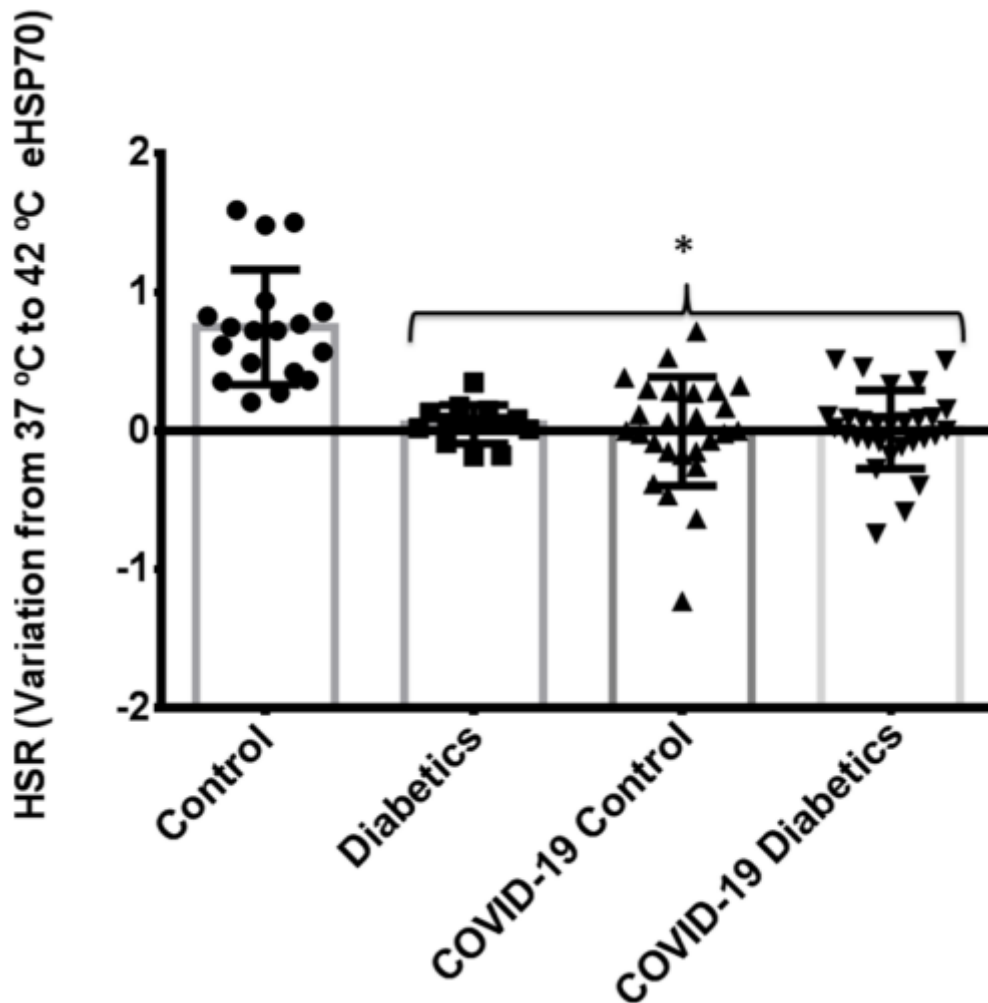
O grupo COVID-19 apresentou elevação das concentrações plasmáticas de HSP72 ( $0,486 \pm 0,23$  ng/mL) quando comparado com os grupos C ( $0,096 \pm 0,06$  ng/mL) e DMT2 ( $0,198 \pm 0,05$  ng/mL). Entretanto, quando comparado com o os pacientes do ALL ( $1,53 \pm 0,94$  ng/mL), os indivíduos com COVID-19 apresentam níveis mais baixos de eHSP72.



**Figura 4.** Comparação da concentração plasmática de eHSP72 entre pacientes críticos com COVID-19 grave, indivíduos saudáveis não infectados, pacientes não infectados com diabetes e pacientes com leucemia linfoblástica aguda (ALL). \* Quando diferente do grupo control (healthy). † Quando diferente de pacientes do grupo diabetic. # quando diferente dos pacientes infectados por covid-19. Ψ Quando diferente do grupo ALL.  $p < 0,005$ . Dados expressos como média  $\pm$  D.P.

### 6.5. COMPARAÇÃO DA RESPOSTA AO CHOQUE TÉRMICO

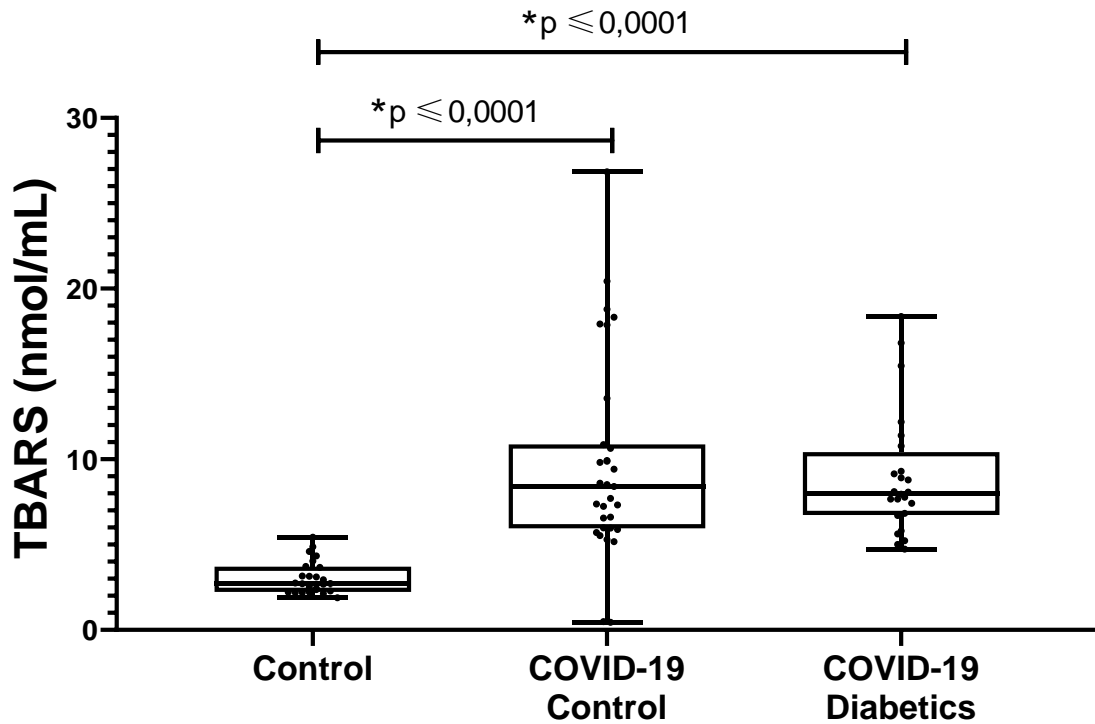
Como revela a Figura 5, o grupo C composto por indivíduos saudáveis sem diabetes apresentam uma HSR preservada, como demonstrado em estudo anterior. (CANGERI DI NASO *et al.*, 2015). Entretanto, a infecção por SARS-CoV-2 em pacientes gravemente enfermos, diminui a HRS mesmo na ausência de diabetes.



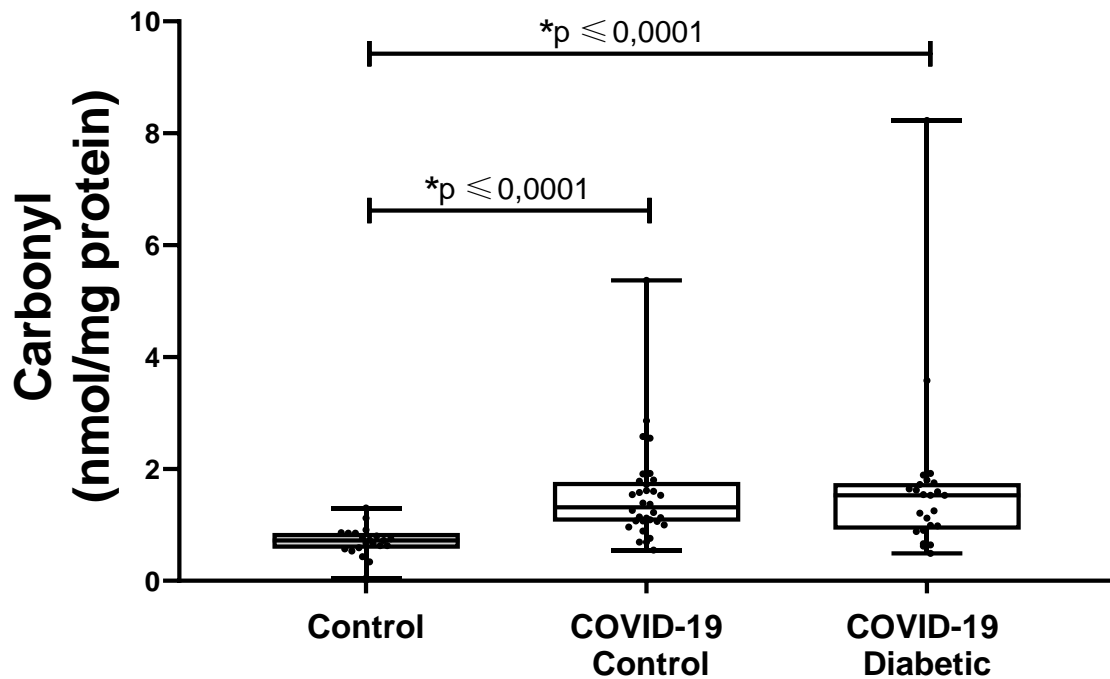
**Figura 5.** Comparação da resposta ao choque térmico entre pacientes críticos infectados com COVID-19 com e sem diabetes, indivíduos saudáveis não infectados com COVID-19 e diabéticos não infectados com COVID-19. A diferença entre a concentração de eHSP72 do sangue incubado a 37°C e a 42°C é utilizada como índice da resposta ao choque térmico (HSR). \* Quando diferente da indivíduos saudáveis não infectados com COVID-19 (control).  $p < 0.05$ . Dados expressos como média  $\pm$  DP.

## 6.6. DANO OXIDATIVO

As Figuras 6 e 7 demonstram que os pacientes com COVID-19 grave apresentam um aumento dos danos oxidativos (lipídico e proteico) quando comparados ao grupo saudável (C). Não havendo diferença entre controle infectado com COVID-19 e diabetes infectado com COVID-19.



**Figura 6.** Comparação de dano lipídico entre pacientes críticos com COVID-19 com e sem diabetes, e indivíduos não infectados por COVID-19. \* Quando diferente de indivíduos saudáveis não infectados com COVID-19 (control). Teste de Kruskal-Walis.  $p < 0.05$ . Dados expressos como mediana e intervalo interquartil.



**Figura 7.** Comparação de dano a proteínas entre pacientes críticos com COVID-19 com e sem diabetes, e indivíduos não infectados por COVID-19. \* Quando diferente de indivíduos saudáveis não infectados com COVID-19 (control). Teste de Kruskal-Wallis.  $p < 0.05$ . Dados expressos como mediana e intervalo interquartil.

## 7. DISCUSSÃO

O estudo apresentado foi o primeiro a medir a concentração basal de HSP72 e a HSR em pacientes críticos infectados por SARS-CoV-2, com e sem diabetes. Como principais conclusões temos: a) a concentração plasmática de eHSP72 apresenta níveis elevados em pacientes críticos com COVID-19, entretanto, menores que os níveis observados em pacientes com ALL, b) há uma redução da HSR em pacientes com COVID-19 grave quando comparada com a HRS de indivíduos saudáveis, independentemente da presença ou não de diabetes e c) os pacientes críticos infectados com SARS-CoV-2 apresentam níveis mais altos de peroxidação lipídica e danos à proteína que indivíduos saudáveis, independentemente do estado glicêmico.

Como relatado anteriormente neste estudo, indivíduos com inflamação crônica e estresse oxidativo, como pacientes de Diabetes Mellitus Tipo 1 (DM1) (OGLESBEE *et al.*, 2005) e DM2 apresentam níveis mais altos de eHSP72 (MAHMOUD *et al.*, 2018), assim como os observados nos pacientes com COVID-19. Essa alteração na concentração de eHSP72 é correlacionada com marcadores de inflamação, como proteína C reativa, contagem de monócitos e TNF- $\alpha$  (MAYER; BUKAU, 2005; NJEMINI; DEMANET; METS, 2004). Porém, para o nosso estudo, a presença de diabetes não influenciou os níveis de eHSP72 dos pacientes

com COVID-19 indicando que, aparentemente, a DM2 não induz a alterações na HSR de pacientes em estado grave infectados por SARS-CoV-2. Como a redução de HSR é semelhante entre pacientes críticos com COVID-19 (com ou sem diabetes) e pacientes não infectados com diabetes, podemos afirmar que o diabetes é equivalente ao COVID-19 em termos de sistema de HSP72 e HRS. Da mesma forma, no passado acreditava-se que ao diabetes era um equivalente cardiovascular (HAFFNER *et al.*, 1998). Como a HSR já está significativamente reduzida nos pacientes com diabetes, nenhuma diminuição adicional é observada quando os mesmos possuem COVID-19 grave.

Como descrito, a resistência à insulina é outra complicação acarretada pelos níveis elevados de eHSP72 (KRAUSE *et al.*, 2014). A ativação das JNKs por meio da ligação das eHSP72 com os receptores TLR2 e TLR4 promove a fosforilação de IRS-1, levando a inibição da ativação de Akt (LEE *et al.*, 2003), redução da absorção de glicose pelos tecidos sensíveis e a um estado de resistência à insulina. Desta forma, os níveis mais altos de eHSP72 no sangue dos pacientes com COVID-19 grave pode contribuir para a resistência à insulina e hiperglicemia de estresse comumente presente nestes pacientes (Tabela 1), podendo levar a resultados negativos.

Alguns estudos levantaram a hipótese de que a COVID-19 poderia aumentar o risco de DM2 em pacientes pós-infecção (BARRETT *et al.*, 2022; NARAYAN; STAIMEZ, 2022). Os mecanismos subjacentes a esse efeito de longo prazo da COVID-19 ainda são desconhecidos. No entanto, nosso grupo especula que a elevada concentração de eHSP72 possa estar, ao menos em parte, envolvida nesse mecanismo. O alto nível de eHSP72 pode levar a um possível efeito deletério sobre as células  $\beta$  pancreáticas. KRAUSE *et al.* (2014) relatou que a eHSP72 elevada, exerce efeitos diretos em as células  $\beta$ -pancreáticas clonais (de humanos e roedores) e ilhotas do pâncreas, diminuindo a viabilidade das células  $\beta$  e ilhotas, a secreção de insulina e a função mitocondrial. Observando nossos dados, especulamos que os níveis elevados de eHSP72 em pacientes com COVID-19 podem estar relacionados a esse efeito metabólico duradouro do COVID-19 e sua possível associação com o desenvolvimento de diabetes (Figura 8). A correlação positiva entre eHSP72 plasmática e HbA1C ( $r = 0,394$ ,  $p = 0,0042$ ) em pacientes com COVID-19 pode sugerir, pelo menos em parte, uma interação direta entre esses fatores. A Figura 8 apresenta o mecanismo proposto para essa hipótese.

Durante a elaboração deste projeto, esperava-se que os pacientes com DM2 infectados por SARS-CoV-2 em estado grave apresentassem uma HSR menor que os pacientes infectados em estado grave sem DM2. Entretanto, todos os pacientes com COVID-19 deste estudo

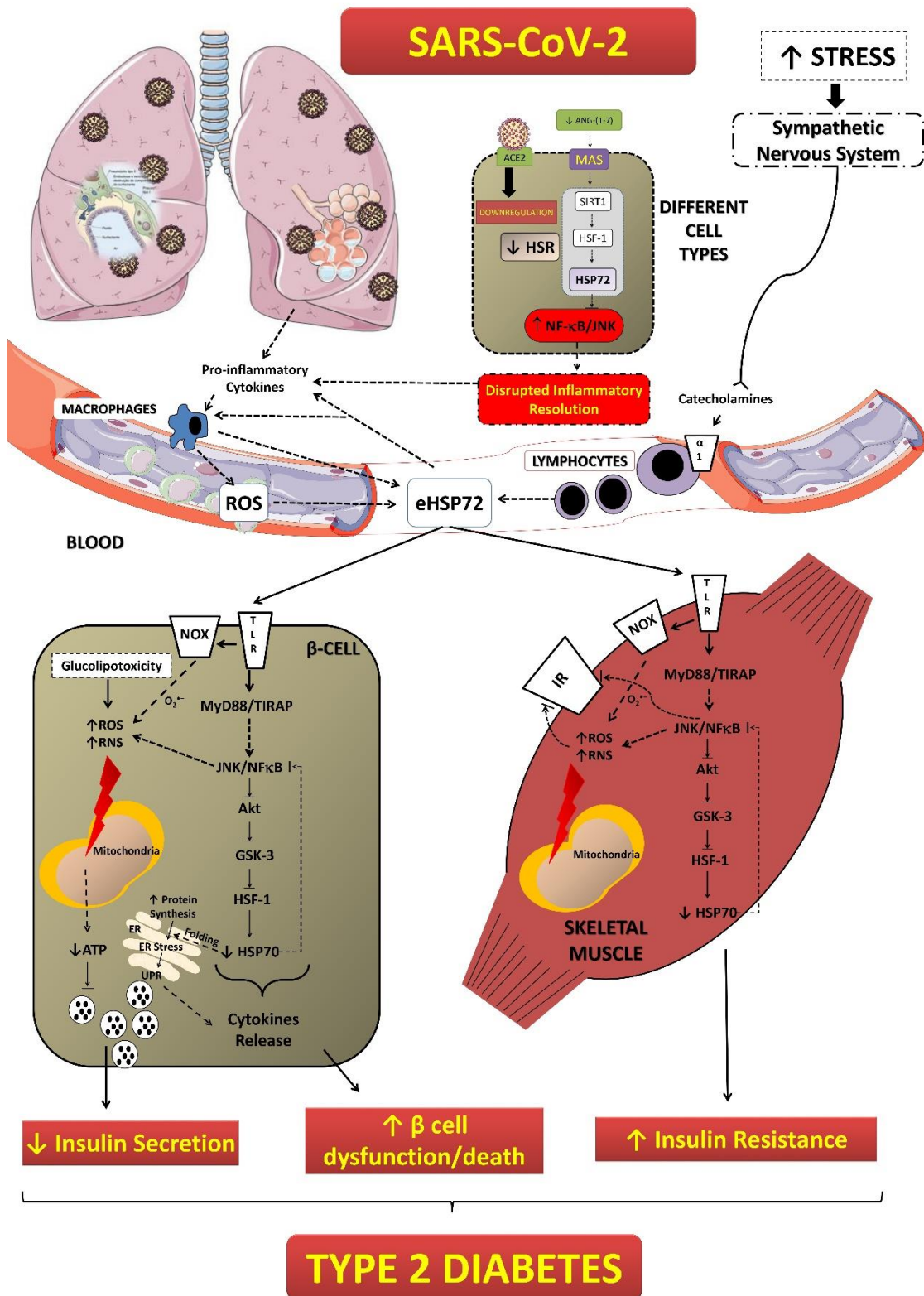
apresentaram HSR reduzida, independente da presença ou não de DM2. Sendo assim, sugerimos que o vírus pode inibir diretamente a HSR ou, utilize destas vias para seu próprio ciclo de replicação. Isso porque a infecção pelo novo coronavírus pode levar a desregulação de ACE2 em diversas células, diminuindo a produção de angiotensina (1-7) e a ativação do receptor MAS. Quando ativado o receptor MAS induz respostas anti-inflamatórias, que juntamente com a ativação da SIRT1, estimula a via de HSR (KARPE; TIKOO, 2014). Na ausência deste eixo, a HSR é reduzida e o efeito inibitório da iHSP72 intracelular sobre o NF- $\kappa$ B se torna ausente, interrompendo a resolução inflamatória. Além disso, a tempestade de citocinas induz danos diretos nas células/tecidos e ativa a liberação de HSP72 para o meio extracelular (eHSP72) (KRAUSE *et al.*, 2015a). Como já descrito, a eHSP72 reforça o sistema inflamatório e induz a ativação do TLR (principalmente TLR4) em vários tipos celulares, incluindo as células  $\beta$  e músculo esquelético (KRAUSE *et al.*, 2015b). Assim, a ativação crônica dos TLRs pela eHSP72 pode reduzir a capacidade de ativação da HSR, piorando a resposta inflamatória e alterando o estado metabólico (Figura 8).

Outra evidência deste estudo foi o aumento do dano lipídico e proteico nos indivíduos com COVID-19 independentemente da presença de diabetes. Esse aumento do dano está intimamente ligado ao aumento da produção de EROS. ROMÃO *et al.* (2022) demonstraram que os pacientes em estado grave com COVID-19 apresentaram aumento da geração mitocondrial de EROS por monócitos e que indivíduos em estado grave infectados com SARS-CoV-2 com baixa carga viral possuem capacidade antioxidante total reduzida. O aumento das EROS já era esperado, uma vez que os macrófagos produzem aumento dessas espécies afim de causar a morte de patógenos intracelulares (MILLS *et al.*, 2016). Além disso, a ligação de eHSP72 ao TLR4 estimula a geração de EROS mitocondriais (WEST *et al.*, 2011), e a proteína SARS-CoV-2 ORF3a também induz a produção de EROS mitocondrial promovendo a expressão e estabilização do fator induzível por hipóxia alfa 1 (HIF-1 $\alpha$ ), facilitando a infecção por SARS-CoV-2 (TIAN *et al.*, 2021). A estabilização do HIF-1 $\alpha$ , leva ao aumento da expressão de ACE2, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 e INF  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\lambda$  (CODO *et al.*, 2020). Desta forma, o aumento da produção de EROS em indivíduos com COVID-19 grave sustenta o ciclo vicioso pró-inflamatório.

Considerando o potencial terapêutico que o aumento da HSR pode ter no desfecho inflamatório em pacientes em estado grave infectados com SARS-CoV-2, podemos sugerir diferentes estratégias de tratamento, como: (a) uso racional de drogas antipiréticas, permitindo



a elevação da temperatura corporal pela febre, mas sem causar danos por calor e garantindo o aumento da iHSP72, (b) aumento artificial da temperatura corporal (utilizando cobertores



**Figura 8.** Possível papel da eHSP72 elevada e HSR mais baixo na infecção por SARS-CoV-2 e diabetes: uma hipótese integrativa. A infecção causada por SARS-CoV-2 pode regular negativamente a ACE2 em várias células, diminuindo a produção de angiotensina (1-7) e a ativação do receptor MAS. Sem esse eixo, a HSR é diminuída e

o efeito inibitório da HSP72 sobre o NF- $\kappa$ B é ausente, levando a uma resolução inflamatória interrompida. A tempestade de citocinas induz danos diretos nas células/tecidos e ativa, juntamente com o aumento do tônus simpático, a liberação de HSP72 para o meio extracelular (eHSP72). A eHSP72 pode reforçar o sistema inflamatório e induzir a ativação de TLR (receptores Toll-Like), principalmente TLR4, em vários tipos de células, incluindo nas células  $\beta$  pancreáticas e músculo esquelético. Essa interação pode levar a ativação de proteínas de sinalização pró-inflamatórias, como MyD88 e TIRAP, que ativam IKK, p38, JNK e, finalmente, NF- $\kappa$ B, induzindo alterações na expressão gênica. Além disso, a ativação de TLR pode aumentar a atividade da NADPH oxidase (NOX), que produz superóxido e, juntamente com os efeitos inflamatórios das citocinas, leva a disfunção mitocondrial. Nas células  $\beta$  pancreáticas o efeito final é a redução da capacidade de produção de ATP, menor secreção de insulina e, a longo prazo, disfunção e morte das células  $\beta$ . As respostas no músculo esquelético podem incluir o bloqueio da sinalização da insulina (através do aumento das espécies radicais de oxigênio – ROS – e nitrogênio – RNS – e fosforilação de diferentes sítios de receptores de insulina), levando à resistência à insulina. A ativação crônica dos TLRs pela eHSP72 pode reduzir a capacidade de ativação da HSR, piorando o estado inflamatório e metabólico. A ação conjunta desses efeitos levaria a uma leve hiperglicemia e, por fim, ao diabetes.

térmicos), (c) uso de ativadores de HSP72 como o BGP-15, o qual se mostrou seguro e bem tolerado em ensaios clínicos de fase II em pacientes com diabetes e resistência à insulina (KRAUSE; GERCHMAN; FRIEDMAN, 2020; LITERÁTI-NAGY *et al.*, 2009, 2010). SMUDER *et al.* (2019) demonstrou que o BGP-15 em modelo animal induz benefícios metabólicos, além de reduzir a sinalização inflamatória e melhorar os músculos respiratórios durante a ventilação mecânica. Entretanto, a eficácia e a segurança dessas possíveis terapias necessitam ser testadas na população deste estudo.

O atual estudo apresenta algumas limitações. Primeiro, é importante salientar que a maioria dos nossos pacientes críticos apresentava obesidade, com graus potencialmente altos de resistência a insulina. Desta forma, a população sem diabetes não era metabolicamente saudável, o que pode ter contribuído para que não houvesse diferença da HSR entre os pacientes em estado grave com COVID-19 com ou sem diabetes. Segundo, a falta de informações sobre a HSR em pacientes não críticos com COVID-19 impediu que testássemos se o nível anterior da HSR determinaria a evolução da doença e a necessidade de internação na UTI. Terceiro, o baixo tamanho amostral e a incapacidade de estratificar os dados por e sexo e contabilizar os medicamentos anteriores também foram limitações deste trabalho.

## 8. CONCLUSÃO

Apesar das limitações, conseguimos demonstrar que os pacientes em estado grave infectados por SARS-CoV-2 apresentaram concentrações elevadas de eHSP72 plasmático, atuando como mensageiros pró-inflamatórios. Foi observado também uma redução na HSR dos pacientes com COVID-19, o que leva a uma resolução inflamatória deficitária. Desta forma, a redução da HSR e ao aumento da eHSP72 podem explicar em parte, a inflamação descontrolada (tempestade de citocinas) observada nessa população. Sugerimos ainda que sejam investigadas novas terapias ativadoras da HSR como forma de controlar a inflamação gerada pela infecção dos vírus SARS-CoV-2.

## REFERÊNCIAS

- ANDERSEN, K. G. *et al.* The proximal origin of SARS-CoV-2. **Nature Medicine**, [s. l.], v. 26, n. 4, p. 450–452, 2020.
- ARCHER, A. E.; VON SCHULZE, A. T.; GEIGER, P. C. Exercise, heat shock proteins and insulin resistance. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, [s. l.], v. 373, n. 1738, 2018.
- ASEA, A. *et al.* HSP70 stimulates cytokine production through a CD 14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine. **Nature Medicine**, [s. l.], v. 6, n. 4, p. 435–442, 2000.
- BANERJEE, A. *et al.* Unraveling the Zoonotic Origin and Transmission of SARS-CoV-2. **Trends in Ecology and Evolution**, [s. l.], v. 36, n. 3, p. 180–184, 2021.
- BARRETT, C. E. *et al.* Risk for Newly Diagnosed Diabetes >30 Days After SARS-CoV-2 Infection Among Persons Aged <18 Years — United States, March 1, 2020–June 28, 2021. **MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report**, [s. l.], v. 71, n. 2, p. 59–65, 2022.
- BARTLETT, J. G. The severe acute respiratory syndrome. **Infectious Diseases in Clinical Practice**, [s. l.], v. 12, n. 3, p. 218–219, 2004.
- BASU, S. *et al.* Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF- $\kappa$ B pathway. **International Immunology**, [s. l.], v. 12, n. 11, p. 1539–1546, 2000.
- BENFIELD, T.; JENSEN, J. S.; NORDESTGAARD, B. G. Influence of diabetes and hyperglycaemia on infectious disease hospitalisation and outcome. **Diabetologia**, [s. l.], v. 50, n. 3, p. 549–554, 2007.
- BIJUR, G. N.; DE SARNO, P.; JOPE, R. S. Glycogen synthase kinase-3 $\beta$  facilitates staurosporine- and heat shock- induced apoptosis. Protection by lithium. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 275, n. 11, p. 7583–7590, 2000.

BÖNI-SCHNETZLER, M. *et al.* Increased interleukin (IL)-1 $\beta$  messenger ribonucleic acid expression in  $\beta$ -cells of individuals with type 2 diabetes and regulation of IL-1 $\beta$  in human islets by glucose and autostimulation. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, [s. l.], v. 93, n. 10, p. 4065–4074, 2008.

BONI, M. F. *et al.* Evolutionary origins of the SARS-CoV-2 sarbecovirus lineage responsible for the COVID-19 pandemic. **Nature Microbiology**, [s. l.], v. 5, n. 11, p. 1408–1417, 2020.

BORGES, T. J. *et al.* Extracellular Hsp70 inhibits pro-inflammatory cytokine production by IL-10 driven down-regulation of C/EBP $\beta$  and C/EBP $\delta$ . **International Journal of Hyperthermia**, [s. l.], v. 29, n. 5, p. 455–463, 2013.

BORGES RUSSO, M. K. *et al.* Elevated Extracellular HSP72 and Blunted Heat Shock Response in Severe COVID-19 Patients. **Biomolecules**, [s. l.], v. 12, n. 10, p. 1–16, 2022.

BOTZLER, C. *et al.* **Definition of extracellular localized epitopes of Hsp70 involved in an NK immune response.** [S. l.: s. n.], 1998.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, [s. l.], v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.

BRUCE, C. R. *et al.* Intramuscular heat shock protein 72 and heme oxygenase-1 mRNA are reduced in patients with type 2 diabetes: Evidence that insulin resistance is associated with a disturbed antioxidant defense mechanism. **Diabetes**, [s. l.], v. 52, n. 9, p. 2338–2345, 2003.

CALDERWOOD, S. K.; GONG, J.; MURSHID, A. Extracellular HSPs: The complicated roles of extracellular HSPs in immunity. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 7, n. APR, 2016.

CALDERWOOD, S. K.; MURSHID, A.; GONG, J. Heat shock proteins: Conditional mediators of inflammation in tumor immunity. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 3, n. APR, p. 1–10, 2012.

CANGERI DI NASO, F. *et al.* Obesity depresses the anti-inflammatory HSP70 pathway, contributing to NAFLD progression. **Obesity**, [s. l.], v. 23, n. 1, p. 120–129, 2015.

CHANNAPPANAVAR, R.; ZHAO, J.; PERLMAN, S. T cell-mediated immune response to respiratory coronaviruses. **Immunologic Research**, [s. l.], v. 59, n. 1–3, p. 118–128, 2014.

CHEN, Y. *et al.* Structure analysis of the receptor binding of 2019-nCoV. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [s. l.], v. 525, n. 1, p. 135–140, 2020.

CHERNYAK, B. V. *et al.* REVIEW COVID 19 and Oxidative Stress. **BIOCHEMISTRY**, [s. l.], v. 85, n. 12, 2020.

CHUNG, J. *et al.* HSP72 protects against obesity-induced insulin resistance. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 105, n. 5, p. 1739–1744, 2008.

CODO, A. C. *et al.* Elevated Glucose Levels Favor SARS-CoV-2 Infection and Monocyte Response through a HIF-1  $\alpha$  / Glycolysis-Dependent Axis. **Cell Metabolism**, [s. l.], v. 32, n. 3, p. 437–446, 2020.

CRUZ, N. G. *et al.* The linkage between inflammation and Type 2 diabetes mellitus. **Diabetes Research and Clinical Practice**, [s. l.], v. 99, n. 2, p. 85–92, 2013.

DAI, R. *et al.* c-Jun NH2-terminal kinase targeting and phosphorylation of heat shock factor-1 suppress its transcriptional activity. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 275, n. 24, p. 18210–18218, 2000.

DALLE-DONNE, I. *et al.* Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. **Clinica Chimica Acta**, [s. l.], v. 329, n. 1–2, p. 23–38, 2003.

DE GROOT RJ, BAKER SC, BARIC R, ENJUANES L, GORBALENYA AE, HOLMES KV, PERLMAN S, POON L, ROTTIER PJM, TALBOT PJ, WOO PCY, and Z. J. **Virus Taxonomy, Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. [S. l.: s. n.], 2011.

DE LEMOS MULLER, C. H. *et al.* Exercise Training for the Elderly: Inflammaging and the Central Role for HSP70. **Journal of Science in Sport and Exercise**, [s. l.], v. 1, n. 2, p. 97–115, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s42978-019-0015-6>.

DE LEMOS MULLER, C. H. *et al.* Heat-induced extracellular HSP72 release is blunted in elderly diabetic people compared with healthy middle-aged and older adults, but it is partially restored by resistance training. **Experimental Gerontology**, [s. l.], v. 111, n. July, p. 180–187, 2018.

DE MAIO, A. Extracellular heat shock proteins, cellular export vesicles, and the Stress Observation System: A form of communication during injury, infection, and cell damage: It is never known how far a controversial finding will go! Dedicated to Ferruccio Ritossa. **Cell Stress and Chaperones**, [s. l.], v. 16, n. 3, p. 235–249, 2011.

DE OLIVEIRA, A. A. *et al.* New insights into the role and therapeutic potential of HSP70 in diabetes. **Pharmacological Research**, [s. l.], v. 178, n. January, p. 106173, 2022.

DE SOUZA, D. C. *et al.* Effects of high-intensity interval and moderate-intensity continuous exercise on inflammatory, leptin, IgA, and lipid peroxidation responses in obese males. **Frontiers in Physiology**, [s. l.], v. 9, n. MAY, p. 1–9, 2018.

DREWS, G.; KRIPPEIT-DREWS, P.; DUÏFER, M. Oxidative stress and beta-cell dysfunction. **Pflugers Archiv European Journal of Physiology**, [s. l.], v. 460, n. 4, p. 703–718, 2010.

EHSES, J. A. *et al.* Increased Number of Islet-Associated Macrophages in Type 2 Diabetes. **Diabetes**, [s. l.], v. 56, n. September, p. 2356–2370, 2007.

EMERGING, T.; FACTORS, R. Diabetes Mellitus, Fasting Glucose, and Risk of Cause-Specific Death. [s. l.], 2011.

ENGLMEIER, L. A theory on SARS-CoV-2 susceptibility: low sensitivity of tlr7-signalling as a mechanistic explanation for the increased risk of obese and elderly COVID-19 patients. [s. l.], 2020.

FAJGENBAUM, D. C.; JUNE, C. H. Cytokine Storm. **New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 383, n. 23, p. 2255–2273, 2020.

FAYH, A. P. T. *et al.* Induction chemotherapy reduces extracellular heat shock protein 72 levels, inflammation, lipoperoxidation and changes insulin sensitivity in children and adolescents newly diagnosed with acute lymphoblastic leukemia. **Oncotarget**, [s. l.], v. 9, n. 47, p. 28784–28795, 2018.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da associação médica brasileira**, [s. l.], v. 43, n. 1, p. 61–68, 1997.

FINKEL, T. Signal transduction by reactive oxygen species. **Journal of Cell Biology**, [s. l.], v. 194, n. 1, p. 7–15, 2011.

FLESHNER, M.; CAMPISI, J.; JOHNSON, J. D. Can exercise stress facilitate innate immunity? A functional role for stress-induced extracellular Hsp72. **Exercise immunology review**, Germany, v. 9, p. 6–24, 2003.

FRYDRYCH, L. M. *et al.* Obesity and type 2 diabetes mellitus drive immune dysfunction, infection development, and sepsis mortality. **Journal of Leukocyte Biology**, [s. l.], v. 104, n. 3, p. 525–534, 2018.

GRASSELLI, G. *et al.* Baseline Characteristics and Outcomes of 1591 Patients Infected with SARS-CoV-2 Admitted to ICUs of the Lombardy Region, Italy. **JAMA - Journal of the American Medical Association**, [s. l.], v. 323, n. 16, p. 1574–1581, 2020.

GUAN, W. *et al.* Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. **New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 382, n. 18, p. 1708–1720, 2020.

HAFFNER, S. M. *et al.* M O R T A L I T Y F R O M C O R O N A R Y H E A R T D I S E A S E I N S U B J E C T S W I T H A N D W I T H O U T T Y P E 2 D I A B E T E S M O R T A L I T Y F R O M C O R O N A R Y H E A R T D I S E A S E I N S U B J E C T S W I T H T Y P E 2 D I A B E T E S A N D I N N O N D I A B E T I C S U B J E C T S W I T H A N D W I T H O U T P R I O R M Y O C A R D I A L I N F A R C T I O N. **The New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 339, n. 4, p. 229–234, 1998.

HAMMING, I. *et al.* Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis. **Journal of Pathology**, [s. l.], v. 203, n. 2, p. 631–637, 2004.

HIGASHI, Y. *et al.* Endothelial function and oxidative stress in cardiovascular diseases. **Circulation Journal**, [s. l.], v. 73, n. 3, p. 411–418, 2009.

HIRANO, T.; MURAKAMI, M. COVID-19: A New Virus, but a Familiar Receptor and Cytokine Release Syndrome. **Immunity**, [s. l.], v. 52, n. 5, p. 731–733, 2020.

HIRSCH, G. E.; HECK, T. G. Inflammation, oxidative stress and altered heat shock response in type 2 diabetes: the basis for new pharmacological and non-pharmacological interventions. **Archives of Physiology and Biochemistry**, [s. l.], v. 128, n. 2, p. 411–425, 2022.

HORN, P. *et al.* Exercise-recruited NK cells display exercise-associated eHSP-70. **Exercise Immunology Review**, [s. l.], v. 13, n. January, p. 100–111, 2007.

HUANG, C. *et al.* Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. **The Lancet**, [s. l.], v. 395, n. 10223, p. 497–506, 2020.

HUANG, L.; XIE, H.; LIU, H. Endoplasmic reticulum stress, diabetes mellitus, and tissue injury. **Current protein & peptide science**, United Arab Emirates, v. 15, n. 8, p. 812–818, 2014.

HUSSMAN, J. P. Cellular and Molecular Pathways of COVID-19 and Potential Points of Therapeutic Intervention. **Frontiers in Pharmacology**, [s. l.], v. 11, n. July, p. 1–17, 2020.

IMAI, Y. *et al.* Identification of Oxidative Stress and Toll-like Receptor 4 Signaling as a Key Pathway of Acute Lung Injury. **Cell**, [s. l.], v. 133, n. 2, p. 235–249, 2008.

JOHNSON, J. D.; FLESHNER, M. Releasing signals, secretory pathways, and immune function of endogenous extracellular heat shock protein 72. **Journal of Leukocyte Biology**, [s. l.], v. 79, n. 3, p. 425–434, 2006.

KARPE, P. A.; TIKOO, K. Heat shock prevents insulin resistance-induced vascular complications by augmenting angiotensin-(1-7) signaling. **Diabetes**, [s. l.], v. 63, n. 3, p. 1124–1139, 2014.

KARUNAKARAN, U.; PARK, K. G. A systematic review of oxidative stress and safety of antioxidants in diabetes: Focus on islets and their defense. **Diabetes and Metabolism Journal**, [s. l.], v. 37, n. 2, p. 106–112, 2013.

KRAUSE, M. *et al.* Elevated levels of extracellular heat-shock protein 72 (eHSP72) are positively correlated with insulin resistance in vivo and cause pancreatic  $\beta$ -cell dysfunction and death in vitro. **Clinical Science**, [s. l.], v. 126, n. 10, p. 739–752, 2014.

KRAUSE, M. *et al.* Heat shock proteins and heat therapy for type 2 diabetes: pros and cons. **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**, [s. l.], v. 18, n. 4, 2015a.

KRAUSE, M. *et al.* The chaperone balance hypothesis: The importance of the extracellular to intracellular HSP70 ratio to inflammation-driven type 2 diabetes, the effect of exercise, and the implications for clinical management. **Mediators of Inflammation**, [s. l.], v. 2015b.

KRAUSE, M. *et al.* The regulatory roles of NADPH oxidase, intra- and extra-cellular HSP70 in pancreatic islet function, dysfunction and diabetes. **Clinical Science**, [s. l.], v. 128, n. 11, p. 789–803, 2015c.

KRAUSE, M.; GERCHMAN, F.; FRIEDMAN, R. Coronavirus infection (SARS-CoV-2) in obesity and diabetes comorbidities: Is heat shock response determinant for the disease complications?. **Diabetology and Metabolic Syndrome**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 1–9, 2020.

KUBA, K. *et al.* A crucial role of angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) in SARS coronavirus-induced lung injury. **Nature Medicine**, [s. l.], v. 11, n. 8, p. 875–879, 2005.

KURUCZ, I. *et al.* Decreased expression of heat shock protein 72 in skeletal muscle of patients with type 2 diabetes correlates with insulin resistance. **Diabetes**, [s. l.], v. 51, n. 4, p. 1102–1109, 2002.

LAM, T. T. Y. *et al.* Identifying SARS-CoV-2-related coronaviruses in Malayan pangolins. **Nature**, [s. l.], v. 583, n. 7815, p. 282–285, 2020.

LEE, Y. H. *et al.* c-Jun N-terminal kinase (JNK) mediates feedback inhibition of the insulin

signaling cascade. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 278, n. 5, p. 2896–2902, 2003.

LETKO, M.; MARZI, A.; MUNSTER, V. Functional assessment of cell entry and receptor usage for SARS-CoV-2 and other lineage B betacoronaviruses. **Nature Microbiology**, [s. l.], v. 5, n. 4, p. 562–569, 2020.

LIEBERT, M. A.; JONES, D. P. 48. Jones 2006. [s. l.], v. 8, 2006.

LITERÁTI-NAGY, B. *et al.* Beneficial effect of the insulin sensitizer (HSP inducer) BGP-15 on olanzapine-induced metabolic disorders. **Brain Research Bulletin**, [s. l.], v. 83, n. 6, p. 340–344, 2010.

LITERÁTI-NAGY, B. *et al.* Improvement of insulin sensitivity by a novel drug, BGP-15, in insulin-resistant patients: a proof of concept randomized double-blind clinical trial. **Hormone and metabolic research**, [s. l.], v. 41, n. 5, p. 374–380, 2009.

LU, R. *et al.* Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. **The Lancet**, [s. l.], v. 395, n. 10224, p. 565–574, 2020.

MAEDLER, K. *et al.* Glucose-induced  $\beta$  cell production of IL-1 $\beta$  contributes to glucotoxicity in human pancreatic islets. **Journal of Clinical Investigation**, [s. l.], v. 110, n. 6, p. 851–860, 2002.

MAHMOUD, F. F. *et al.* Correlation between heat shock proteins, adiponectin, and T lymphocyte cytokine expression in type 2 diabetics. **Cell Stress and Chaperones**, [s. l.], v. 23, n. 5, p. 955–965, 2018.

MAHMUDPOUR, M. *et al.* COVID-19 cytokine storm: The anger of inflammation. **Cytokine**, [s. l.], v. 133, n. April, 2020.

MAYER, M. P.; BUKAU, B. Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism. **Cellular and Molecular Life Sciences**, [s. l.], v. 62, n. 6, p. 670–684, 2005.

MEHTA, P. *et al.* COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. **The Lancet**, [s. l.], v. 395, n. 10229, p. 1033–1034, 2020.

MILLS, E. L. *et al.* Succinate Dehydrogenase Supports Metabolic Repurposing of Mitochondria to Drive Inflammatory Macrophages. **Cell**, [s. l.], v. 167, n. 2, p. 457–470.e13, 2016.

MITTLER, R. ROS Are Good. **Trends in Plant Science**, [s. l.], v. 22, n. 1, p. 11–19, 2017.

MULLER, L. M. A. J. *et al.* Increased risk of common infections in patients with type 1 and type 2 diabetes mellitus. **Clinical Infectious Diseases**, [s. l.], v. 41, n. 3, p. 281–288, 2005.

NARAYAN, K. M. V.; STAIMEZ, L. R. Rising diabetes diagnosis in long COVID. **The Lancet Diabetes and Endocrinology**, [s. l.], v. 10, n. 5, p. 298–299, 2022.

NEWSHOLME, P. *et al.* Exercise and possible molecular mechanisms of protection from vascular disease and diabetes: The central role of ROS and nitric oxide. **Clinical Science**, [s. l.], v. 118, n. 5, p. 341–349, 2010.



NEWSHOLME, P.; KRAUSE, M. Nutritional Regulation of Insulin Secretion: Implications for Diabetes. **Clinical Biochemist Reviews**, [s. l.], v. 33, n. 2, p. 35–47, 2012.

NGUYEN, M. T. A. *et al.* A subpopulation of macrophages infiltrates hypertrophic adipose tissue and is activated by free fatty acids via toll-like receptors 2 and 4 and JNK-dependent pathways. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 282, n. 48, p. 35279–35292, 2007.

NJEMINI, R.; DEMANET, C.; METS, T. Inflammatory status as an important determinant of heat shock protein 70 serum concentrations during aging. **Biogerontology**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 31–38, 2004.

NOBLE, E. G.; MILNE, K. J.; MELLING, C. W. J. Heat shock proteins and exercise: A primer. **Applied Physiology, Nutrition and Metabolism**, [s. l.], v. 33, n. 5, p. 1050–1065, 2008.

OGLESBEE, M. J. *et al.* Diabetic ketoacidosis increases extracellular levels of the major inducible 70-kDa heat shock protein. **Clinical Biochemistry**, [s. l.], v. 38, n. 10, p. 900–904, 2005.

OGUNTIBEJU, O. O. Type 2 diabetes mellitus, oxidative stress and inflammation: examining the links. **International journal of physiology, pathophysiology and pharmacology**, [s. l.], v. 11, n. 3, p. 45–63, 2019.

ORTEGA, E. *et al.* Role of Hsp72 and norepinephrine in the moderate exercise-induced stimulation of neutrophils' microbicide capacity. **European Journal of Applied Physiology**, [s. l.], v. 98, n. 3, p. 250–255, 2006.

ORTEGA, E. *et al.* The effect of stress-inducible extracellular Hsp72 on human neutrophil chemotaxis: A role during acute intense exercise. **Stress**, [s. l.], v. 12, n. 3, p. 240–249, 2009.

PARKS, W. C.; WILSON, C. L.; LÓPEZ-BOADO, Y. S. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. **Nature Reviews Immunology**, [s. l.], v. 4, n. 8, p. 617–629, 2004.

POLLACK, R. M. *et al.* Anti-inflammatory agents in the treatment of diabetes and its vascular complications. **Diabetes Care**, [s. l.], v. 39, n. August, p. S244–S252, 2016.

RODRIGUES-KRAUSE, J. *et al.* Divergence of intracellular and extracellular HSP72 in type 2 diabetes: Does fat matter?. **Cell Stress and Chaperones**, [s. l.], v. 17, n. 3, p. 293–302, 2012.

ROMÃO, P. R. *et al.* Viral load is associated with mitochondrial dysfunction and altered monocyte phenotype in acute severe SARS-CoV-2 infection. **International Immunopharmacology**, [s. l.], v. 108, n. March, 2022.

SAÚDE, S. E. de. **Coronavírus Brasil**. [S. l.], [s. d.].

SEARS, D. D.; KIM, J. J. TLR4 and insulin resistance. **Gastroenterology Research and Practice**, [s. l.], v. 2010, 2010.

SIES, H. Physiological Society Symposium : Impaired Endothelial and Smooth Muscle Cell Function in Oxidative Stress. **Experimental Physiology**, [s. l.], v. 82, n. 2, p. 291–295, 1997.

SINGH, I. S.; HASDAY, J. D. Fever, hyperthermia and the heat shock response. **International**

**Journal of Hyperthermia**, [s. l.], v. 29, n. 5, p. 423–435, 2013.

SINGH, D.; YI, S. V. On the origin and evolution of SARS-CoV-2. **Experimental and Molecular Medicine**, [s. l.], v. 53, n. 4, p. 537–547, 2021.

SMUDER, A. J. *et al.* Effects of exercise preconditioning and HSP72 on diaphragm muscle function during mechanical ventilation. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, [s. l.], v. 10, n. 4, p. 767–781, 2019.

SOKOLOVA, K. *et al.* Macrophage Cytokine Production and Regeneration of Pancreas at Experimental Diabetes Mellitus Type 2 and at Modulation Activity of Macrophages. **Scandinavian Journal of Immunology**, [s. l.], v. 88, n. 6, p. 118–119, 2019.

SOLINAS, G.; BECATTINI, B. JNK at the crossroad of obesity, insulin resistance, and cell stress response. **Molecular Metabolism**, [s. l.], v. 6, n. 2, p. 174–184, 2017.

TANG, S. *et al.* Localization and Expression of Hsp27 and  $\alpha$ B-Crystallin in Rat Primary Myocardial Cells during Heat Stress In Vitro. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 8, n. 7, p. 1–9, 2013.

TIAN, M. *et al.* HIF-1 $\alpha$  promotes SARS-CoV-2 infection and aggravates inflammatory responses to COVID-19. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 1–13, 2021.

TOUYZ, R. M. *et al.* Vascular smooth muscle contraction in hypertension. **Cardiovascular Research**, [s. l.], v. 114, n. 4, p. 529–539, 2018.

VAN DEN BRAND, J. M. A. *et al.* The pathology and pathogenesis of experimental severe acute respiratory syndrome and influenza in animal models. **Journal of Comparative Pathology**, [s. l.], v. 151, n. 1, p. 83–112, 2014.

VANDANMAGSAR, B. *et al.* The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance. **Nature Medicine**, [s. l.], v. 17, n. 2, p. 179–189, 2011.

WERTHEIM, J. O. *et al.* A Case for the Ancient Origin of Coronaviruses. **Journal of Virology**, [s. l.], v. 87, n. 12, p. 7039–7045, 2013.

WEST, A. P. *et al.* TLR signalling augments macrophage bactericidal activity through mitochondrial ROS. **Nature**, [s. l.], v. 472, n. 7344, p. 476–480, 2011.

WHO ET AL. COVID-19 Weekly Epidemiological Update. **World Health Organization**, [s. l.], n. 58, p. 1–23, 2021.

WU, F. *et al.* A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. **Nature**, [s. l.], v. 579, n. 7798, p. 265–269, 2020.

XIAO, K. *et al.* Isolation of SARS-CoV-2-related coronavirus from Malayan pangolins. **Nature**, [s. l.], v. 583, n. 7815, p. 286–289, 2020.

XIE, K. *et al.* A multi-method evaluation of the effects of Inflammatory cytokines (IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) on pancreatic  $\beta$ -cells. **Journal of Cellular Physiology**, [s. l.], v. 233, n. 12, p. 9375–9382, 2018.

YANG, Y. *et al.* Reactive oxygen species in the immune system. **International Reviews of Immunology**, [s. l.], v. 32, n. 3, p. 249–270, 2013.

YANG, L. *et al.* The signal pathways and treatment of cytokine storm in COVID-19. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 1–20, 2021.

YOSHIKAWA, T. *et al.* Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) Coronavirus-Induced Lung Epithelial Cytokines Exacerbate SARS Pathogenesis by Modulating Intrinsic Functions of Monocyte-Derived Macrophages and Dendritic Cells. **Journal of Virology**, [s. l.], v. 83, n. 7, p. 3039–3048, 2009.

YUKI, K.; FUJIOGI, M.; KOUTSOGIANNAKI, S. COVID-19 pathophysiology: A review. **Clinical Immunology**, [s. l.], v. 215, n. April, 2020.

ZHANG, P. *et al.* Oxidative stress and diabetes: antioxidative strategies. **Frontiers of Medicine**, [s. l.], v. 14, n. 5, p. 583–600, 2020.

ZHANG, W. *et al.* The use of anti-inflammatory drugs in the treatment of people with severe coronavirus disease 2019 (COVID-19): The experience of clinical immunologists from China. **Clinical Immunology**, [s. l.], v. 214, n. March, p. 108393, 2020.

ZHENG, M. *et al.* Functional exhaustion of antiviral lymphocytes in COVID-19 patients. **Cellular and Molecular Immunology**, [s. l.], v. 17, n. 5, p. 533–535, 2020.

ZHOU, P. *et al.* A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. **Nature**, [s. l.], v. 579, n. 7798, p. 270–273, 2020.

ZHOU, F. *et al.* Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. **The Lancet**, [s. l.], v. 395, n. 10229, p. 1054–1062, 2020.

ZHOU, R. *et al.* Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation. **Nature Immunology**, [s. l.], v. 11, n. 2, p. 136–140, 2010.

## ANEXOS

## ANEXO I – ARTIGO PUBLICADO EM BIOMOLECULES



Article

## Elevated Extracellular HSP72 and Blunted Heat Shock Response in Severe COVID-19 Patients

Mariana Kras Borges Russo <sup>1,†</sup>, Lucas Stahlhöfer Kowalewski <sup>1,†</sup>, Gabriella Richter da Natividade <sup>2,3</sup>, Carlos Henrique de Lemos Muller <sup>1</sup>, Helena Trevisan Schroeder <sup>1</sup>, Patrícia Martins Bock <sup>4,5</sup>, Layane Ramos Ayres <sup>1</sup>, Bernardo Urbano Cardoso <sup>1</sup>, Caroline Zanotto <sup>2,3</sup>, Julia Tsao Schein <sup>2</sup>, Tatiana Helena Rech <sup>6</sup>, Daisy Crispim <sup>2,3</sup>, Luis Henrique Canani <sup>2,3</sup>, Rogério Friedman <sup>2,3</sup>, Cristiane Bauermann Leitão <sup>2,3</sup>, Fernando Gerchman <sup>2,3</sup> and Mauricio Krause <sup>1,\*</sup>

- <sup>1</sup> Laboratory of Inflammation, Metabolism and Exercise Research (LAPIMEX) and Laboratory of Cellular Physiology, Department of Physiology, Institute of Basic Health Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre 91509-900, RS, Brazil
  - <sup>2</sup> Endocrine and Metabolic Unit, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Post-Graduate Program in Medical Sciences: Endocrinology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre 91509-900, RS, Brazil
  - <sup>3</sup> Post-Graduate Program in Medical Sciences: Endocrinology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre 91509-900, RS, Brazil
  - <sup>4</sup> Faculdades Integradas de Taquara, Taquara 95612-150, RS, Brazil
  - <sup>5</sup> Department of Pharmacology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre 91509-900, RS, Brazil
  - <sup>6</sup> Intensive Care Unit, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre 90035-903, RS, Brazil
- \* Correspondence: mauricio.krause@ufrgs.br; Tel.: +55-(51)-33082065  
 † These authors contributed equally to this work.



**Citation:** Borges Russo, M.K.; Kowalewski, L.S.; da Natividade, G.R.; de Lemos Muller, C.H.; Schroeder, H.T.; Bock, P.M.; Ayres, L.R.; Cardoso, B.U.; Zanotto, C.; Schein, J.T.; et al. Elevated Extracellular HSP72 and Blunted Heat Shock Response in Severe COVID-19 Patients. *Biomolecules* **2022**, *12*, 1374. <https://doi.org/10.3390/biom12101374>

Academic Editors: Kenia Pedrosa Nunes, Amanda Almeida De Oliveira and Christostomos Prodromou

Received: 24 August 2022  
 Accepted: 22 September 2022  
 Published: 26 September 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** Aims: We hypothesized that critically ill patients with SARS-CoV-2 infection and insulin resistance would present a reduced Heat Shock Response (HSR), which is a pathway involved in proteostasis and anti-inflammation, subsequently leading to worse outcomes and higher inflammation. In this work we aimed: (i) to measure the concentration of extracellular HSP72 (eHSP72) in patients with severe COVID-19 and in comparison with noninfected patients; (ii) to compare the HSR between critically ill patients with COVID-19 (with and without diabetes); and (iii) to compare the HSR in these patients with noninfected individuals. Methods: Sixty critically ill adults with acute respiratory failure with SARS-CoV-2, with or without diabetes, were selected. Noninfected subjects were included for comparison (healthy,  $n = 19$  and patients with diabetes,  $n = 22$ ). Blood samples were collected to measure metabolism (glucose and HbA1c); oxidative stress (lypoperoxidation and carbonyls); cytokine profile (IL-10 and TNF); eHSP72; and the HSR (in vitro). Results: Patients with severe COVID-19 presented higher plasma eHSP72 compared with healthy individuals and noninfected patients with diabetes. Despite the high level of plasma cytokines, no differences were found between critically ill patients with COVID-19 with or without diabetes. Critically ill patients, when compared to noninfected, presented a blunted HSR. Oxidative stress markers followed the same pattern. No differences in the HSR (extracellular/intracellular level) were found between critically ill patients, with or without diabetes. Conclusions: We demonstrated that patients with severe COVID-19 have elevated plasma eHSP72 and that their HSR is blunted, regardless of the presence of diabetes. These results might explain the uncontrolled inflammation and also provide insights on the increased risk in developing type 2 diabetes after SARS-CoV-2 infection.

**Keywords:** SARS-CoV-2; inflammation; heat shock response; HSP72; metabolic diseases; critically ill patients

### 1. Introduction

COVID-19 (coronavirus disease 2019) ranges in severity from asymptomatic to acute respiratory distress syndrome (ARDS). The latter requires intensive care admission and mechanical ventilation and is consequently associated with a high mortality rate [1–4].



Critically ill patients with SARS-CoV-2 infection present a hypercoagulability state along with a syndrome called “cytokine storm” (as represented by the high pro-inflammatory state) [5]. Cytokine storm is a term applied to maladaptive cytokine release in response to viral infection, leading to elevated systemic levels of cytokines and chemokines, including: interleukin 1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ); tumor necrosis factor alpha (TNF); interleukin 7 (IL-7); vascular endothelial growth factor (VEGF); interleukin 8 (IL-8); interferon gamma (IFN- $\gamma$ ); interleukin 9 (IL-9); interleukin 10 (IL-10); monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1); and others [6]. The elevated levels of these pro-inflammatory cytokines play a significant role in the morbidity and mortality of SARS-CoV-2 infections [6]. At the center of this storm is the nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- $\kappa$ B), which controls the expression of several proinflammatory proteins. In fact, in critically ill patients with COVID-19, the NF- $\kappa$ B signaling pathway is upregulated [7]. In general, the inhibition of the NF- $\kappa$ B signaling pathway may be mandatory for the proper resolution of inflammation in SARS-CoV-2-infected patients.

Resolution of inflammation can be reached through the activation of the heat shock transcription factor-1 (HSF1), thereby initiating a very conserved transcriptional program called the Heat Shock Response (HSR) [8]. Infection-induced elevation on the body temperature (fever) is a known inductor of the HSF-1 activation. The activation of the HSR induces the expression of Heat Shock Proteins (HSP), particularly the 70 kDa family (HSP70, and its inducible form HSP72), a protein with anti-inflammatory and cytoprotective properties [9,10].

The HSR (represented by HSP72 expression and release) is essential to protect the cells against a wide range of nonlethal stresses, such as oxidative stress, hyperthermia, exertional stress, exercise, ischemia, and metabolic stress [11]. HSP72 is mandatory to maintain cellular proteostasis by acting as a classical molecular chaperone [12]. In addition to its key role in the maintenance of proteostasis, HSP72 exerts a potent anti-inflammatory effect [13]. HSP72 can interact with the complex formed by NF- $\kappa$ B and its inhibitor (I $\kappa$ B), impeding NF- $\kappa$ B translocation to the nucleus, and thus decreasing its activity [14]. A detailed description of the HSR is available elsewhere [15]. Interestingly, the obesity-related chronic inflammatory state shows a depressed HSR, and the mechanisms for such findings are related to insulin resistance [16–19]. Thus, in SARS-CoV-2-infected people with some degree of insulin resistance, the lower HSR may partially explain the hyper-inflammatory state and the worse prognosis (when in comparison with insulin-sensitive infected subjects). This abnormal response might be even more pronounced in subjects with established type 2 diabetes.

The extracellular HSP72, opposite to its action in the intracellular environment, activates several proinflammatory responses. eHSP72 has been reported to stimulate neutrophil microbicidal capacity [20] and chemotaxis [21], recruitment of NK (natural killer) cells [22], as well as cytokine release from various immune cells [23,24]. In the extracellular compartment, this protein binds to cell-surface receptors known as the Toll-like receptor (TLR 2 until 4) [25]. This interaction can lead to the activation of proinflammatory signaling proteins such as MyD88 and TIRAP (which activate IKK, p38, JNK, and ultimately NF- $\kappa$ B), and induce changes in gene expression [26].

We have hypothesized (when determining worse outcomes) that critically ill patients with both SARS-CoV2 infection and insulin resistance would present a blunted HSR and, consequently, a higher level of inflammation [15]. In this work, we aimed: (i) to measure the basal concentration of extracellular HSP72 (eHSP72) in critically ill patients with severe COVID-19 pneumonia to compare with noninfected individuals, (ii) to compare the HSR (in vitro) between critically ill severe COVID-19 pneumonia patients with and without type 2 diabetes, and (iii) to compare HSR in these patients with noninfected individuals.

## 2. Methods and Materials

### 2.1. Study Design and Participants

This study protocol was approved by the Ethics Committee of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (CAAE 32962620600005327 and FIPE-HCPA 2020-0218). The study procedures were conducted according to the Declaration of Helsinki, and the informed consent was obtained from the patient's legal representatives.

This is a prospective cohort study. Patients with acute respiratory failure admitted to the intensive care unit (ICU) of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Porto Alegre, Brazil) were prospectively included after screening from November 2020 to August 2021. Patients were eligible if they had laboratory-confirmed SARS-CoV-2 infection that was determined via reverse transcriptase–polymerase-chain reaction (RT-PCR) assay from either nasal or pharyngeal swabs. Inclusion criteria were determined via ICU admission that was less than 48 h, orotracheal intubation and mechanical ventilation (MV) within the first 48 h of ICU admission, and age  $\geq 18$  years. The exclusion criteria were chronic kidney disease on dialysis; cirrhosis Child–Pugh B or C; chronic corticosteroid use; hypercortisolism; adrenal insufficiency; solid organ transplantation; gastric surgery or small bowel resection (including bariatric surgery); decreased intestinal absorption; life expectancy less than 24 h; pregnancy or breastfeeding; and participation of interventions groups from other studies.

In order to compare the obtained results from critically ill patients with severe COVID-19 pneumonia with noninfected subjects, we used the data and stored frozen samples from previous studies [17,27,28]. These samples were obtained from healthy individuals (here named noninfected control group,  $n = 19$ ) and individuals with type 2 diabetes (noninfected with diabetes,  $n = 22$ ). All data analyses were performed using the same methodology.

### 2.2. Procedures and Biochemistry Measurements

All consecutive patients over 18 years of age admitted to the ICU with a confirmed SARS-CoV-2 RT-PCR test and submitted to MV within the first 48 h of ICU admission were eligible for study entry.

Blood samples were collected until 72 h of ICU admission. The baseline characteristics such as age, gender, comorbidities, and medications were collected from electronic medical records and from the patient's family when needed. Diabetes was defined based on previous diagnosis, current use of anti-hyperglycemic medications, or an admission glycated hemoglobin (A1C) value  $\geq 6.5\%$  (48 mmol/mol).

Blood samples were obtained from central catheters and stored in heparin-coated and gel-clotted Vacutainer™ tubes using standard aseptic techniques. Samples were immediately centrifuged (at 4 °C and  $1000 \times g$  for 15 min), after which plasma and serum were removed and stored at  $-80$  °C for further analysis. Plasma glycemia levels were measured in an automated system Cobas C111 (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). HbA1c was measured by HPLC (Variant II Turbo) and expressed as a % of total hemoglobin for HbA1c.

### 2.3. Plasma Cytokine Quantification

Blood samples were collected in EDTA tubes and centrifuged immediately at 4 °C and  $1000 \times g$  for 15 min. The separated plasma was stored at  $-80$  °C until analysis. Plasma values of TNF and IL-10 were assessed by magnetic bead assay using the Human Magnetic Custom Luminex® Kit (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) and the Luminex® 200™ magnetic bead plate reader (Luminex, Austin, TX, USA) following the manufacturers' instructions.

A standard curve was generated by serial dilutions of the reconstituted standard. Samples and standards were incubated with mixed beads overnight at room temperature on an orbital shaker. Beads were washed and then incubated with the detection antibodies at room temperature for 1 h and with streptavidin for 30 min. Beads were washed and resuspended, and the plate was subsequently analyzed on the Luminex® 200™ reader. The results were plotted as a function of fluorescence intensity. Mean fluorescence intensity



(MFI) takes into account the number of fluorescent pixels within the scanned area. MFI values below the detection limit were assumed to be missing values. MFI was then converted to picograms (pg)/mL based on the standard curve. All samples were analyzed in duplicate.

#### 2.4. Oxidative Damage

Thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) were used to determine lipid peroxidation. Briefly, samples were first centrifuged at  $12,000 \times g$  at  $4^\circ\text{C}$  for 10 min, then 250  $\mu\text{L}$  of the sample, 10  $\mu\text{L}$  of 4.5 mM butylated Hydroxytoluene (BHT), and 200  $\mu\text{L}$  of 30% trichloroacetic acid (TCA) were added to 1.5 mL Eppendorf tubes. These were subsequently placed in a boiling water bath ( $100^\circ\text{C}$ ) for 15 min, and centrifuged at  $15,000 \times g$  at room temperature for 2 min. Next, 400  $\mu\text{L}$  of supernatant and 400  $\mu\text{L}$  of 0.23% thiobarbituric acid (TBA) were pipetted into the cryotubes and boiled in a  $100^\circ\text{C}$  water bath for 30 min. The samples were cooled down for 5 min and pipetted in duplicates of 200  $\mu\text{L}$  into a 96-well plate. TBARS was then determined in a microplate reader at 540 nm (Multiskan Go, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) [29]. Carbonyl assay was used to determine oxidative damage to proteins and the absorbance was read at 360 nm (Multiskan Go, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) [30].

#### 2.5. Heat Shock Response Test

Considering the importance of the HSR for stress adaptation, we tested the capacity of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) (a major source of circulating HSP72 and representative of the immune cell stress response), to release HSP72, under heat stress conditions (a normal and expected response in healthy cells). Briefly (accordingly with the protocol [19]), after harvesting, the whole blood was immediately incubated at two different temperatures:  $37^\circ\text{C}$  (control) and  $42^\circ\text{C}$  (heat stressed) for 2 h in a water bath (with a gentle mix every 15 min). After incubation, the total blood was centrifuged to isolate plasma/serum and the PBMCs through a density gradient separation, as previously described [31]. Then, plasma was used for the direct analysis of extracellular HSP72, while PBMCs were prepared for the measurement of iHSP72. The PBMCs were washed and treated to ensure the absence of erythrocytes. PBMCs were then resuspended in an RPMI 1640 medium (pH 7.4 supplemented with 2%  $\text{NaHCO}_3$ , 10% bovine calf serum, 100 U/mL penicillin and 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  streptomycin); seeded in a 24-well flat-bottom plate ( $1 \times 10^6$  cells/well); and placed in an incubator for 6 h ( $37^\circ\text{C}$  in a 5%  $\text{CO}_2$ ) in order to recover from the HS and reach the peak of HSP70 expression [19]. Cells were then removed from the incubator, lysed, and the total content of proteins was prepared for Western blotting analysis [19]. The difference between the concentration at  $37^\circ\text{C}$  and  $42^\circ\text{C}$  is used as an HSR index [19]. This test was applied previously, in several different conditions and diseases [17,32].

#### 2.6. Extracellular HSP72 Quantification

A highly sensitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method (EKS-715, Stressgen, Victoria, BC, Canada) was used to quantify the levels of plasma HSP72 protein as previously described [33]. Absorbance was measured at 450 nm and a standard curve was constructed from known dilutions of HSP72 protein to allow quantitative assessment of HSP72 concentration. Quantifications were made using a microplate reader (Multiskan Go, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA).

#### 2.7. Protein Quantification and Western Blotting for Intracellular HSP70 Immunoccontent

Cellular protein quantification was determined using a BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), and samples (1  $\mu\text{g}$ ) were mixed with  $5 \times$  Laemmli loading buffer [50 mM Tris, 10% SDS, 10% glycerol, 10% 2-mercaptoethanol, and 2 mg/mL bromophenol blue] at a final concentration of 1:5, boiled for 5 min, and then electrophoresed [32]. For sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), equivalent

amounts of protein (1 µg) were applied in a 10% polyacrylamide minigel for 2 h at 100V [32]. Proteins were then transferred onto nitrocellulose membranes (GE Healthcare, Chicago, IL, USA) according to the manufacturer's instructions (Bio-Rad, Hercules, FL, USA) (2 h, 100 V) [32]. For immunoblotting, membranes were blocked in 2% BSA in a wash buffer [50 mM Tris, 5 mM EDTA, 150 mM NaCl (TEN)-Tween 20 0.1% solution, pH 7.4] for 30 min and then incubated overnight at a 1:1.000 dilution with monoclonal Anti-HSP70 antibodies that were produced from mice (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) [32]. After appropriate washing, the membranes were probed with anti-mouse IgG and biotin antibodies at a 1:10.000 dilution (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) for 1h. Membranes were then incubated with a final Streptavidin–Peroxidase Polymer, Ultrasensitive (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), at a 1:1.000 dilution for 1 h. Visualization of the blots was performed using the chemiluminescence reagent, p-coumaric acid, and luminol in an ImageQuant™ LAS 4000 chemiluminescence system (GE Healthcare, Chicago, IL, USA), and quantified using ImageJ (version 1.51f; NIH, Maryland City, MD, USA) [32]. A standard molecular weight marker (RPN 800, Rainbow Full Range Bio-Rad, CA, USA) was used as a reference to determine the molecular weights of the bands. The data were then normalized using GAPDH expression.

### 2.8. Statistical Analysis and Sample Size

Categorical variables were expressed as percentages. Data were expressed as mean ± standard deviation (SD) or median [P25–P75], depending on variable distribution. Groups were compared using one-way analysis of variance with the Bonferroni post hoc test, the Kruskal–Wallis test, or chi-square test, as appropriate. Values were considered statistically significant if  $p < 0.05$ . Statistical analyses were performed using SPSS, version 23.0 (Armonk, NY, USA). Further, Spearman's rank order correlation coefficient ( $r$ ) was used to determine correlations between extracellular HSP72 HSR and other variables. For all analyses, statistical significance was accepted for  $p < 0.05$ . Our samples were collected from a smaller group of patients selected from a major study. The sample size was calculated to be 420 patients using an EnvStats package, version 2.3.1, R software, to detect a difference in mortality between groups (controls vs. people with diabetes)—with a power of 80% and an  $\alpha$ -error of 5%—and considering 10% to be missing due to dosage errors [34]. From this population, we collected blood samples from 60 consecutive patients.

## 3. Results

### 3.1. Patient Characteristics and Cytokine Profile in Critically Ill Patients with Severe COVID-19 Pneumonia

The baseline characteristics of critically ill patients with severe COVID-19 pneumonia are described in Table 1. No significant differences were found for age, weight, and body mass index (BMI) between the critically ill patients (with vs. without type 2 diabetes). As expected, glycaemia and HbA1C were higher in patients with diabetes. No statistical differences were observed between the groups for TNF (26.6 [9.36–32.39] vs. 17.7 [12.77–27.41] pg/mL), IL-10 (2.86 [1.42–4.57] vs. 2.0 [1.42–6.87] pg/mL), or TNF/IL-10 (6.85 [3.35–13.28] vs. 5.06 [2.38–10.43]).

### 3.2. Plasma Extracellular HSP72 Concentration in Critically Ill Patients with COVID-19

As depicted in Figure 1, no differences between critically ill patients with COVID-19 were found for eHSP72 ( $0.453 \pm 0.202$  vs.  $0.547 \pm 0.253$  ng/mL). Interestingly, we detected a positive correlation between plasma eHSP72 and HbA1C ( $r = 0.394$ ,  $p = 0.0042$ ) in critically ill patients with COVID-19.

### 3.3. Comparison of Plasma HSP72 among Different Groups: Noninfected Control Subjects, Noninfected Subjects with Diabetes and Critically Ill Patients with COVID-19 Pneumonia

Since we were expecting much higher levels of eHSP72 in critically ill patients with COVID-19, and as there are no available data in the literature, we decided to compare the results of eHSP72 in critically ill patients with other groups of patients from previous

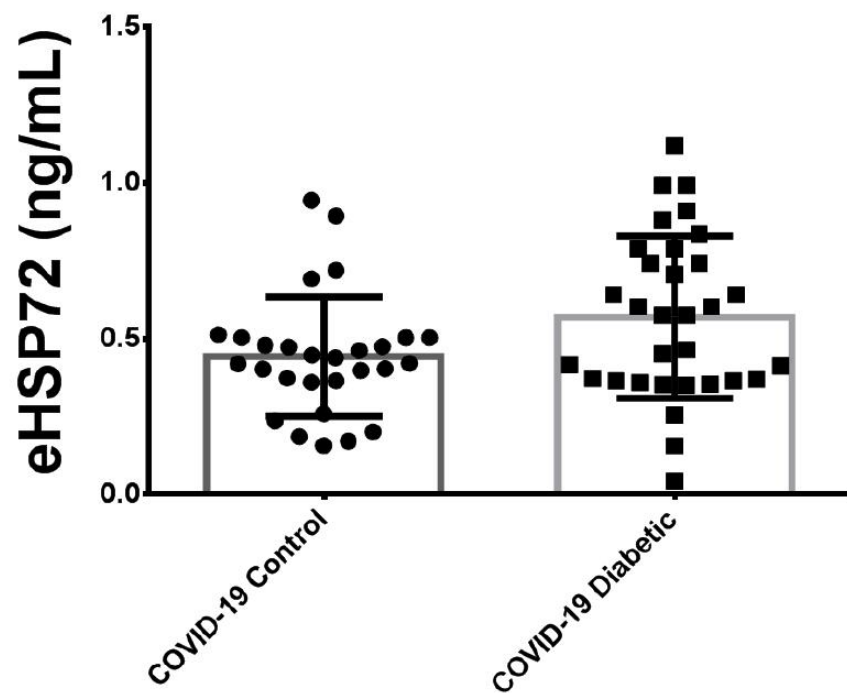


studies, including: noninfected healthy controls ( $n = 19$ ) and noninfected subjects with diabetes ( $n = 22$ ). For this comparison among the three groups, we analyzed all critically ill patients together, both those with and without diabetes (Figure 2).

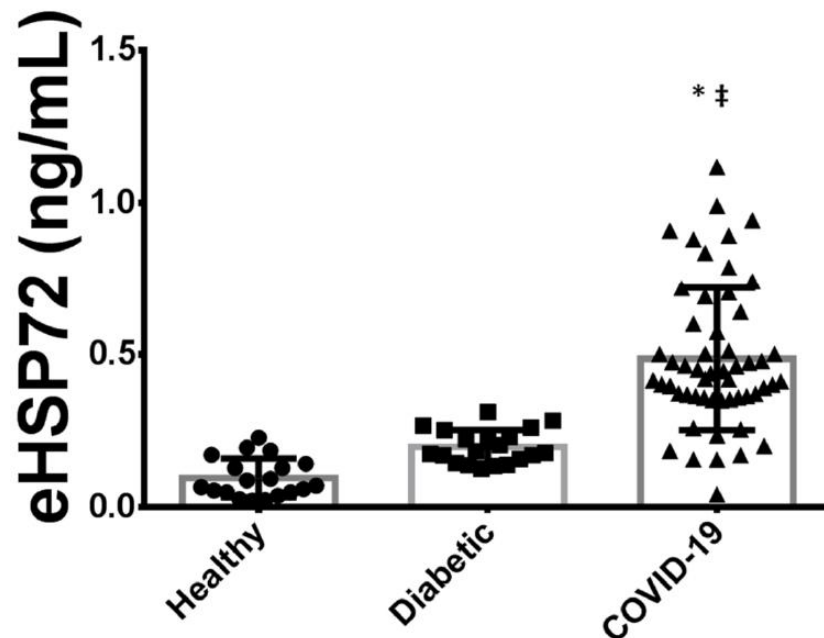
**Table 1.** Subjects' characteristics, biochemistry, and cytokine profile.

| Patient Characteristic         | Critically Ill Infected COVID-19: | Critically Ill Infected COVID-19: | <i>p</i> Value |
|--------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|----------------|
|                                | Control<br>( $n = 27$ )           | Diabetics<br>( $n = 32$ )         |                |
| Sex (M/F)                      | (13/14)                           | (18/14)                           |                |
| Age (years)                    | $58.2 \pm 13.5$                   | $63.5 \pm 11.2$                   | $p = 0.522$    |
| Body Mass (kg)                 | $90.8 \pm 18.42$                  | $89.3 \pm 20$                     | $p = 0.762$    |
| BMI ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ) | $33 \pm 6.7$                      | $33.6 \pm 7.9$                    | $p = 0.631$    |
| Glycemia (mg/dL)               | $171 \pm 48$                      | $235 \pm 79$ #                    | $p = 0.006$    |
| HbA1C (%)                      | $5.9 \pm 0.5$                     | $8.9 \pm 2.2$ #                   | $p < 0.0001$   |
| TNF- $\alpha$ (pg/mL)          | $26.6 [9.36\text{--}32.39]$       | $17.7 [12.77\text{--}27.41]$      | $p = 0.532$    |
| IL-10 (pg/mL)                  | $2.86 [1.42\text{--}4.57]$        | $2.0 [1.42\text{--}6.87]$         | $p = 0.682$    |
| TNF- $\alpha$ /IL-10           | $6.85 [3.35\text{--}13.28]$       | $5.06 [2.38\text{--}10.43]$       | $p = 0.405$    |

# When different from Critically Ill Infected SARS-CoV2: Control. Data expressed as absolute number, mean  $\pm$  SD or median [P25-75].



**Figure 1.** Comparison of plasma concentration of eHSP72 between critically ill patients with COVID-19 pneumonia with and without diabetes.



**Figure 2.** Comparison of plasma concentration of eHSP72 between critically ill patients with COVID-19 pneumonia, noninfected healthy subjects and noninfected patients with diabetes. \* When different from noninfected controls (healthy). ‡ When different from noninfected patients with diabetes  $p < 0.05$ . Data expressed as mean  $\pm$  SD.

Critically ill patients with COVID-19 pneumonia presented higher plasma concentrations of eHSP72 ( $0.486 \pm 0.23$  ng/mL) when compared with noninfected healthy controls ( $0.096 \pm 0.06$  ng/mL) and noninfected subjects with diabetes ( $0.198 \pm 0.05$  ng/mL).

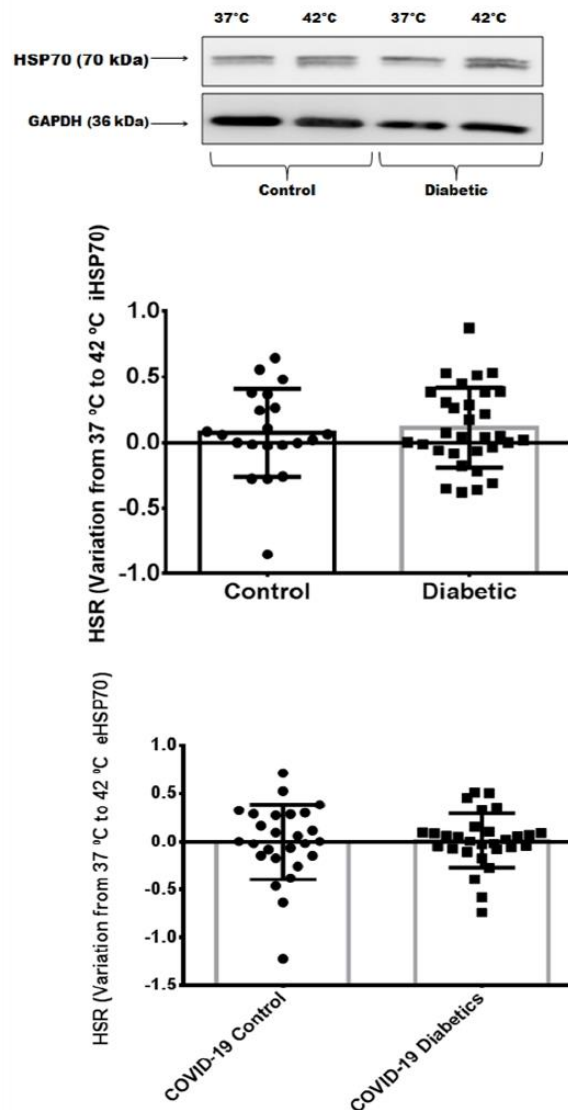
### 3.4. Heat Shock Response in Critically Ill Patients with Severe COVID-19 Pneumonia

As shown in Figure 3, no differences in the HSR were found between critically ill patients with COVID-19 with or without diabetes. To confirm that both the exocytosis and intracellular content of HSP72 were reduced, we analyzed the immunoccontent of HSP72 from the PBMCs. As depicted in Figure 3, intracellular quantification confirmed the reduced expression of iHSP72. A possible inverse correlation between intracellular HSR and the inflammatory index (TNF- $\alpha$ /IL-10) ( $r = -0.284$ ) may be present, despite not being statistically significant ( $p = 0.058$ ).

### 3.5. Comparison of Heat Shock Response between Different Groups: Noninfected Control Subjects, Noninfected Subjects with Controlled Diabetes, and Critically Ill Patients with Severe COVID-19 Pneumonia

To compare the HSR with other groups, we analyzed blood from noninfected patients: the healthy control group and the noninfected subjects with diabetes. In a different approach from the baseline blood eHSP72 group, we included all groups that we performed the HSR test on: noninfected controls, noninfected subjects with diabetes, critically ill patients with COVID-19 without diabetes, and critically ill patients with COVID-19 with diabetes. Table 2 shows the patient group characteristics. Notably, infected patients even without a previous diagnosis of diabetes and HbA1c  $< 6.5\%$  presented significant hyperglycemia, most likely due to stress hyperglycemia ( $> 140$  mg/mL). In line with this, infected patients with diabetes also had higher serum glucose values when compared to noninfected subjects with diabetes. Interestingly, obesity was highly prevalent in critically ill patients with COVID-19, regardless of the presence of diabetes, as demonstrated by the higher BMI

observed than usually seen in the critically ill population (Table 2). This may indicate the presence of insulin resistance and may also explain the hyperglycemia and the levels of HbA1c within this group.



**Figure 3.** Comparison of Heat Shock Response (intracellular) between critically ill patients with COVID-19 pneumonia with and without diabetes. Briefly, the collected blood was immediately incubated (whole blood) at two different temperatures: 37 °C (control) and 42 °C (heat stressed) for 2 h in a water bath. After the incubation, the PBMC were resuspended in an RPMI 1640 medium (pH 7.4 supplemented with 2% NaHCO<sub>3</sub>, 10% bovine calf serum, 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin), seeded in a 24-well flat-bottom plate ( $1 \times 10^6$  cells/well), and placed in an incubator for 6 h (37 °C in a 5% CO<sub>2</sub>) in order to recover from the HS and reach the peak of HSP70 expression. Cells were then removed from the incubator, appropriately lysed and the total content of proteins was then prepared for Western blotting analysis. Plasma was collected and used for HSP72 measurements. The difference between concentration at 37 °C and 42 °C is used as the HSR index. A representative image was used to show the immunocontent of iHSP72. Data expressed as mean  $\pm$  SD.

Table 2. Subjects' characteristics and general biochemistry: All groups.

| Patient Characteristic   | Noninfected Control<br>(n = 19) | Noninfected Diabetics<br>(n = 22) | Critically Ill Infected<br>COVID-19: Control<br>(n = 27) | Critically Ill Infected<br>COVID-19: Diabetics<br>(n = 32) |
|--------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|--|--|
| Age (years)              | 54.5 ± 8.3                      | 68.9 ± 7.8                        | 58.2 ± 13.5  | 63.5 ± 11.2  |
| Body Mass (kg)           | 68.1 ± 9.3                      | 79.12 ± 10.8                      | 90.8 ± 18.42 *   | 89.3 ± 20 *  |
| Height (m)               | 1.63 ± 0.08                     | 1.66 ± 0.8                        | 1.66 ± 0.1   | 1.67 ± 0.1   |
| BMI (kg/m <sup>2</sup> ) | 25.6 ± 2.5                      | 28.7 ± 3.1                        | 33 ± 6.7 *   | 33.6 ± 7.9 *   |
| Glycaemia (mg/dL)        | 102.5 ± 12.4                    | 133.1 ± 21.4                      | 171.1 ± 48.38 *‡   | 235.7 ± 79.4 *‡#   |
| HbA1C (%)                | -                               | 6.75 ± 0.6                        | 5.94 ± 0.51  | 8.9 ± 2.2 ‡#   |

\* Different from noninfected controls. ‡ When different from noninfected diabetics. # When different from critically ill, infected COVID-19: Control. Data expressed as absolute number or mean ± SD.

Figure 4 depicts the comparison between noninfected healthy controls, noninfected subjects with diabetes, and critically ill patients with COVID-19 pneumonia (with or without diabetes). As previously compared, patients without diabetes have a preserved HSR [18]. However, in the presence of COVID-19 infection, particularly in critically ill patients, the HSR is blunted even in the absence of diabetes. Thus, a similarly disrupted HSR can be found in noninfected subjects with diabetes and in critically ill patients with COVID-19. Regarding markers of oxidative damage (lipids and proteins) our results have shown that, compared to healthy people, infected subjects present higher levels of damage (Figure 5). However, following the same pattern of the HSR, no differences exist between infected controls and diabetics.

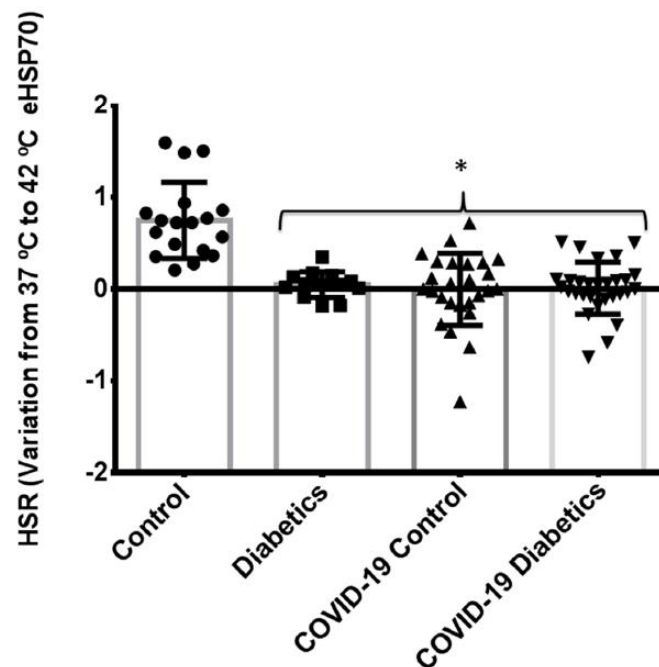
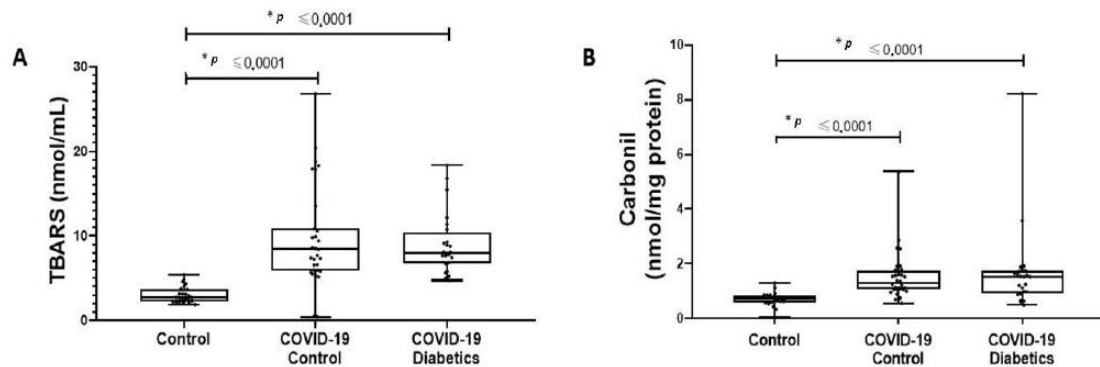


Figure 4. Comparison of the Heat Shock Response between critically ill patients with COVID-19 pneumonia with and without diabetes, noninfected healthy subjects, and noninfected patients with diabetes. Briefly, the collected blood, was immediately incubated (i.e., the whole blood) at two different temperatures: 37 °C (control) and 42 °C (heat stressed) for 2 h in a water bath. After the incubation, plasma was collected and used for HSP72 measurements. The difference between concentration at 37 °C and 42 °C is used as the HSR index. \* When different from noninfected healthy subjects.  $p < 0.05$ . Data expressed as mean ± SD.





**Figure 5.** Comparison of lipid (A) and protein (B) oxidative damage between critically ill patients with COVID-19 pneumonia with and without diabetes, noninfected healthy subjects. \* When different from noninfected healthy subjects.  $p < 0.05$ . Data expressed as mean  $\pm$  SD.

#### 4. Discussion

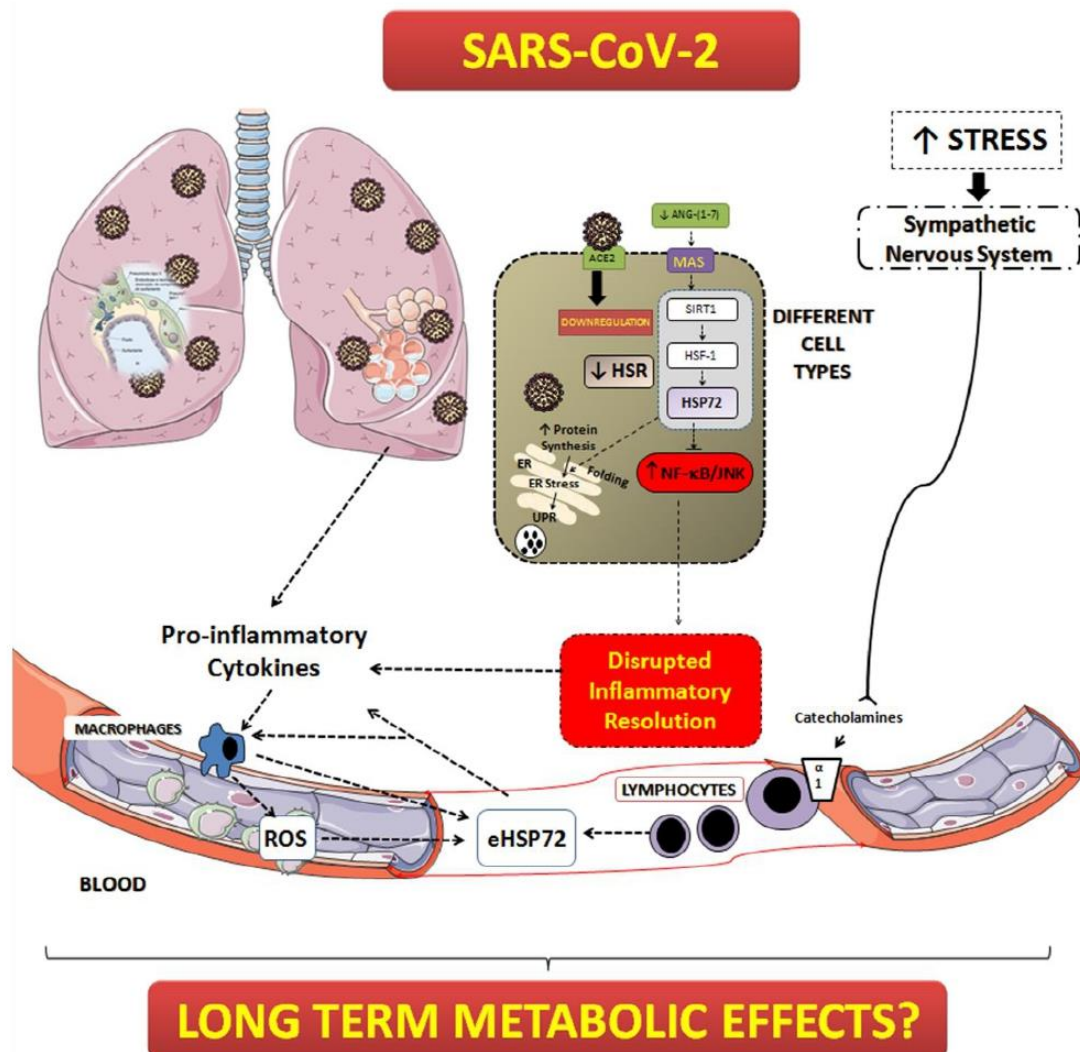
This is the first study that measured the basal concentration of blood HSP72 and the HSR status in critically ill patients with severe COVID-19 pneumonia, with and without diabetes. The main findings of this study are: (1) the concentration of plasma eHSP72 is high in critically ill patients with COVID-19 pneumonia and (2) the HSR is blunted in critically ill patients with severe COVID-19 pneumonia when compared to healthy patients without COVID-19, regardless of their glycaemic status.

In conditions where chronic inflammation and oxidative stress occur, such as in patients with type 1 diabetes (T1DM) [35] and type 2 diabetes (T2DM), higher levels of eHSP72 are also present [36]. In fact, serum eHSP72 concentration is positively correlated with markers of inflammation in humans, such as C-reactive protein, monocyte count, and TNF- $\alpha$  [37,38]. However, in this sample of critically ill patients, the presence of diabetes did not influence the eHSP72 levels. These results indicate that, apparently, metabolic disease does not seem to influence the HSR when the patient is severely ill. As the blunted HSR is similar in critically ill patients with COVID-19 (with or without diabetes) and noninfected patients with diabetes, we may state that diabetes induces similar responses in terms of HSP72 and the HSR systems that severe COVID-19 (by different mechanisms) induces. In the same vein, in the past, diabetes was believed to be a cardiovascular equivalent [39]. Since the HSR is already significantly depressed in subjects with diabetes, no further decrease is observed in these patients when facing severe COVID-19.

Another complication related to the elevated levels of eHSP72 is insulin resistance [33]. The underlying mechanisms that may lead to insulin resistance could involve an eHSP70-mediated stimulation of the TLR2/4. Accordingly, the TLR2/4-dependent activation of JNKs promotes phosphorylation of IRS-1 at Ser307 in rodents (equivalent to Ser312 in humans), leading to the inhibition of Akt activation [40], to a reduced glucose uptake by sensitive tissues, and to a state of resistance to insulin action. Thus, higher blood eHSP72 levels in patients with COVID-19 might contribute to the insulin resistance and stress hyperglycemia commonly present in these patients (Table 2), which may lead to negative outcomes. In addition, there is also a possible deleterious effect of elevated eHSP72 on pancreatic beta cells. Previous studies have shown that chronic high eHSP72 exerts direct effects on clonal pancreatic human and rodent beta cells and islets, such as decreased beta cell and islet viability, insulin secretion, and mitochondrial function [33]. Taken together, the elevated eHSP72 concentration may be related to the long-term metabolic imbalance reported in the literature [41–43].

Regarding the HSR, our initial hypothesis was that critically ill patients with COVID-19 pneumonia with diabetes would have a lower response when compared to those critically

ill patients without diabetes, leading to better outcomes in the last group. However, we found that, in critically ill patients with COVID-19, the HSR is blunted regardless of the presence of diabetes, indicating that the virus may directly inhibit this pathway or, perhaps, use all chaperone machinery for its own cycle of replication (Figure 6).



**Figure 6.** Possible role of elevated plasma eHSP70 and a lower HSR in a SARS-CoV-2 infection. In several cells, infection caused by SARS-CoV-2 might lead to downregulation of ACE2. This would decrease the production of angiotensin (1–7) and the activation of the MAS receptor. MAS receptor activation induces anti-inflammatory responses and, in addition, by the activation of SIRT1, stimulates the HSR pathway [44]. Without this axis, the HSR is diminished and the inhibitory effect of intracellular HSP72 over NF-κB is absent, leading to a disrupted inflammatory resolution. The cytokine storm induces direct damage on cells/tissues and activates, along with the increased sympathetic tonus, the release of HSP72 to the extracellular environment (eHSP72) [45]. Extracellular HSP72 might reinforce the inflammatory system and induce activation of TLR (Toll-like receptors, particularly TLR4) in several cell types, including pancreatic beta cells and skeletal muscle [11]. The chronic activation of the TLRs by eHSP72 might reduce the capacity of the HSR activation, worsening the inflammatory response and altering metabolic status.



In different cell types, the higher demand for protein synthesis may lead to the unfolded protein response (UPR) and endoplasmic reticulum stress (ER stress) [13]. The UPR is triggered to avoid the formation of protein aggregates that cause cellular dysfunction. If the UPR is resolved through autophagy and the HS response, then cells can reach proteostasis again, otherwise, they undergo apoptosis [14]. HSP70 is mandatory to maintain proteostasis during high demand of protein synthesis, as it occurs in beta cells producing high insulin content [13]. Under normal conditions, when HSP72 expression is normal, the chaperone supply for the appropriate folding of newly synthesized proteins is sufficient. However, due to an inflammation-induced inability to express iHSP70, the UPR is induced, causing cell dysfunction, perpetuation of inflammation, and apoptosis [13]. Viral activities have a profound impact on ER function [46]. In particular, SARS-CoV hijacks the ER to process its structural and nonstructural proteins [47,48]. In fact, it was demonstrated, in vitro, that the induction of ER stress and the UPR by SARS-CoV is modulated through the S protein [47]. In that paper, using kidney epithelial cells, the authors have shown that the S protein modulated ER stress differentially by stimulating PKR-like ER kinase (PERK), but sparing the other two branches of the UPR signaling mediated through IRE-1 and ATF-6 (inositol-requiring enzyme 1 and activating transcription factor 6), respectively [47]. Thus, it is reasonable to speculate that SARS-CoV-2 overloads the ER to produce the necessary material for replication, leading to an increased use of chaperones (HSP72, for example), and finally causing the full depletion of this pathway. Our findings suggest HSP72 to be lower than expected, independent from the previous metabolic state. Without HSP72, cells would lose their proteostasis control and leave inflammatory factors, such as NF- $\kappa$ B, free to increase the inflammation in a positive forward feedback system. In fact, the lack of a proper HSR in critically ill patients with COVID-19 might explain, at least in part, the high levels of proinflammatory cytokines in our cohort, which was found to be without a difference between patients with or without diabetes. Despite not being statistically significant ( $p = 0.058$ ), we found a possible inverse correlation between an intracellular HSR and the inflammatory index (TNF- $\alpha$ /IL-10) ( $r = -0.284$ ).

The HSR is essential for the maintenance of proteostasis and the inflammatory status. Stress-activated HSF1 can provide a robust anti-inflammatory response through the induction of HSP72. However, a mandatory pathway to maintain a normal chaperone machinery (i.e., in the HSR) is through insulin signaling [11]. Hampered insulin signaling will lead to a deficient ability to induce the HSR in order to resolve inflammation (which is a mechanism associated with overactivity of the GSK-3 $\beta$  enzyme). Not surprisingly, obesity-related chronic inflammatory states show a depressed HSR [16–18]. Thus, a lower HSR in insulin-resistant individuals might be responsible for the exacerbated levels of inflammation and the comparatively worse prognosis observed in critically ill patients infected by SARS-CoV-2, perhaps as little is known regarding insulin signaling during critical illness [49]. In addition, infection caused by SARS-CoV-2 may lead to downregulation of ACE2. This would decrease the production of angiotensin-(1-7) and the activation of the MAS receptors. MAS receptor activation can induce anti-inflammatory responses and, through the activation of SIRT1, stimulate the HSR pathway [44]. Without this axis, the HSR is diminished and the inhibitory effect of intracellular HSP72 over NF- $\kappa$ B is absent, leading to a disrupted inflammatory resolution (Figure 6).

Considering the therapeutic potential that increasing the HSR may have on the inflammatory response in critically ill patients with severe COVID-19 pneumonia, we could suggest different strategies of treatment: (i) the rational use of antipyretic drugs (allowing mild elevation of body temperature by fever, without causing heat damage, but guaranteeing the increase in HSP72); (ii) artificially increasing the body temperature (using thermal blankets, for example (please refer to reference [45] to understand the beneficial effects of heat therapy); and (iii) the use of HSP72 activators such as BGP-15 [15]. The pharmacological inducer of HSP72 and BGP-15, has been shown to be safe and well tolerated in phase II clinical trials in patients with diabetes and insulin resistance [50,51]. In addition, the use of BGP-15 in animal models was found to induce metabolic benefits, as well as

reducing inflammatory signaling, and improving respiratory muscles during mechanical ventilation [52]. Nevertheless, the efficiency and safety of such therapies could be tested in this study population.

This study has limitations. First, despite the fact that our data show no difference in the HSR between critically ill patients with SARS-CoV-2 infection with or without diabetes, it is important to consider that most of our critically ill patients had obesity, with potentially high degrees of insulin resistance. For this reason, we need to look at the data with caution, since our study population without diabetes were not “metabolic healthy”. Second, the lack of information regarding the HSR in noncritically ill patients with COVID-19 prevents us from testing if the previous level of the HSR would determine the evolution of the disease and the need for ICU admission. Finally, low sample size, inability to stratify data by sex, and the inability to account for previous medications were also a limitation in this work. Additional information regarding patients medications and full data can be found at supplementary material (Figure S1 and Table S1).

## 5. Conclusions

Despite the limitations of this study, we demonstrated that critically ill patients with severe COVID-19 pneumonia present elevated concentrations of plasma eHSP72. In addition, the HSR, a vital pathway for proteostasis and anti-inflammation, is blunted. The consequences of these two abnormalities might explain, in part, the uncontrolled inflammation (cytokine storm) seen in these patients. Finally, the administration of HSR activators should be further investigated.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/biom12101374/s1>, Figure S1: eHSP72 with separate groups; Table S1: Patient Medication Profile.

**Author Contributions:** M.K., F.G., C.B.L., T.H.R., D.C., L.H.C. and R.F. conceptualized and designed the study. M.K.B.R., L.S.K., G.R.d.N., C.H.d.L.M., H.T.S., P.M.B., L.R.A., B.U.C., C.Z. and J.T.S. collected, processed and stored the biological samples. M.K., M.K.B.R., L.S.K., G.R.d.N., C.H.d.L.M. and H.T.S. analyzed the data. M.K. drafted the manuscript. L.S.K. performed the Western blotting. M.K., F.G., C.B.L., T.H.R., D.C., L.H.C. and R.F. provided overall direction to the project and revised the manuscript. All authors have agreed to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved. All persons designated as authors qualify for authorship, and all those who qualify for authorship are listed. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This work was supported by The Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq); grants #401610/2020-9 and COVID19 MCTI/MS/CNPq to C.B.L. and #425579/2018-2 to L.H.C. This work was partially supported by The State of Rio Grande do Sul Foundation for Research Support (FAPERGS; grant #30791.434.41354.23112017—CHAMADA FAPERGS/Dedit/SCTIE/MS/CNPq/SESRS n. 03/2017—PPSUS, to M.K.). Additional grants: PROEX CAPES and FIPE HCPA. M.K., L.H.C., and C.B.L. are recipients of scholarships from CNPq (PQ).

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** The data used to support the findings of this study are available from the corresponding authors upon request.

**Acknowledgments:** We thank the Hospital de Clínicas de Porto Alegre and the Department of Physiology of UFRGS for supporting this work.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.



## References

- Grasselli, G.; Zangrillo, A.; Zanella, A.; Antonelli, M.; Cabrini, L.; Castelli, A.; Cereda, D.; Coluccello, A.; Foti, G.; Fumagalli, R.; et al. Baseline Characteristics and Outcomes of 1591 Patients Infected With SARS-CoV-2 Admitted to ICUs of the Lombardy Region, Italy. *JAMA* **2020**, *323*, 1574–1581. [\[CrossRef\]](#)
- John, A.E.; Joseph, C.; Jenkins, G.; Tatler, A.L. COVID-19 and pulmonary fibrosis: A potential role for lung epithelial cells and fibroblasts. *Immunol. Rev.* **2021**, *302*, 228–240. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Qin, L.; Li, X.; Shi, J.; Yu, M.; Wang, K.; Tao, Y.; Zhou, Y.; Zhou, M.; Xu, S.; Wu, B.; et al. Gendered effects on inflammation reaction and outcome of COVID-19 patients in Wuhan. *J. Med. Virol.* **2020**, *92*, 2684–2692. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Zhou, F.; Yu, T.; Du, R.; Fan, G.; Liu, Y.; Liu, Z.; Xiang, J.; Wang, Y.; Song, B.; Gu, X.; et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: A retrospective cohort study. *Lancet* **2020**, *395*, 1054–1062. [\[CrossRef\]](#)
- Zhang, W.; Zhao, Y.; Zhang, F.; Wang, Q.; Li, T.; Liu, Z.; Wang, J.; Qin, Y.; Zhang, X.; Yan, X.; et al. The use of anti-inflammatory drugs in the treatment of people with severe coronavirus disease 2019 (COVID-19): The Perspectives of clinical immunologists from China. *Clin. Immunol.* **2020**, *214*, 108393. [\[CrossRef\]](#)
- Attiq, A.; Yao, L.J.; Afzal, S.; Khan, M.A. The triumvirate of NF-kappaB, inflammation and cytokine storm in COVID-19. *Int. Immunopharmacol.* **2021**, *101*, 108255. [\[CrossRef\]](#)
- Kandasamy, M. NF-kappaB signalling as a pharmacological target in COVID-19: Potential roles for IKKbeta inhibitors. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **2021**, *394*, 561–567. [\[CrossRef\]](#)
- Singh, I.S.; Hasday, J.D. Fever, hyperthermia and the heat shock response. *Int. J. Hyperth.* **2013**, *29*, 423–435. [\[CrossRef\]](#)
- de Thonel, A.; Le Mouel, A.; Mezger, V. Transcriptional regulation of small HSP-HSF1 and beyond. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2012**, *44*, 1593–1612. [\[CrossRef\]](#)
- Tang, S.; Buriro, R.; Liu, Z.; Zhang, M.; Ali, I.; Adam, A.; Hartung, J.; Bao, E. Localization and expression of Hsp27 and alphaB-crystallin in rat primary myocardial cells during heat stress in vitro. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e69066. [\[CrossRef\]](#)
- Krause, M.; Heck, T.G.; Bittencourt, A.; Scomazzon, S.P.; Newsholme, P.; Curi, R.; de Bittencourt, P.I.H., Jr. The chaperone balance hypothesis: The importance of the extracellular to intracellular HSP70 ratio to inflammation-driven type 2 diabetes, the effect of exercise, and the implications for clinical management. *Mediat. Inflamm.* **2015**, *2015*, 249205. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Madden, L.A.; Sandstrom, M.E.; Lovell, R.J.; McNaughton, L. Inducible heat shock protein 70 and its role in preconditioning and exercise. *Amino Acids* **2008**, *34*, 511–516. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Krause, M.; Bock, P.M.; Takahashi, H.K.; De Bittencourt, P.I.H., Jr.; Newsholme, P. The regulatory roles of NADPH oxidase, intra- and extra-cellular HSP70 in pancreatic islet function, dysfunction and diabetes. *Clin. Sci.* **2015**, *128*, 789–803. [\[CrossRef\]](#)
- Newsholme, P.; de Bittencourt, P.I., Jr. The fat cell senescence hypothesis: A mechanism responsible for abrogating the resolution of inflammation in chronic disease. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **2014**, *17*, 295–305. [\[CrossRef\]](#)
- Krause, M.; Gerchman, F.; Friedman, R. Coronavirus infection (SARS-CoV-2) in obesity and diabetes comorbidities: Is heat shock response determinant for the disease complications? *Diabetol. Metab. Syndr.* **2020**, *12*, 63. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Bruxel, M.A.; Tavares, A.M.V.; Zavarize Neto, L.D.; de Souza Borges, V.; Schroeder, H.T.; Bock, P.M.; Rodrigues, M.I.L.; Bello-Klein, A.; de Bittencourt, P.I.H., Jr. Chronic whole-body heat treatment relieves atherosclerotic lesions, cardiovascular and metabolic abnormalities, and enhances survival time restoring the anti-inflammatory and anti-senescent heat shock response in mice. *Biochimie* **2019**, *156*, 33–46. [\[CrossRef\]](#)
- de Lemos Muller, C.H.; Rech, A.; Botton, C.E.; Schroeder, H.T.; Bock, P.M.; Farinha, J.B.; Lopez, P.; Scholer, C.M.; Grigolo, G.B.; Coelho, J.; et al. Heat-induced extracellular HSP72 release is blunted in elderly diabetic people compared with healthy middle-aged and older adults, but it is partially restored by resistance training. *Exp. Gerontol.* **2018**, *111*, 180–187. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Di Naso, F.C.; Porto, R.R.; Fillmann, H.S.; Maggioni, L.; Padoin, A.V.; Ramos, R.J.; Mottin, C.C.; Bittencourt, A.; Marroni, N.A.; de Bittencourt, P.I., Jr. Obesity depresses the anti-inflammatory HSP70 pathway, contributing to NAFLD progression. *Obesity* **2015**, *23*, 120–129. [\[CrossRef\]](#)
- Muller, C.H.D.L.; de Matos, J.R.; Grigolo, G.B.; Schroeder, H.T.; Rodrigues-Krause, J.; Krause, M. Exercise Training for the Elderly: Inflammaging and the Central Role for HSP70. *J. Sci. Sport Exerc.* **2019**, *1*, 10–25.
- Ortega, E.; Hinchado, M.D.; Martin-Cordero, L.; Asea, A. The effect of stress-inducible extracellular Hsp72 on human neutrophil chemotaxis: A role during acute intense exercise. *Stress* **2009**, *12*, 240–249. [\[CrossRef\]](#)
- Ortega, E.; Giraldo, E.; Hinchado, M.D.; Martinez, M.; Ibanez, S.; Cidoncha, A.; Collazos, M.E.; Garcia, J.J. Role of Hsp72 and norepinephrine in the moderate exercise-induced stimulation of neutrophils' microbicide capacity. *Eur. J. Appl. Physiol.* **2006**, *98*, 250–255. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Horn, P.; Kalz, A.; Lim, C.L.; Pyne, D.; Saunders, P.; Mackinnon, L.; Peake, J.; Suzuki, K. Exercise-recruited NK cells display exercise-associated eHSP-70. *Exerc. Immunol. Rev.* **2007**, *13*, 100–111. [\[PubMed\]](#)
- Asea, A.; Kraeft, S.K.; Kurt-Jones, E.A.; Stevenson, M.A.; Chen, L.B.; Finberg, R.W.; Koo, G.C.; Calderwood, S.K. HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine. *Nat. Med.* **2000**, *6*, 435–442. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Johnson, J.D.; Fleshner, M. Releasing signals, secretory pathways, and immune function of endogenous extracellular heat shock protein 72. *J. Leukoc. Biol.* **2006**, *79*, 425–434. [\[CrossRef\]](#)



25. De Maio, A. Extracellular heat shock proteins, cellular export vesicles, and the Stress Observation System: A form of communication during injury, infection, and cell damage. It is never known how far a controversial finding will go! Dedicated to Ferruccio Ritossa. *Cell Stress Chaperones* **2010**, *16*, 235–249. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Tsukumo, D.M.; Carvalho-Filho, M.A.; Carnevali, J.B.; Prada, P.O.; Hirabara, S.M.; Schenka, A.A.; Araujo, E.P.; Vassallo, J.; Curi, R.; Velloso, L.A.; et al. Loss-of-function mutation in Toll-like receptor 4 prevents diet-induced obesity and insulin resistance. *Diabetes* **2007**, *56*, 1986–1998. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Rodrigues-Krause, J.; Krause, M.; O'Hagan, C.; De Vito, G.; Boreham, C.; Murphy, C.; Newsholme, P.; Colleran, G. Divergence of intracellular and extracellular HSP72 in type 2 diabetes: Does fat matter? *Cell Stress Chaperones* **2012**, *17*, 293–302. [[CrossRef](#)]
28. Trussardi Fayh, A.P.; de Carvalho Gomes, C.; Schroeder, H.T.; Henrique de Lemos Muller, C.; Maria de Araujo Moura Lemos, T.; Krause, M. Induction chemotherapy reduces extracellular heat shock protein 72 levels, inflammation, lipoperoxidation and changes insulin sensitivity in children and adolescents newly diagnosed with acute lymphoblastic leukemia. *Oncotarget* **2018**, *9*, 28784–28795. [[CrossRef](#)]
29. de Souza, D.C.; Matos, V.A.F.; Dos Santos, V.O.A.; Medeiros, I.F.; Marinho, C.S.R.; Nascimento, P.R.P.; Dorneles, G.P.; Peres, A.; Muller, C.H.; Krause, M.; et al. Effects of High-Intensity Interval and Moderate-Intensity Continuous Exercise on Inflammatory, Leptin, IgA, and Lipid Peroxidation Responses in Obese Males. *Front. Physiol.* **2018**, *9*, 567. [[CrossRef](#)]
30. Dalle-Donne, I.; Rossi, R.; Giustarini, D.; Milzani, A.; Colombo, R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin. Chim. Acta* **2003**, *329*, 23–38. [[CrossRef](#)]
31. da Silva Rossato, J.; Krause, M.; Fernandes, A.J.; Fernandes, J.R.; Seibt, I.L.; Rech, A.; de Bittencourt, P.I.H., Jr. Role of alpha- and beta-adrenoreceptors in rat monocyte/macrophage function at rest and acute exercise. *J. Physiol. Biochem.* **2014**, *70*, 363–374. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Galbinski, S.; Kowalewski, L.S.; Grigolo, G.B.; da Silva, L.R.; Jimenez, M.F.; Krause, M.; Frantz, N.; Bos-Mikich, A. Comparison between two cryopreservation techniques of human ovarian cortex: Morphological aspects and the heat shock response (HSR). *Cell Stress Chaperones* **2022**, *27*, 97–106. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Krause, M.; Keane, K.; Rodrigues-Krause, J.; Crognale, D.; Egan, B.; De Vito, G.; Murphy, C.; Newsholme, P. Elevated levels of extracellular heat-shock protein 72 (eHSP72) are positively correlated with insulin resistance in vivo and cause pancreatic beta-cell dysfunction and death in vitro. *Clin. Sci.* **2013**, *126*, 739–752. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Guan, W.J.; Liang, W.H.; Zhao, Y.; Liang, H.R.; Chen, Z.S.; Li, Y.M.; Liu, X.Q.; Chen, R.C.; Tang, C.L.; Wang, T.; et al. Comorbidity and its impact on 1590 patients with COVID-19 in China: A nationwide analysis. *Eur. Respir. J.* **2020**, *55*, 2000547. [[CrossRef](#)]
35. Oglesbee, M.J.; Herdman, A.V.; Passmore, G.G.; Hoffman, W.H. Diabetic ketoacidosis increases extracellular levels of the major inducible 70-kDa heat shock protein. *Clin. Biochem.* **2005**, *38*, 900–904. [[CrossRef](#)]
36. Nakhjavani, M.; Morteza, A.; Khajeali, L.; Esteghamati, A.; Khalilzadeh, O.; Asgarani, F.; Outeiro, T.F. Increased serum HSP70 levels are associated with the duration of diabetes. *Cell Stress Chaperones* **2010**, *15*, 959–964. [[CrossRef](#)]
37. Mayer, M.P.; Bukau, B. Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol. Life Sci.* **2005**, *62*, 670–684. [[CrossRef](#)]
38. Njemini, R.; Demanet, C.; Mets, T. Inflammatory status as an important determinant of heat shock protein 70 serum concentrations during aging. *Biogerontology* **2004**, *5*, 31–38. [[CrossRef](#)]
39. Haffner, S.M.; Lehto, S.; Ronnemaa, T.; Pyorala, K.; Laakso, M. Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction. *N. Engl. J. Med.* **1998**, *339*, 229–234. [[CrossRef](#)]
40. Lee, Y.H.; Giraud, J.; Davis, R.J.; White, M.F. c-Jun N-terminal kinase (JNK) mediates feedback inhibition of the insulin signaling cascade. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 2896–2902. [[CrossRef](#)]
41. Barrett, C.E.; Koyama, A.K.; Alvarez, P.; Chow, W.; Lundeen, E.A.; Perrine, C.G.; Pavkov, M.E.; Rolka, D.B.; Wiltz, J.L.; Bull-Otterson, L.; et al. Risk for Newly Diagnosed Diabetes >30 Days After SARS-CoV-2 Infection Among Persons Aged < 18 Year—United States, 1 March 2020–28 June 2021. *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **2022**, *71*, 59–65. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Montefusco, L.; Ben Nasr, M.; D'Addio, F.; Loretelli, C.; Rossi, A.; Pastore, I.; Daniele, G.; Abdelsalam, A.; Maestroni, A.; Dell'Acqua, M.; et al. Acute and long-term disruption of glycometabolic control after SARS-CoV-2 infection. *Nat. Metab.* **2021**, *3*, 774–785. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Narayan, K.M.V.; Staimez, L.R. Rising diabetes diagnosis in long COVID. *Lancet Diabetes Endocrinol.* **2022**, *10*, 298–299. [[CrossRef](#)]
44. Karpe, P.A.; Tikoo, K. Heat shock prevents insulin resistance-induced vascular complications by augmenting angiotensin-(1-7) signaling. *Diabetes* **2013**, *63*, 1124–1139. [[CrossRef](#)]
45. Krause, M.; Ludwig, M.S.; Heck, T.G.; Takahashi, H.K. Heat shock proteins and heat therapy for type 2 diabetes: Pros and cons. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **2015**, *18*, 374–380. [[CrossRef](#)]
46. Liao, Y.; Yuan, Q.; Torres, J.; Tam, J.P.; Liu, D.X. Biochemical and functional characterization of the membrane association and membrane permeabilizing activity of the severe acute respiratory syndrome coronavirus envelope protein. *Virology* **2006**, *349*, 264–275. [[CrossRef](#)]
47. Chan, C.P.; Siu, K.L.; Chin, K.T.; Yuen, K.Y.; Zheng, B.; Jin, D.Y. Modulation of the unfolded protein response by the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein. *J. Virol.* **2006**, *80*, 9279–9287. [[CrossRef](#)]
48. Weiss, S.R.; Navas-Martin, S. Coronavirus pathogenesis and the emerging pathogen severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2005**, *69*, 635–664. [[CrossRef](#)]

49. Langouche, L.; Vander Perre, S.; Wouters, P. Insulin signaling in critical illness: Intensive versus conventional insulin therapy. In Proceedings of the 25th International Symposium on Intensive Care and Emergency Medicine, Brussels, Belgium, 21–25 March 2005; p. 384.
50. Literati-Nagy, B.; Kulcsar, E.; Literati-Nagy, Z.; Buday, B.; Peterfai, E.; Horvath, T.; Tory, K.; Kolonics, A.; Fleming, A.; Mandl, J.; et al. Improvement of insulin sensitivity by a novel drug, BGP-15, in insulin-resistant patients: A proof of concept randomized double-blind clinical trial. *Horm. Metab. Res.* **2009**, *41*, 374–380. [[CrossRef](#)]
51. Literati-Nagy, B.; Peterfai, E.; Kulcsar, E.; Literati-Nagy, Z.; Buday, B.; Tory, K.; Mandl, J.; Sumegi, B.; Fleming, A.; Roth, J.; et al. Beneficial effect of the insulin sensitizer (HSP inducer) BGP-15 on olanzapine-induced metabolic disorders. *Brain Res. Bull.* **2010**, *83*, 340–344. [[CrossRef](#)]
52. Smuder, A.J.; Morton, A.B.; Hall, S.E.; Wiggs, M.P.; Ahn, B.; Wawrzyniak, N.R.; Sollanek, K.J.; Min, K.; Kwon, O.S.; Nelson, W.B.; et al. Effects of exercise preconditioning and HSP72 on diaphragm muscle function during mechanical ventilation. *J. Cachexia Sarcopenia Muscle* **2019**, *10*, 767–781. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

## ANEXO II – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

**Título do Projeto:** O impacto do diabetes e da glicemia em desfechos clínicos de pacientes com COVID-19

Você está sendo convidado(a) a participar de uma pesquisa cujo objetivo é avaliar se existe relação entre o diabetes, parâmetros metabólicos e inflamatórios com a infecção pelo coronavírus (SARS-Cov-2), além disso será avaliado se essa relação interfere em desfechos durante a sua internação no hospital (como admissão em unidade de terapia intensiva (UTI), necessidade de ventilação mecânica, tempo de internação no hospital e a ocorrência de morte) e após a sua alta hospitalar. Esta pesquisa está sendo realizada pelo Serviço de Endocrinologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

Se você aceitar o convite, sua participação na pesquisa envolverá os seguintes procedimentos:

### **Durante a internação hospitalar:**

- 1) Autorização para acessar o prontuário e consultar as seguintes informações: evolução das equipes assistentes, controles de sinais vitais, exames e procedimentos realizados e medicações utilizadas durante a internação.
- 2) Coleta de cerca de 25mL (equivalente a aproximadamente duas colheres de sopa) de sangue para análise, semelhante a um exame de sangue de rotina em que serão realizados exames de glicemia, hemoglobina glicada, insulina, cortisol, ACTH e citocinas plasmáticas.

### **Após a alta hospitalar:**

Após a alta hospitalar, serão realizadas duas consultas, a primeira 4 semanas após a alta e a segunda 16 semanas após a alta hospitalar, as quais serão agendadas no Centro de Pesquisa Clínica (CPC) do HCPA com o objetivo de realizar os seguintes procedimentos definidos da visita 1 e 2 abaixo:

#### **Visita 1:**

- 1) Entrevista médica completa com avaliação de sua saúde, informações sobre possíveis doenças, medicações em uso.

- 2) Responder a questionários sobre nível de atividade física, nível socioeconômico, escolaridade e nível cultural.
- 3) Exame físico composto por: peso, altura, medidas da cintura e do quadril e composição corporal por bioimpedanciometria (que é um exame indolor capaz de calcular a quantidade de gordura corporal, em que você fica por alguns segundos em pé sobre uma espécie de balança).
- 4) Exames de sangue e urina: você virá em jejum de 12 horas para coletar sangue para exames de rotina como colesterol, triglicerídeos e hemoglobina glicada. Para esses exames serão coletados em média 25 mL (equivalente a 2 colheres de sopa) de sangue.
- 5) Exame para avaliar sarcopenia: que consistirá na avaliação da circunferência da panturrilha, e teste da caminhada, no qual você caminhará durante 6 minutos e medidas serão realizadas no início e no final do teste, como pressão arterial e frequência cardíaca.

#### **Visita 2:**

- 1) Responder a questionários sobre nível de atividade física.
- 2) Exame físico composto por: peso, altura, medidas da cintura e do quadril e composição corporal por bioimpedanciometria (que é um exame indolor capaz de calcular a quantidade de gordura corporal, em que você fica por alguns segundos em pé sobre uma espécie de balança).
- 3) Exames de sangue e urina: você virá em jejum de 12 horas para coletar sangue para exames de rotina como colesterol, triglicerídeos e hemoglobina glicada. Para esses exames serão coletados em média 25 mL (equivalente a 2 colheres de sopa) de sangue.
- 4) Exame para avaliar sarcopenia: que consistirá na avaliação da circunferência da panturrilha, e teste da caminhada, no qual você caminhará durante 6 minutos e medidas serão realizadas no início e no final do teste, como pressão arterial e frequência cardíaca.
- 5) Exames para avaliar a função cardíaca: eletrocardiograma.

Os possíveis riscos ou desconfortos decorrentes da participação na pesquisa são:

- Entrevista clínica: algumas perguntas, como o seu nível cultural, escolaridade, depressão, ansiedade, dentre outras, podem lhe causar algum constrangimento, porém é muito importante que sejam respondidas com bastante sinceridade.

- Exames de sangue: as coletas de sangue podem causar desconforto e hematoma (mancha roxa na pele) na região da coleta decorrente de alguma possível infecção, lesão nervosa e dor. Em cada exame serão coletados em média 25 mL de sangue.

Os demais procedimentos deste estudo, não conferem riscos a você.

A participação na pesquisa não trará benefícios diretos aos participantes, porém contribuirá para o aumento do conhecimento sobre este tema e, se aplicável, poderá beneficiar futuros pacientes. Caso seja encontrado algum resultado relevante para a sua saúde nos exames realizados pela pesquisa, se você estiver de acordo, iremos repassar esta informação para o seu médico assistente.

Sua participação na pesquisa é totalmente voluntária, ou seja, não é obrigatória. Caso você decida não participar, ou ainda, desistir de participar e retirar seu consentimento, não haverá nenhum prejuízo ao atendimento que você recebe ou possa vir a receber na instituição.

Não está previsto nenhum tipo de pagamento pela sua participação na pesquisa e você não terá nenhum custo com respeito aos procedimentos envolvidos.

Caso ocorra alguma intercorrência ou dano, resultante de sua participação na pesquisa, você receberá todo o atendimento necessário, sem nenhum custo pessoal.

Os dados coletados durante a pesquisa serão sempre tratados confidencialmente. Os resultados serão apresentados de forma conjunta, sem a identificação dos participantes, ou seja, o seu nome não aparecerá na publicação dos resultados.

Caso você tenha dúvidas, poderá entrar em contato com o pesquisador responsável Fernando Gerchman pelo telefone (51) 33598127, com a pesquisadora Gabriella Richter Natividade pelo telefone (51) 985810805 ou com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), pelo telefone (51) 33597640, ou no 2º andar do HCPA, sala 2229, de segunda à sexta, das 8h às 17h.

Esse Termo é assinado em duas vias, sendo uma para o participante e outra para os pesquisadores.

---

Nome do participante da pesquisa

---

Assinatura

---

Nome do pesquisador que aplicou o Termo

---

Assinatura

Local e Data: \_\_\_\_\_